

JANAÍNA ZAVITOSKI DA SILVA

Aspectos clínico, radiográfico e microbiológico da pigmentação em molares decíduos sob monitoramento preventivo. Estudo longitudinal.

Araçatuba

2010

JANAÍNA ZAVITOSKI DA SILVA

Aspectos clínico, radiográfico e microbiológico da pigmentação em molares decíduos sob monitoramento preventivo. Estudo longitudinal.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP- Campus de Araçatuba, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de **DOUTOR EM ODONTOPEDIATRIA.**

Orientador: Prof. Dr. Robson Frederico Cunha

Co-orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

Araçatuba

2010

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586e	<p>Silva, Janaína Zavitoski da. Aspectos clínico, radiográfico e microbiológico da pigmentação em molares decíduos sob monitoramento preventivo. Estudo longitudinal / Janaína Zavitoski da Silva . -- Araçatuba : [s.n.], 2010 139f : il. + 1 CD-ROM</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2010 Orientador: Prof. Dr. Robson Frederico Cunha Co-orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior</p> <p>1. Dentição primária 2. Fissuras dentárias 3. Estudos longitudinais 4. Radiografia interproximal 5. Microbiologia</p>
	<p>Black D27 CDD 617.645</p>

Dedicatória

Dedicatória

Dedico este trabalho

A Deus,

Pai todo poderoso, criador e arquiteto desse universo, que em toda a minha caminhada se fez presente, amparando-me, dando-me forças para arrebatrar as pedras do caminho e coragem para seguir a vida com humildade e amor no coração.

Ao meu pai José,

Ser humano de coração imensurável e infinito, lutador que carrega consigo o brio do homem e a leveza da natureza...

Meu eterno herói e símbolo de que com amor no coração e suor nas mãos se concretiza a vida com felicidade. Amo-te em demasia!

"As tuas mãos tem grossas veias como cordas azuis sobre um fundo de manchas já cor de terra — como são belas as tuas mãos — pelo quanto lidaram, acariciaram ou fremiram na nobre cólera dos justos...

Porque há nas tuas mãos, meu velho pai, essa beleza que se chama simplesmente vida.

E, ao entardecer, quando elas repousam nos braços da tua cadeira predileta, uma luz parece vir de dentro delas..."

As mãos do meu pai- Mário Quintana

À minha mãe Judite,
*Mulher guerreira, voraz pela sabedoria
Companheira da educação, lutadora,
Amante da criação,
Doce como o mel,
Minha estrela maior,
Amo-te sem fronteiras, minha eterna guia e conselheira!*

*Ai, minha mãe
Minha mãe menininha..."*

Oração da mãe menininha- Maria Bethânia

*Mãe, você sempre de olho em mim
Às vezes, juro não reparo
Mãe, seu colo sempre ali presente
Amor, tão puro amor...
Tão raro
(...)
Mãe teu infinito amor
Eterno amor é tão profundo
(...)
Mãe agora aqui diante de você declaro
Minha vida fica mais bonita
Com você do lado, do meu lado
Te amo tanto, tanto e te agradeço sempre
(...)*

Mãe- Fábio Júnior

Ao meu amado companheiro, Cristiano

Pela agradabilíssima surpresa de sua presença em minha vida. Imensurável dulçor emana de suas palavras e sinceridade de seu olhar... Obrigada por ser a pessoa com quem divido o meu coração, as minhas alegrias, conquistas, tristezas e angústias do dia a dia. Sempre me incentivou profissionalmente e me deu forças e apoio para finalizar este trabalho de pesquisa. Te amo para sempre.

*"Love me tender, love me sweet, never let me go.
You have made my life complete, and I love you so..."*

Love me tender- Elvis Presley

*"...Your kisses lift me higher
Like the sweet song of a choir
You light my morning sky
With burning love..."*

Burning Love- Elvis Presley

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas."

Antoine de Saint- Exupéry

O pequeno príncipe

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Robson Frederico Cunha**, pelos ensinamentos desde a minha graduação, especialização, mestrado e doutorado. O meu crescimento ao lado do senhor foi crescente e contínuo, marcado por etapas. Logo, tornei-me uma amante da Odontopediatria e da Ciência Aplicada. Sou eternamente grata por ter compartilhado parte de sua brilhante experiência profissional comigo e, acima de tudo, depositar confiança em minha pessoa.*

Risos, gratificações, lágrimas, tropeços fizeram parte de minha caminhada durante essa pesquisa, sendo que em todas as etapas o senhor estava ao meu lado amparando-me e guiando-se com seus sábios vocábulos. Obrigada pela incessante paciência, atenção, amizade e dedicação para com a minha pessoa e esta pesquisa.

*Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim-Júnior**, pela solicitude em me ensinar os caminhos da Microbiologia. Agradável surpresa conviver ao lado do senhor e poder compartilhar minutos de desenrolar de uma mente brilhante e borbulhante de ideias. Grata pela paciência para comigo, zelo, muito trabalho e dedicação para com os dados microbiológicos.*

*À professora, **Christiane Marie Schweitzer**, pela solicitude e zelo na análise estatística dos resultados deste trabalho de pesquisa.*

Ao Professor **Toninho da Radiologia**, pelo auxílio e orientação antes e durante a elaboração e realização da metodologia de análise radiográfica.

À exímia mestre em Odontopediatria, **Tatyana de Souza Pereira**, co-autora deste trabalho de pesquisa que colaborou de maneira essencial e brilhante para a execução e término do mesmo. Além de todo o desempenho como profissional, é uma amiga-irmã que conquistei ao longo dos anos de pós-graduação. A sua alegria, inteligência e perspicácia são contagiantes, amiga. Sempre serei grata a todo o ombro amigo que me emprestou.

Ao doutor em Odontopediatria, **Max Douglas Faria**, gracioso amigo e agradável companheiro de trabalho. Você é um grande exemplo de luta, garra e de que o maior alimento da boa convivência é a humildade.

Às **grandiosas famílias Zavitoski, Silva e Tonez** que sempre estiveram ao meu lado, seja na presença física, no pensamento positivo ou no plano espiritual. Táta, Mel, Mu, Tio Velsírio, Vó Nadir, Vô Silvestre (in memorian), Tia Anita, Tio Miro, Rubens, Tia Elza, Nana, Vó Dirce e Vô Aparecido (in memorian). Sou imensamente feliz por poder compartilhar a minha vivência e meu sangue com vocês regada a muito amor e carinho.

Aos meus sogros, **Eliane e Júnior**, que me acolheram como uma filha em seu abençoado lar. Obrigada pela agradável convivência, cuidado e amor dedicados para com a minha pessoa.

À minha cunhada, **Camila**, pela solicitude, educação e carinho dispensados para comigo.

Ao doce, **Luquinhas**, criança adorável, astuta e de nobre coração.

Às **famílias Toqueton e Valle** por me "abraçarem" de modo gracioso em seu seio familiar.

À minha eterna menina, **Hannah...** minha companheira que me faz sorrir como criança. Uma das maiores causas de minha alegria. "Animais compartilham conosco o privilégio de terem uma alma."
Pitágoras

A todos os **responsáveis** pelos pacientes que participaram desta pesquisa, permitindo que eu os acompanhasse da melhor maneira possível com o amparo da Ciência, da dedicação pessoal e profissional; alicerçados pelo amor e carinho.

Às **queridas e doces crianças** que se submeteram a esta pesquisa... pelo carinho, risadas, choros, manhas e pela pureza emanada de suas almas.

Agradecimientos

*A*gradecimentos

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, digníssimo diretor e Dr^a Ana Maria Pires Soubhia, digníssima vice-diretora.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, na pessoa de seu coordenador Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP: Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof^a Dr^a Rosângela Santos Nery (Dandinha), Prof^a Dr^a Sandra M.H.C. Á. Aguiar pela agradável convivência e conhecimentos compartilhados.

À Prof^a Dr^a Cleide Cristina Rodrigues Martinhon (Pity) pela agradável convivência no Departamento e admirável senso de humor.

À Maria, funcionária da Disciplina de Odontopediatria, pelo auxílio constante durante a minha caminhada no Departamento.

A todos os colegas do Curso de Pós-graduação em Odontopediatria (Mestrado e Doutorado) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP pela agradável convivência.

Aos colegas de turma Alessandra, Eliana Takeshita, Max Douglas e Taís, pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os colegas de trabalho na Bebê-Clínica pela agradável convivência e troca de experiências.

Às estagiárias da Disciplina de Microbiologia, Lívia Buzatti Meca e Kathlenn Liezbeth Oliveira, que me auxiliaram, inicialmente, na parte laboratorial deste estudo. Obrigada pela paciência e tempo destinados para comigo.

Ao bibliotecário, Cláudio Hideo Matsumoto, pela atenção, solicitude e rapidez na elaboração da ficha catalográfica.

À Valéria e Diogo, funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pelo profissionalismo, paciência e atenção ilimitados para com a minha pessoa.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste curso de doutorado.

Aos meus poucos e grandes amigos, que seja de perto ou de longe, sempre me deram forças para a minha caminhada acadêmica.

Ao Instituto Educacional TENO, na pessoa da Coordenadora Ana Paula Moraes, que abriu as portas para que eu me iniciasse na carreira docente.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho. Com apreço, eternamente grata!

Epigrafe

Epígrafe

Oração de São Francisco de Assis

Senhor, faze de mim instrumento de vossa paz.

Onde houver ódio, que eu leve o amor,

Onde houver ofensa, que eu leve o perdão,

Onde houver discórdia, que eu leve a união,

Onde houver dúvida, que eu leve a fé,

Onde houver erro, que eu leve a verdade,

Onde houver desespero, que eu leve a esperança,

Onde houver tristeza, que eu leve a alegria,

Onde houver trevas, que eu leve a luz!

Ó Mestre, faze que eu procure mais consolar que ser consolado;

compreender que ser compreendido,

amar, que ser amado.

Pois é dando que se recebe,

é perdoando que se é perdoado,

é morrendo que se vive para a vida eterna.

Resumo

Resumo

SILVA, J. Z. **Aspectos clínico, radiográfico e microbiológico da pigmentação em molares decíduos sob monitoramento preventivo. Estudo longitudinal.** 2010. 139f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

Este estudo verificou os aspectos clínico, radiográfico e microbiológico da pigmentação de fossas e fissuras pigmentadas em molares decíduos no período de 18 meses. Observou-se o dente e a superfície dentária mais acometidos pela pigmentação, a distribuição da mesma na superfície, a cor, a ocorrência de cavitação, a textura, a presença ou não de radioluscência, tipo de tratamento, bem como os microrganismos mais frequentes. Participaram do estudo 116 pacientes (63-grupo experimental e 53-grupo controle). Em 155 molares decíduos de 63 pacientes (grupo experimental) na faixa etária de 3 a 10 anos, foi realizada a coleta de biofilme, exame clínico nas fossas e fissuras pigmentadas, bem como exame radiográfico interproximal. Realizou-se a análise qualitativa de microrganismos das fossas e fissuras pigmentadas por meio do PCR convencional e quantitativa dos cocos cariogênicos (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) por "Real-Time PCR". A análise estatística utilizou o software Statistica versão 9 aplicando os testes do qui-quadrado, de correlação linear, de Komolgorov-Smirnov e Lilliefors e coeficiente de concordância de Kendall. O nível de significância foi de 5%. Observou-se que os dentes mais acometidos pela pigmentação nas fossas e fissuras foram os segundos molares, em especial o superior do lado esquerdo (21,93%). A predominância da superfície oclusal (67,74%) foi significativa para todos os dentes. Para os segundos e primeiros molares, o predomínio do padrão parcial de distribuição da pigmentação foi estatisticamente significante (75,48%). A cor marrom predominou

significativamente (85,81%) em todos dentes analisados. A ocorrência de cavitação foi maior no período inicial de 6 meses, decrescendo ao longo do tempo e sem significância para todos os dentes. A maioria dos dentes manteve a textura dura ao longo dos períodos estudados. Uma minoria do grupo amostral recebeu procedimento restaurador/selante. A análise radiográfica evidenciou que o escore 0 (ausência de radiotransparência) foi o mais frequente nas duas avaliações. Observou-se a prevalência de microrganismos do gênero *Actinomyces* nas fossas e fissuras dos dentes pigmentados, enquanto para os demais microrganismos os dados dos três grupos de dentes se mostraram semelhantes. Não se observou alteração quantitativa de cocos cariogênicos nos três grupos estudados nos dois períodos de coleta, exceto nos dentes com cavitação, onde a presença dos cocos cariogênicos foi significativa. Concluiu-se que, excetuando os casos em que as fossas e fissuras pigmentadas apresentavam-se cavitadas e com textura amolecida, indicou-se o monitoramento clínico das mesmas. A ocorrência de fossas e fissuras pigmentadas, necessariamente, não significou tratar-se de lesão cariiosa. Enfatiza-se que semelhante conduta clínica apresentará melhores resultados em pacientes participantes de programas de assistência odontológica rotineira.

Palavras-chave: Dentição primária. Fissuras dentárias. Estudos longitudinais. Radiografia interproximal. Microbiologia.

Abstract

Abstract

SILVA, J. Z. **Clinical, radiographic and microbiological aspects of pigmentation in primary molars under preventive monitoring. Longitudinal study.** 2010. 139f. Thesis (Doctorate) – Araçatuba Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2010.

This study evaluated the clinical, radiographic and microbiological aspects of pigmentation in pits and fissures in primary molars during 18 months. It was observed the dental surface that was more pigmented, pigmentation distribution on the surface, color, presence of cavitation, texture, presence or not of radiolucency, treatment type, and microorganisms that were more frequent. Study participants were 116 patients (63-experimental group and 53-control group). It was conducted the collection of biofilm, clinical exam of the pigmented pits and fissures, and interproximal radiographic exam in 155 deciduous molars of 63 patients (experimental group) aged from 3 to 10 years. The qualitative analysis of the microorganisms in the pigmented pits and fissures was conducted by the conventional PCR while the quantitative analysis of the cariogenic *cocos* (*Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*) was obtained with the "Real-Time PCR". The software Statistica version 9 was applied for the statistical analysis with chi-squared test, linear correlation, Komolgorov-Smirnov and Lilliefor, and Kendall's coefficient of concordance at 5% level of confidence. The second molars presented higher frequency of pigmentation in the pits and fissures, mainly the left superior second molar (21,93%). The occlusal surface was significantly more frequent (67,74%) for all teeth. For the first and second molars, the pattern of partial distribution of pigmentation was statistically significant (75,48%). The brown color was significantly more frequent (85,81%) in all teeth. The occurrence of cavitation was higher at initial of 6 months and reduced with

the time with no significance for all teeth. Most of the teeth maintained the texture during the periods of evaluation. A minority of the sample was submitted to restorative procedure/sealant. The radiographic analysis revealed that the score 0 (absence of radiolucent) was more frequent in both evaluations. It was observed the prevalence of the microorganisms *Actinomyces* in the pits and fissures of the pigmented teeth while the other microorganisms were similar for the three groups of teeth. It was not observed quantitative alteration of the cariogenic cocos in the three groups evaluated in the two periods of collection, except for the teeth with cavitation that exhibited a significant presence of cariogenic cocos. It was concluded that there was clinical monitoring of the pigmented pits and fissures, except when they presented cavitation and softened texture. The presence of pigmented pits and fissures did not mean the occurrence of caries. It is important to highlight that a similar clinical management will present better results in patients that are attended by programs of routine dental assistance.

Keywords: Primary dentition. Dental fissures. Longitudinal studies. Interproximal radiography. Microbiology.

Listas

Lista de Figuras

Figura 1-	Armazenamento e transporte do biofilme das fossas e fissuras pigmentadas em água ultra pura Milli-Q	43
Figura 2-	Segundo molar decíduo inferior direito com pigmentação distribuída de modo parcial na superfície vestibular	45
Figura 3-	Primeiro molar decíduo superior direito com pigmentação distribuída de modo pontos separados na superfície oclusal	46
Figura 4-	Segundo molar decíduo superior direito com pigmentação na cor marrom nas superfícies oclusal e palatina	46
Figura 5-	Segundo molar decíduo inferior esquerdo com pigmentação na cor preto na superfície oclusal	47
Figura 6-	Segundo molar decíduo inferior direito com pigmentação na superfície oclusal e ausência de cavitação	47
Figura 7-	Segundo molar decíduo inferior esquerdo com pigmentação na superfície oclusal e presença de cavitação	48
Figura 8-	Negatoscópio com a máscara de cartolina	50
Figura 9-	Lupa estereoscópica de mão (20X/ 20mm)	50
Figura 10-	Máscara de cartolina preta com abertura apenas para se colocar a radiografia interproximal	51
Figura 11-	Aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400)	55
Figura 12-	Eletroforese em gel de agarose a 1%	56
Figura 13-	Transiluminador com luz ultra-violeta	57
Figura 14-	Marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP)	57
Figura 15-	Distribuição do número da amostra de acordo com o gênero	63
Figura 16-	Distribuição do número e da porcentagem do grupo experimental de acordo com a sua idade	64

Figura 17-	Distribuição do número e da porcentagem dos pacientes do grupo experimental de acordo com a presença ou não de doença crônica e/ou oportunista	65
Figura 18-	Distribuição do número e da porcentagem da utilização ou não de medicamento pela criança	66
Figura 19-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes que apresentavam pigmentação nas fossas e fissuras	68
Figura 20-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras de acordo com o agrupamento em primeiros e segundos molares	69
Figura 21-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras de acordo com o arco superior ou inferior	70
Figura 22-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a superfície dentária em que ocorreu a pigmentação nas fossas e fissuras	71
Figura 23-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a pigmentação das fossas e fissuras em uma superfície dentária	72
Figura 24-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a pigmentação das fossas e fissuras em duas superfícies dentárias	73
Figura 25-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com o modo de distribuição da pigmentação das fossas e fissuras na superfície dentária	75
Figura 26-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a cor da pigmentação das fossas e fissuras	77

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a superfície dentária acometida pela pigmentação nas fossas e fissuras aos 0, 6, 12 e 18 meses	74
Tabela 2-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com o modo de distribuição da pigmentação das fossas e fissuras aos 0, 6, 12 e 18 meses	76
Tabela 3-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a cor da pigmentação das fossas e fissuras aos 0, 6, 12 e 18 meses	78
Tabela 4-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a presença ou não de cavitação nas fossas e fissuras aos 6, 12 e 18 meses	79
Tabela 5-	Distribuição do número dos dentes com fossas e fissuras pigmentadas que cavitaram aos 6, 12 e 18 meses	80
Tabela 6-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a textura da pigmentação das fossas e fissuras aos 6, 12 e 18 meses	82
Tabela 7-	Distribuição do número e da porcentagem dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras de acordo com o tipo de tratamento realizado aos 6, 12 e 18 meses	83
Tabela 8-	Distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico aos 6, 12 e 18 meses (Exame 1)	85
Tabela 9-	Distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico aos 6, 12 e 18 meses (Exame 2)	86
Tabela 10-	Distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico aos 6, 12 e 18 meses (Examinador 1)	87

Tabela 11-	Distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico aos 6, 12 e 18 meses (Examinador 2)	88
Tabela 12-	Ocorrência de diferentes grupos bacterianos no biofilme supragengival de dentes com pigmentação nas fossas e fissuras (grupo experimental) e dentes sem pigmentação (grupo controle 1 e 2), segundo dados obtidos por amplificação do DNA microbiano por PCR. Resultado da coleta inicial	90
Tabela 13-	Ocorrência de diferentes grupos bacterianos no biofilme supragengival de dentes com pigmentação nas fossas e fissuras (grupo experimental) e dentes sem pigmentação (grupo controle 1 e 2), segundo dados obtidos por amplificação do DNA microbiano por PCR. Resultado da coleta após 12 meses	92
Tabela 14-	População de cocos cariogênicos e microrganismos totais no biofilme coletado do interior das fossas e fissuras pigmentadas (grupo experimental) e não pigmentadas (grupo controle 1 e 2), segundo dados obtidos através de Real-Time PCR. Resultado da coleta inicial	93
Tabela 15-	Participação percentual dos cocos cariogênicos na microbiota presente no biofilme obtido das fossas e fissuras pigmentadas e não pigmentadas, segundo dados obtidos por Real-Time PCR. Resultado da coleta inicial	94
Tabela 16-	População de cocos cariogênicos e microrganismos totais no biofilme coletado do interior de fossas e fissuras pigmentadas (grupo experimental) e não pigmentadas (grupo controle 1 e 2), segundo dados obtidos através de Real-Time PCR. Resultado da coleta após 12 meses	94
Tabela 17-	Participação percentual dos cocos cariogênicos na microbiota presente no biofilme obtido das fossas e fissuras pigmentadas e não pigmentadas, segundo dados obtidos por Real-Time PCR. Resultado da coleta após 12 meses	95

Lista de Quadros

- Quadro 1- Protocolo empregado para revelação e fixação das radiografias 49
- Quadro 2- Escores utilizados para a análise das radiografias interproximais 51
- Quadro 3- Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de PCR convencional 54
- Quadro 4- Iniciadores e sondas específicas empregados nas reações com o Real-Time PCR 59

Lista de Abreviaturas

UNESP	= Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
FOA	= Faculdade de Odontologia de Araçatuba
GC	= Grupo controle
GE	= Grupo experimental
DNA	= Ácido desoxirribonucleico
µL	= microlitro
PCR	= Polymerase Chain Reaction
rRNA	= Ácido ribonucleico ribossomal
dNTP	= Desoxirribonucleotídeo fosfatado
MgCl ₂	= Cloreto de magnésio
<i>Taq</i>	= <i>Thermus aquaticus</i>

Sumário

Sumário

1	Introdução	32
2	Proposição	37
3	Material e Método	39
3.1	Aprovação do projeto de pesquisa	39
3.2	Delineamento experimental	39
3.3	Local da pesquisa	40
3.4	Grupo amostral	41
3.4.1	Grupo experimental	41
3.4.1.1	Critérios de inclusão	41
3.4.1.2	Critérios de não inclusão	41
3.4.2	Grupo controle	42
3.5	Coleta de dados	42
3.5.1	Etapa clínica	42
3.5.1.1	Obtenção dos espécimes clínicos	42
3.5.1.1.1	Biofilme das fossas e fissuras pigmentadas	42
3.5.1.1.2	Exame clínico	43
3.5.1.1.3	Exame radiográfico	48
3.5.2	Etapa laboratorial	52
3.5.2.1	Extração do DNA bacteriano e determinação de sua concentração	52
3.5.2.2	Deteção de microrganismos bucais por PCR convencional	52
3.5.2.3	Reação de amplificação do DNA por PCR convencional	55
3.5.2.4	Análise quantitativa da presença de cocos cariogênicos por "Real-Time PCR"	58
3.6	Análise estatística	60
4	Resultado	63
4.1	Dados gerais da amostra	63
4.2	Perfil clínico da pigmentação dentária das fossas e fissuras	67
4.2.1	Dente acometido	67
4.2.2	Superfície dentária acometida	70
4.2.3	Distribuição na superfície	75
4.2.4	Cor	77
4.2.5	Cavitação	79
4.2.6	Textura	81

4.2.7 Tratamento	83
4.2.8 Confiabilidade das avaliações clínicas	84
4.3 Perfil radiográfico dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras	85
4.4 Perfil microbiológico dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras	89
5 Discussão	97
6 Considerações finais	105
7 Conclusão	107
Referências	109
Anexos	118

Introdução

1 Introdução

As filosofias empregadas no tratamento da cárie dentária se alteram com o tempo e atualmente evidências científicas contestam as abordagens tradicionais (FRENCKEN; MAKONI, 1994), provocando uma mudança no padrão de manejo das lesões cariosas pelos profissionais.

Em princípio, os programas de atenção odontológica devem ser os mais preventivos possíveis (FRENCKEN; HOLMGREN, 2001) e ocuparem lugar de destaque nas opções de tratamento. No entanto, nos casos em que não são obtidos êxitos com o método conservador, devem-se empregar medidas que contemplem a mínima invasão, preservando ao máximo a estrutura dental e inibindo novos processos cariosos. Esses são os aspectos da atual técnica de tratamento conhecida como abordagem de mínima intervenção (MOUNT, 1991).

A detecção de lesões cariosas nas fossas e fissuras em estágios iniciais é indispensável para o sucesso dessa abordagem, que objetiva saúde e manutenção da integridade dentária. Contudo, a ampla utilização de produtos que contém fluoretos (WEERHEIJM et al., 1990; WEERHEIJM; GRUYTHUYSEN; VAN AMERONGEN, 1992; PINTO, 1998; TEN CATE, 2004), o maior acesso aos métodos de higienização (KRAMER; FELDENS; ROMANO, 2000) e diferentes padrões dietéticos (TOLEDO, 1996) têm sido responsáveis pela mudança no padrão de desenvolvimento dessas lesões restritas às fossas e fissuras. A principal delas é a ocorrência da pigmentação escura das fossas e fissuras, que dificulta o processo de identificação e confunde o diagnóstico correto da presença ou não de lesão cariosa, dividindo os profissionais quanto às estratégias terapêuticas adequadas (KIDD; TAYLOR; WILSON, 1992; IMPARATO; ROCHA; RAGGIO, 2003).

O exame clínico visual, muito embora seja o método de escolha para se detectar lesões oclusais (MOTA et al., 2002), apresenta limitações para se relacionar a pigmentação ao longo da fissura com o estágio de desenvolvimento da lesão, sendo imprescindível considerar outros fatores relacionados ao dente, paciente e profissional. Nesse contexto, estudos longitudinais podem fornecer resultados valiosos, auxiliando a abordagem clínica nestas situações.

Na avaliação das lesões de fossas e fissuras pigmentadas, de igual importância e decisiva influência são os estudos microbiológicos. Theilade e Pang (1987) observaram lesões escurecidas em microscopia eletrônica de varredura e notaram a predominância de filamentos, cocos e bastonetes gram-positivos; concluindo que o escurecimento é um tipo específico de biofilme dental, caracterizado por microbiota simples e com tendência a se calcificar. Contudo, a literatura sugere que a pigmentação ao longo das fossas e fissuras depende da invasão dos tecidos e estruturas dentárias por microrganismos bucais, particularmente *Streptococcus mutans* (STEINER; HELFENSTEIN; MENGHINI, 1998; CHRISTENSEN; PLOEGER; PALMER, 2001).

Estudos como os de Rickets; Kidd; Beighton (1995); Rickets et al. (2002) e Ekstrand et al. (2005) relatam a presença de microrganismos em lesões não cavitadas ativas e inativas. Entretanto, a continuação do processo carioso ainda não foi bem estabelecida apesar de, geralmente, a cavitação do esmalte ocorrer após a progressão da lesão em dentina. Entretanto, as pesquisas dessa natureza são escassas para se considerar uma conduta invasiva como a melhor terapêutica e segundo Hamilton et al. (2002) o tratamento precoce de lesões questionáveis não se insere na proposta de mínima intervenção.

Em função da preocupação com a presença de lesões de cárie oculta em dentina, o exame radiográfico, que era considerado de valor limitado para o diagnóstico de lesões na superfície oclusal, passou por uma reavaliação (WENZEL; LARSEN; FEJERSKOV, 1991; PITTS, 2004; ANGNES

et al., 2005). Como as informações clínicas subestimam o número de lesões oclusais em dentina, o uso da radiografia interproximal, embora não mostre a real condição, tem sido o método mais recomendado, por uma alta especificidade, para auxiliar o diagnóstico da superfície oclusal de dentes decíduos e permanentes (CREANOR et al., 1990, KIDD; NAYLOR; WILSON, 1992; WEERHEIJM; GRUYTHUYSEN; VAN AMERONGEN, 1992; LUSSI E FRANCESCUT, 2003; SOUZA-ZARONI et al., 2006).

Assim, diante de um cenário científico que oferece poucos subsídios para o estabelecimento de métodos efetivos para a abordagem de fossas e fissuras pigmentadas, destaca-se a importância de pesquisas que ofereçam evidências científicas para a conduta clínica. Portanto, nota-se uma necessidade em se determinar as relações entre a estrutura de fossas e fissuras pigmentadas, sítios e dentes mais acometidos, suas interações com o meio salivar e os microrganismos presentes.

Logo, a proposta deste estudo surgiu em decorrência da frequente observação clínica de pigmentações nas fossas e fissuras de molares decíduos dos pacientes matriculados na Bebê-clínica e na Clínica de Prevenção da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/ FOA- Unesp. Observou-se que se trata de um assunto polêmico e escasso na literatura e que ainda não há parâmetros estabelecidos para a abordagem de fossas e fissuras pigmentadas, o que leva a uma dificuldade de diagnóstico e manejo dessas ocorrências pelo cirurgião-dentista. Desse modo, optou-se por se realizar um estudo retrospectivo e longitudinal a fim de acompanhar os aspectos clínico, radiográfico e microbiológico da pigmentação em molares decíduos sob monitoramento preventivo.

Além disso, esse estudo trata de um tema atual e polêmico, no qual se pretende contribuir com o número de pesquisas que abordam o diagnóstico e manejo de pigmentações em molares decíduos. Acrescenta-se ainda, a possibilidade concreta de executar esse estudo *in vivo* de

forma longitudinal realizando uma análise clínica, radiográfica e microbiológica, propiciando maior confiabilidade aos resultados.

Proposição

2 Proposição

A proposta do presente estudo foi avaliar, longitudinalmente, os aspectos clínico, radiográfico e microbiológico de pigmentações em molares decíduos sob monitoramento preventivo.

Material e Método

3 Material e Método

3.1 Aprovação do projeto de pesquisa

Previamente à realização deste estudo, o projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (Resolução nº 01 de 13/06/1998 do Conselho Nacional de Saúde) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, sendo aprovado com o protocolo 2007-01540 (ANEXO 1). A fase experimental foi realizada a partir da aprovação do mesmo e da obtenção do consentimento livre e esclarecido dos responsáveis pelos pacientes participantes da pesquisa (ANEXO 2).

3.2 Delineamento experimental

A presente pesquisa se tratou de um estudo retrospectivo e longitudinal que avaliou os aspectos clínico, radiográfico e microbiológico da pigmentação em molares decíduos. Participaram da presente pesquisa pacientes na faixa de 3 a 10 anos, matriculados na Clínica de Prevenção da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/FOA- UNESP, que apresentavam molares decíduos com fossas e fissuras pigmentadas (grupo experimental) e não pigmentadas (grupos controle 1 e 2).

De cada criança selecionada do grupo experimental para a pesquisa, realizou-se o preenchimento de uma ficha clínica com dados pessoais do paciente e história médica. A primeira fase da pesquisa constou da obtenção dos espécimes clínicos com a coleta de biofilme das fossas e fissuras pigmentadas de molares decíduos dos pacientes. Realizou-se uma análise qualitativa dos microrganismos bucais por meio do método PCR convencional e uma análise quantitativa dos cocos cariogênicos por "Real

Time PCR". Esses procedimentos foram repetidos após 12 meses. Além dessa fase de coleta de biofilme das fossas e fissuras, procedeu-se ao exame clínico, visual e tátil, das mesmas a fim de se registrar as características clínicas da pigmentação, como: dente pigmentado, superfície dentária acometida, distribuição (parcial ou pontos separados), cor (marrom ou preto), textura (dura ou amolecida), cavitação (ausente ou presente) e tipo de tratamento (monitoramento, selante ou restauração). Fazendo parte também da metodologia dessa pesquisa, foi realizada a radiografia interproximal dos molares decíduos com pigmentação nas fossas e fissuras.

As avaliações clínica e radiográfica foram realizadas no período inicial, aos 6, 12 e 18 meses.

3.3 Local da pesquisa

Este estudo foi realizado com 116 pacientes matriculados na Clínica de Prevenção da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, FOA- UNESP. Dessa clínica fazem parte crianças advindas do programa educativo-preventivo da Bebê-Clínica. Nele, as crianças adentram até os seis meses de vida após os pais assistirem a uma palestra educativa. As consultas são trimestrais e delas fazem parte a educação, voltada para os pais e/ou responsáveis, e as atitudes preventivas, voltadas para as crianças. Ao completarem 3 anos, as crianças são encaminhadas à Clínica de Prevenção da Disciplina de Odontopediatria que dá continuidade a esse programa por meio de orientações periódicas (higiene e dieta), profilaxia profissional e aplicação tópica de flúor até as crianças atingirem 9 anos.

3.4 Grupo amostral

3.4.1 Grupo experimental

Das 500 crianças matriculadas na Clínica de Prevenção no momento da obtenção da amostra, foram selecionadas 63 que possuíam molares decíduos com fossas e fissuras pigmentadas. Essa seleção foi realizada por meio da avaliação do prontuário da criança e confirmada com o exame clínico, visual e tátil, pela pesquisadora responsável.

3.4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes que apresentassem os molares decíduos com as fossas e fissuras pigmentadas nas superfícies oclusal e palatina dos dentes superiores e oclusal e vestibular dos dentes inferiores.

3.4.1.2 Critérios de não inclusão

Considerando-se o exame clínico inicial, foram excluídos do estudo os pacientes que:

- apresentassem lesão de cárie com cavitação em qualquer superfície do dente avaliado;
- apresentassem selante ou restauração na mesma superfície da pigmentação;
- a pigmentação das fossas e fissuras estivesse associada ao uso de produtos odontológicos (solução cariostática);
- e os que por livre e espontânea vontade não desejassem participar da pesquisa.

No total, foram obtidos 155 molares decíduos com as fossas e fissuras pigmentadas para o acompanhamento longitudinal a que se propôs este estudo.

3.4.2 Grupo controle

O grupo controle (GC) foi composto por crianças cuja coleta do biofilme dental foi realizada, exclusivamente, em molares decíduos com fossas e fissuras não pigmentadas. Assim, foram formados dois subgrupos:

1. Composto por 53 pacientes (53 dentes), matriculados na Clínica de Prevenção, sem lesão de cárie dentária e que não possuíam pigmentação nas fossas e fissuras dos molares decíduos.
2. Composto por 37 pacientes (42 dentes), matriculados na Clínica de Prevenção, sem lesão de cárie dentária e que possuíam molares decíduos com pigmentação nas fossas e fissuras.

3.5 Coleta de dados

Este estudo foi composto por uma etapa clínica e outra laboratorial.

3.5.1 Etapa clínica

3.5.1.1 Obtenção dos espécimes clínicos

3.5.1.1.1 Biofilme das fossas e fissuras pigmentadas

Os espécimes clínicos do biofilme microbiano presente no interior das fossas e fissuras pigmentadas foram coletados com auxílio de cones de papel absorvente estéreis friccionados na superfície pigmentada durante 30 segundos. A seguir, os cones eram transferidos para microtubos com água ultrapura Milli-Q (FIGURA 1) e submetidos ao processamento laboratorial para extração do DNA microbiano. Quando não fosse possível a extração imediata do DNA, as amostras clínicas eram mantidas em nitrogênio líquido a -196°C .



Figura 1- Armazenamento e transporte do biofilme das fossas e fissuras pigmentadas em água ultra pura Milli-Q

3.5.1.2 Exame clínico

Após a coleta dos espécimes clínicos, os pacientes selecionados receberam previamente ao exame clínico uma profilaxia dental com pedra pomes e água utilizando-se uma escova de Robinson (Microdont, Micro Usinagem de Precisão Ltda, Socorro, São Paulo, Brasil), acoplada em motor de baixa rotação e contra-ângulo (Dabi Atlante Indústria de Equipamentos Médicos e Odontológicos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) para remoção do biofilme da superfície dentária pigmentada a ser avaliada.

A seguir, realizou-se o exame clínico, visual e tátil, do dente que apresentou a pigmentação com iluminação artificial do campo operatório, espelho clínico (Duflex SSWHITE) e uma sonda exploradora (Duflex N.47 SSWHITE). Essa percorria as fossas e fissuras pigmentadas em um único sentido, apenas uma vez e sem pressão, no intuito de se verificar qualquer cavitação na superfície dentária e evitar danos estruturais à mesma.

Convém salientar que o exame clínico, visual e tátil, foi realizado pela pesquisadora responsável devidamente calibrada com o orientador dessa pesquisa. Essa calibração foi realizada durante três anos com os pacientes da Clínica de Prevenção. Durante a mesma, a pesquisadora e seu orientador observavam, em conjunto, as características clínicas mais comuns dos dentes decíduos com fossas e fissuras pigmentadas: superfície acometida, distribuição- parcial ou pontos separados, cor - marrom ou preto, textura- dura ou amolecida, cavitação- ausente ou presente e tipo de tratamento- monitoramento, selante ou restauração- e as discutiam; chegando a um acordo sobre a designação das mesmas.

Os pacientes tiveram os molares decíduos com a pigmentação nas fossas e fissuras registrados em ficha específica elaborada pelos pesquisadores (ANEXO 3). Essa constava, primeiramente, dos dados gerais do paciente (identificação) e história médica (ingestão de medicamentos e presença de doença crônica e/ou oportunista). A seguir, registravam-se os seguintes dados clínicos:

- data do primeiro diagnóstico do dente com as fossas e fissuras pigmentadas (obtida por meio da avaliação do prontuário);
- data do primeiro exame clínico feito pelo pesquisador;
- o dente pigmentado;
- a superfície dentária acometida;
- a distribuição da pigmentação (parcial ou pontos separados); (FIGURAS 2 e 3)
- a cor (marrom ou preto); (FIGURAS 4 e 5)
- a textura (dura ou amolecida);
- a cavitação (ausente ou presente) e (FIGURAS 6 e 7)
- o tipo de tratamento (monitoramento, selante ou restauração).

As avaliações clínicas foram realizadas em intervalos de 6 meses, durante um período de 18 meses. Desse modo, totalizaram-se quatro períodos de avaliação clínica (0, 6, 12 e 18 meses).



Figura 2- Segundo molar decíduo inferior direito com pigmentação distribuída de modo **parcial** na superfície vestibular



Figura 3- Primeiro molar decíduo superior direito com pigmentação distribuída de modo **pontos separados** na superfície oclusal



Figura 4- Segundo molar decíduo superior direito com pigmentação na cor **marrom** nas superfícies oclusal e palatina



Figura 5- Segundo molar decíduo inferior esquerdo com pigmentação na cor **preto** na superfície oclusal

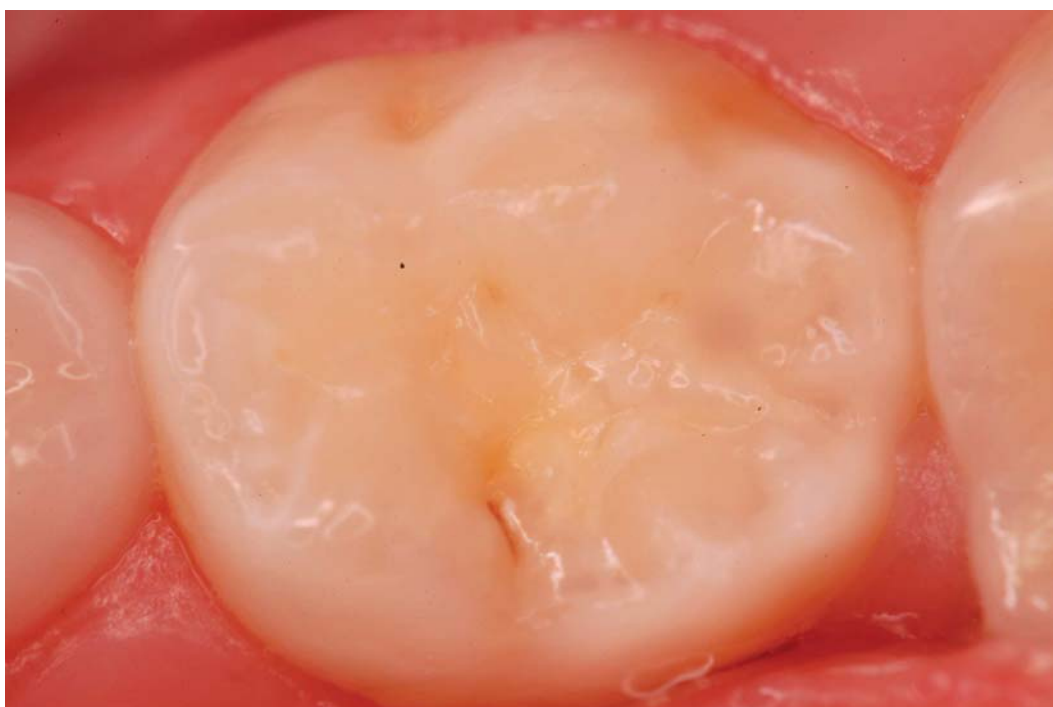


Figura 6- Segundo molar decíduo inferior direito com pigmentação na superfície oclusal e **ausência de cavitação**



Figura 7- Segundo molar decíduo inferior esquerdo com pigmentação na superfície oclusal e **presença de cavitação**

3.5.1.3 Exame radiográfico

Realizou-se o exame radiográfico interproximal dos molares decíduos com fossas e fissuras pigmentadas logo após a coleta dos espécimes clínicos e do exame clínico dental aos 0, 6, 12 e 18 meses de avaliação.

Para a obtenção das radiografias interproximais, foi utilizado o aparelho Spectro II (Dabi Atlante), filme radiográfico Kodak INSIGHT - Eastman Kodak Company, New York, USA - com tempo de exposição de 0,5 segundos. As radiografias foram posicionadas com o auxílio de um posicionador radiográfico interproximal infantil (INDUSBELLO Ind. de Instrumentos Odontológicos Ltda, Londrina, Paraná, Brasil). O procedimento de revelação e fixação das mesmas foi realizado de acordo com o método temperatura-tempo (QUADRO 1).

Quadro 1- Protocolo empregado para revelação e fixação das radiografias

Revelação	Lavagem intermediária	Fixação	Lavagem final
Revelador Kodak GBX	Imersão em água corrente	Fixador Kodak GBX	Lavar em água corrente
Temperatura/tempo 20°C / 5 min 21°C / 4:30 min 22°C / 4 min 24,5°C / 3min 26,5°C / 2:30 min	Temperatura 15,5 – 29,5 °C Tempo Agitação constante	Temperatura 15,5 – 29,5 °C Tempo 2-4 minutos	Temperatura 15,5– 29,5 °C Tempo 10 minutos

As radiografias obtidas foram avaliadas por dois examinadores calibrados entre si e com orientador dessa pesquisa. Frisa-se que as avaliações radiográficas foram realizadas de maneira independente, ou seja, cada examinador observou as radiografias sem a presença do outro. Essa calibração compreendeu a visualização de uma série de radiografias de dentes com fossas e fissuras pigmentadas em que se dirimiam as dúvidas e, se necessário, a complementação se dava pela verificação do aspecto clínico do dente.

Caso houvesse desacordo entre as examinadoras em relação a algum desses itens, a dúvida era sanada com o professor orientador e, se necessário, com a observação das características clínicas registradas para o dente em análise.

Um negatoscópio e uma lupa estereoscópica de mão (20X/ 20mm) (FIGURAS 8 e 9) foram utilizados para auxiliar a análise das radiografias, realizada em uma sala escura e com o auxílio de uma máscara de cartolina preta com abertura apenas para se colocar a radiografia interproximal (FIGURA 10).

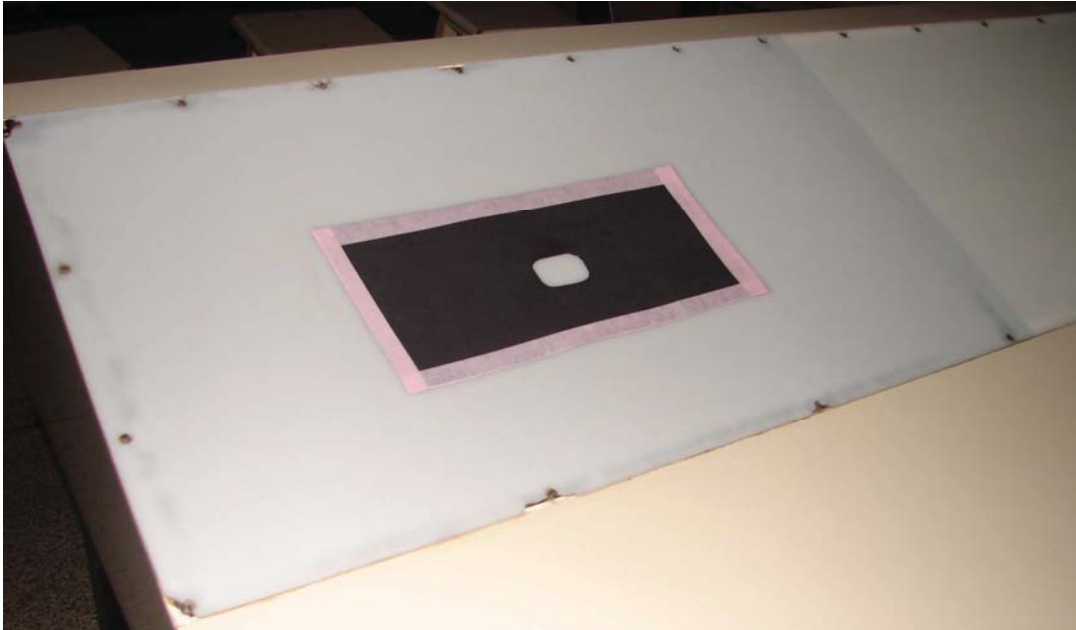


Figura 8- Negatoscópio com a máscara de cartolina



Figura 9- Lupa estereoscópica de mão (20X/ 20mm)



Figura 10- Máscara de cartolina preta com abertura apenas para se colocar a radiografia interproximal

Para a análise das radiografias interproximais foi empregado o critério estipulado por Tovo (1996), o qual avaliou a ausência ou presença de radiotransparência e o tecido dentário acometido (esmalte ou dentina), como observado no quadro 2.

Quadro 2- Escores utilizados para a análise das radiografias interproximais

Escore	Critério
0	Ausência de radiotransparência
1	Radiotransparência em esmalte
2	Radiotransparência em dentina

Ressalta-se que a avaliação radiográfica foi efetuada em duplicata, sendo que a primeira avaliação foi realizada uma semana após o

encerramento do período de avaliação (18 meses). A segunda avaliação se repetiu uma semana após a realização da segunda.

Para a avaliação de 354 radiografias interproximais os examinadores necessitaram de cinco dias, sendo que em cada período foram utilizadas duas horas de avaliação radiográfica.

3.5.2 Etapa laboratorial

3.5.2.1 Extração do DNA bacteriano e determinação de sua concentração

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água Milli-Q era extraído através do "kit" QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Cada amostra era adicionada a 20µL de proteinase K, seguida de 200µL do tampão AL, mantendo-se a mistura a 56°C, por 10 minutos, adicionando-se, a seguir, etanol absoluto (200 µL) e centrifugando-se o conjunto através do "QIAamp Column" a 6000xg, por 1 minuto.

A seguir, desprezava-se o filtrado e eram adicionados 500 µL do tampão AW1 e repetia-se a centrifugação, desprezando-se, novamente, o filtrado. Imediatamente, 500 µL do tampão AW2 eram adicionados ao "QIAamp Column" e o conjunto era centrifugado a 20.000xg por 3 minutos. Desprezava-se o filtrado, enquanto 200 µL de tampão AE eram adicionados ao "QIAamp Column", por 1 minuto, antes de submeter o conjunto à centrifugação final a 6000xg, por 1 minuto. O filtrado era mantido a -196°C. As concentrações dos DNAs bacterianos eram determinadas em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-640), com leitura de absorbância (A_{260nm}).

3.5.2.2 Detecção de microrganismos bucais por PCR convencional

A presença de *Actinomyces* sp., *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*

foi realizada pela amplificação do DNA por PCR convencional, empregando-se iniciadores específicos previamente descritos na literatura (ASHIMOTO et al., 1996; DOAN et al., 2000; AVILA-CAMPOS; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2002; XIA; BAUMGARTNER, 2003). A presença de DNA microbiano foi avaliada por meio de PCR empregando-se iniciadores universais dirigidos especificamente para áreas conservadas dos genes que codificam para o 16S rRNA das eubactérias.

Os iniciadores utilizados nas reações de amplificação do DNA envolvendo PCR convencional, bem como sua temperatura de anelamento, são apresentados no Quadro 3.

Quadro 3- Iniciadores específicos utilizados nos ensaios de PCR convencional

Iniciadores específicos	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
<i>Actinomyces</i> sp.	5'-GGC KTG CGG TGG GTA CGG GC-3' 5'-GGC TTT AAG GGA TTC GCT CCR CCT CAC-3'	60°C
<i>A. israelii</i>	5'-GGT CTG CCT TGT TTT TTG CGG GGT GGG-3' 5'-CAT AAC CCG GCT ACC GTC AAC C-3'	60°C
<i>A. naeslundii</i>	5'-GCG CCT TTT TTG GTG TTT TTG G-3' 5'-CAC CCA CAA ACG AGG CAG GCC TG-3'	60°C
<i>A. viscosus</i>	5'-GTG AAG GAG CCA GCT TGC TGG TTC TG-3' 5'-CGG AAC AAA CCT TTC CCA GGC-3'	60°C
<i>C. rectus</i>	5'- TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC-3' 5'- TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT-3'	55°C
<i>E. corrodens</i>	5'- CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G-3' 5'- CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C-3'	45°C
<i>F. nucleatum</i>	5'-ATT GTG GCT AAA ATT ATA GTT-3' 5'-ACC CTC ACT TTG AGG ATT ATA G-3'	40°C
<i>P. micra</i>	5'-GGT CAA AGA TTT ATC GGT GTA-3' 5'-CCT CTC AGA CCG GCA ACT G-3'	58°C
<i>P. gingivalis</i>	5'-TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA CC-3' 5'-ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC-3'	60°C
<i>P. endodontalis</i>	5'-GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC-3' 5'-CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC-3'	60°C
<i>P. intermedia</i>	5'-TTT GTT GGG AGT AAA GCG GG-3' 5'-TTC AAC ATC TCT GTA TCC TGC GT-3'	55°C
<i>P. nigrescens</i>	5'-ATG AAA CAA AGG TTT CCG GTA AG-3' 5'-CCA CGT CTC TGT GGC TGC GA-3'	55°C
Universal	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG-3' 5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'	55°C

3.5.2.3 Reação de amplificação do DNA por PCR convencional

A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 μ l, contendo 2,5 μ l de 10 X tampão PCR, 1,25 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 2,0 μ l de dNTP (10 mM), 0,25 μ l de Taq DNA polimerase (0,5 U), 1,0 μ l de cada iniciador (0,4 M), 7 μ l de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 μ l de DNA (ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) (FIGURA 11) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); 30-36 ciclos de 94°C (30s- 1 min.), temperatura de anelamento de cada iniciador (30s -2 min.), 72°C (30s-1 min.) e um ciclo final de 72°C (5 min.), para a elongação final das cadeias de DNA dos amplicons.



Figura 11- Aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400)

Em todas as reações foram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência dos microrganismos estudados. Os produtos da amplificação pelo PCR eram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (FIGURA 12), corados com brometo de etídio (0,5 (g/ml) e fotografados sobre transiluminador com luz ultra-violeta com câmera Sony Cybershot 12.0 (FIGURA 13). Como padrão de peso molecular utilizou-se o marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP) (FIGURA 14).



Figura 12- Eletroforese em gel de agarose a 1%

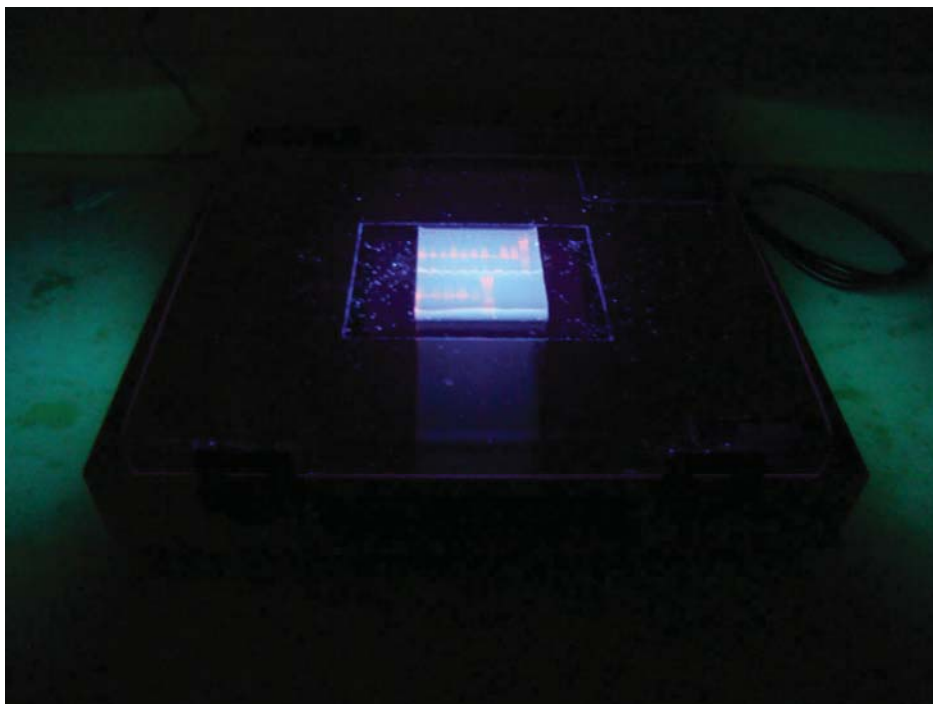


Figura 13- Transiluminador com luz ultra-violeta

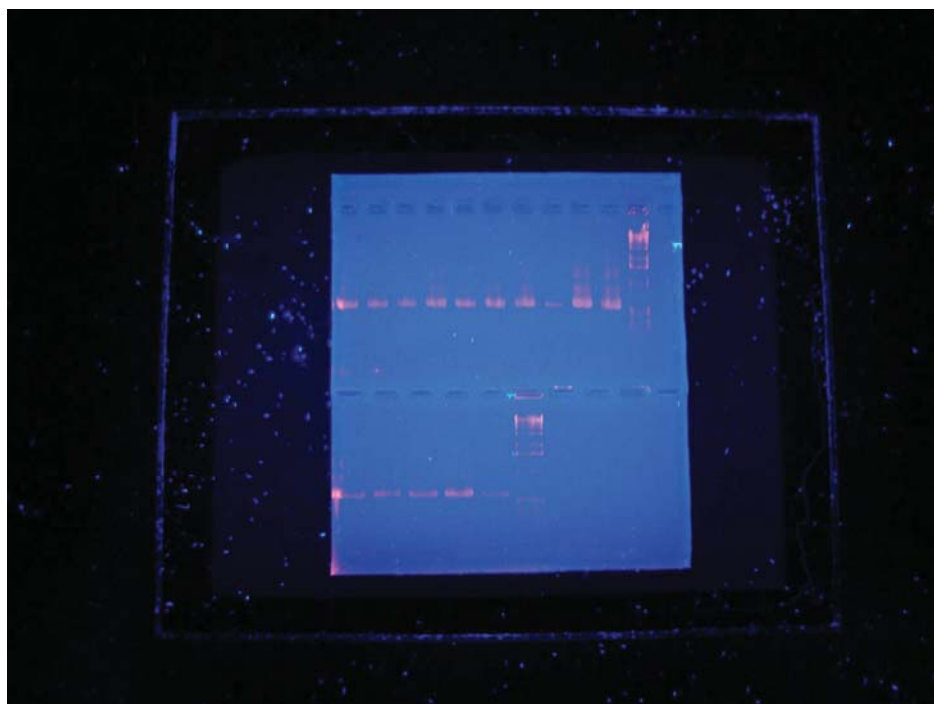


Figura 14- Marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP)

3.5.2.4 Análise quantitativa da presença de cocos cariogênicos por "Real-Time PCR"

A presença e a quantificação de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* foi avaliada através de Real-Time PCR, empregando-se, para tanto, iniciadores, sondas e condições de amplificação específicas descritas por Yoshida et al. (2003). Foram utilizados iniciadores e sondas cujas sequências foram baseadas nos genes que codificam para enzima glicosil transferase, específicas para *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Os oligonucleotídios universais utilizados para quantificar o total de microrganismos presentes nas amostras e para verificar a existência de DNA microbiano em condições de ser amplificado, são derivados de sequências de genes que codificam para o 16S rRNA. As sequências dos oligonucleotídeos são apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4- Iniciadores e sondas específicas empregados nas reações com o Real-Time PCR

Iniciadores específicos	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
<i>S. mutans</i>	5'-GCC TAC AGC TCA GAG ATG CTA TTC T-3' 5'-GCC ATA CAC CAC TCA TGA ATT GA-3' 5'- GGA AAT GAC GGT CGC CGT TAT GAA-3' (sonda)	55°C
<i>S. sobrinus</i>	5'-TTC AAA GCC AAG ACC AAG CTA GT-3' 5'-CCA GCC TGA GAT TCA GCT TG T-3' 5'-CCT GCT CCA GCG ACA AAG GCA GC- - 3' (sonda)	55°C
Bactérias totais	5'-TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A -3' 5'-TGC GGG ACT TAA CCC AAC A -3' 5'-CAC GAG CTG ACG ACA (AG)C CAT GCA -3'(sonda)	58°C

A sonda fluorescente que foi utilizada no sistema TaqMan é marcada no sentido 5(com 6-carboxifluoresceína (reporter dye) e no sentido 3(com 6-carboxitetrametilrodamina (quencher dye). A emissão fluorescente desse sistema TaqMan depende de uma sonda (equivalente a um terceiro iniciador) que anela especificamente entre os dois iniciadores utilizados, o que torna o processo mais preciso e específico. Além desse aspecto, só há a detecção da amplificação quando existirem sítios de anelamento tanto para o par de iniciadores como para a sonda.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µl, contendo 1X Master Mixture TaqMan Universal (tampão PCR, dNTP, AmpliTaq Gold, sinal de referência interno, [6-carboxi-(x(-rodamina], uracil N-glicosidase-UNG, MgCl₂; Applied Biosystem, Foster City, Calif), 900 nM de cada iniciador, 200 nM da sonda e 5 (l do DNA. As curvas-

padrão foram construídas a partir de diluições conhecidas de DNA.

As reações de amplificação foram realizadas em volumes finais de 25 µl, contendo 1X Master Mixture TaqMan Universal (tampão PCR, dNTP, AmpliTaq Gold, sinal de referência interno, [6-carboxi-(x(-rodamina], uracil N-glicosidase-UNG, MgCl₂; Applied Biosystem, Foster City, Calif), 900 nM de cada iniciador, 200 nM da sonda e 5 l do DNA. As curvas-padrão foram construídas a partir de diluições conhecidas de DNA de amostras de referência (*S. mutans* ATCC 1910 e *S. sobrinus* ATCC 27607). Essas reações de amplificação foram realizadas em aparelho Rotorgene 600 (Corbett Life Science, Mortlake, New South Wales, Australia). As condições dos ensaios realizados consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C, por 10 minutos, seguida de 60 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 1 minuto. A curva "threshold" (CT) foi definida como o ciclo no qual a fluorescência tornou-se detectável acima da fluorescência de fundo e inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias empregado.

3.6 *A* análise estatística

A presente análise foi realizada utilizando o software Statistica versão 9 (Stat Soft Inc, 1984-2010). Uma análise descritiva foi realizada, inicialmente, para descrever a amostra e caracterizar a associação entre variáveis independentes (sexo, idade) e dependentes (dentes pigmentados e características da pigmentação).

A análise de variância com comparações par a par foi usada para verificar diferenças entre as observações entre dentes (54, 55, 64, 65, 74, 75, 84, 85), no que compete à cor, textura, distribuição, superfície, cavidade e tratamento. Além disso, foi realizada uma análise destas variáveis e suas relações com tempo de observação, idade e sexo dos pacientes observados. Para isto, foram utilizados os testes do qui-quadrado e de correlação linear para avaliar os resultados obtidos.

A distribuição dos microrganismos alvos nos pacientes dos diferentes grupos foi analisada através do teste de análise de variância de medidas repetidas para dados categóricos (ANOVA_{mr}), como descrito por Brunner e Langer (2000), enquanto o biofilme de estreptococos cariogênicos em crianças foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As variáveis clínicas dos dentes com fossas e fissuras pigmentadas dos pacientes foram avaliadas através do teste do qui-quadrado. Adotou-se o nível de significância de 5%.

As figuras e tabelas referentes a essas análises encontram-se agrupadas no anexo 4.

Resultado

4 Resultado

4.1 Dados gerais do grupo amostral

Inicialmente, são apresentados os dados relativos ao perfil geral do grupo amostral.

A amostra foi composta por 116 pacientes, sendo 69 (59,48%) do gênero feminino e 47 (40,52%) do gênero masculino. Essa distribuição dos integrantes evidencia que esse grupo acompanhou a curva de normalidade, mostrando uma homogeneidade satisfatória quanto ao fator gênero (FIGURA 15).

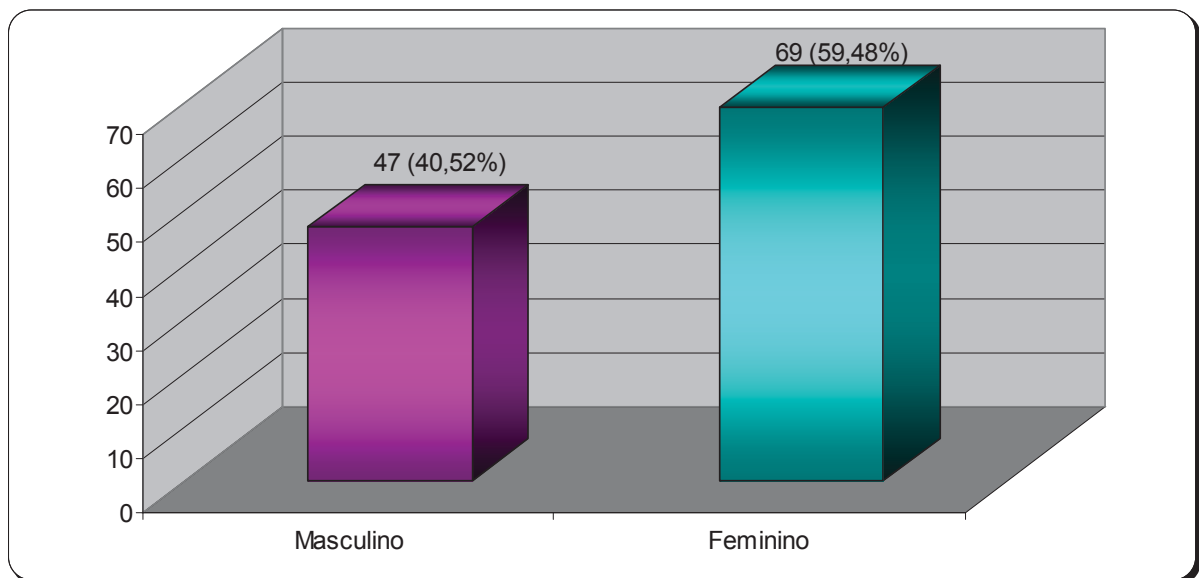


Figura 15- Distribuição do número do grupo amostral de acordo com o gênero

A figura 16 ilustra a distribuição dos integrantes do grupo experimental de acordo com sua idade, a qual variou de 3 a 10 anos, com média de 7,87 e mediana 8 anos. Os dados são apresentados em termos de número absoluto de indivíduos, em determinada faixa etária, e o percentual que a mesma representava na amostra.

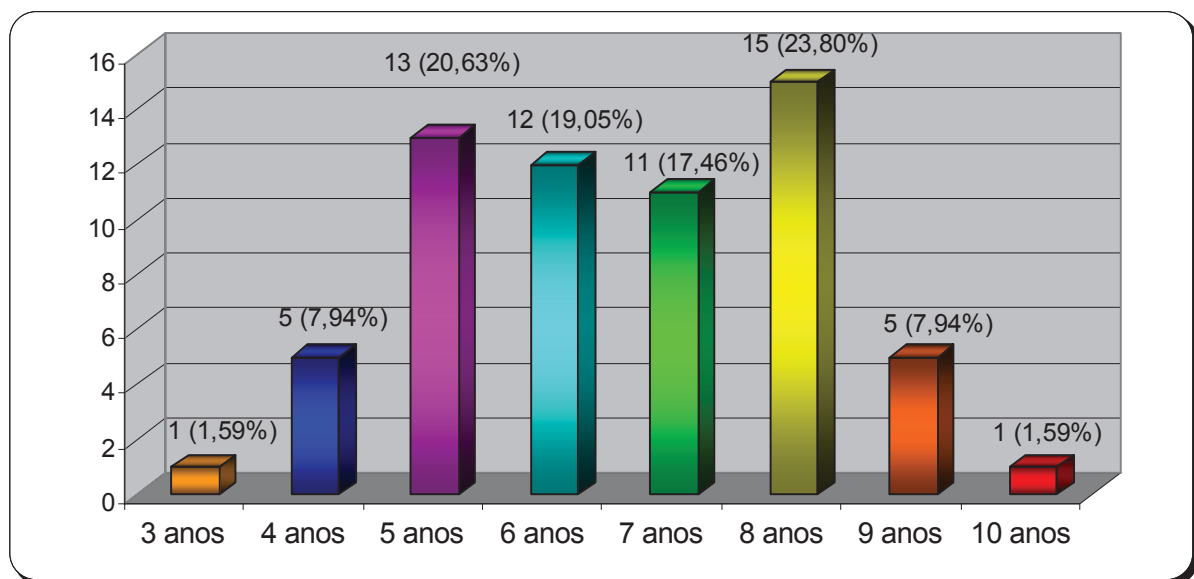


Figura 16- Distribuição do número e da porcentagem do grupo experimental de acordo com a sua idade

A distribuição desses integrantes mostra-se dentro da curva de normalidade, quanto ao fator idade, evidenciando pequeno desvio padrão e ressaltando a homogeneidade geral da amostra.

Os resultados apresentados evidenciam que o grupo experimental submetido aos exames clínicos iniciais apresentou boa homogeneidade em termos de idade e gênero, sendo que não foram observadas diferenças de idade entre os gêneros, garantindo os critérios de homocedasticidade.

Em relação aos dados obtidos da história médica do paciente, a figura 17 ilustra a distribuição do número e da porcentagem dos pacientes do grupo experimental de acordo com a presença ou não de doença crônica e/ou oportunista.

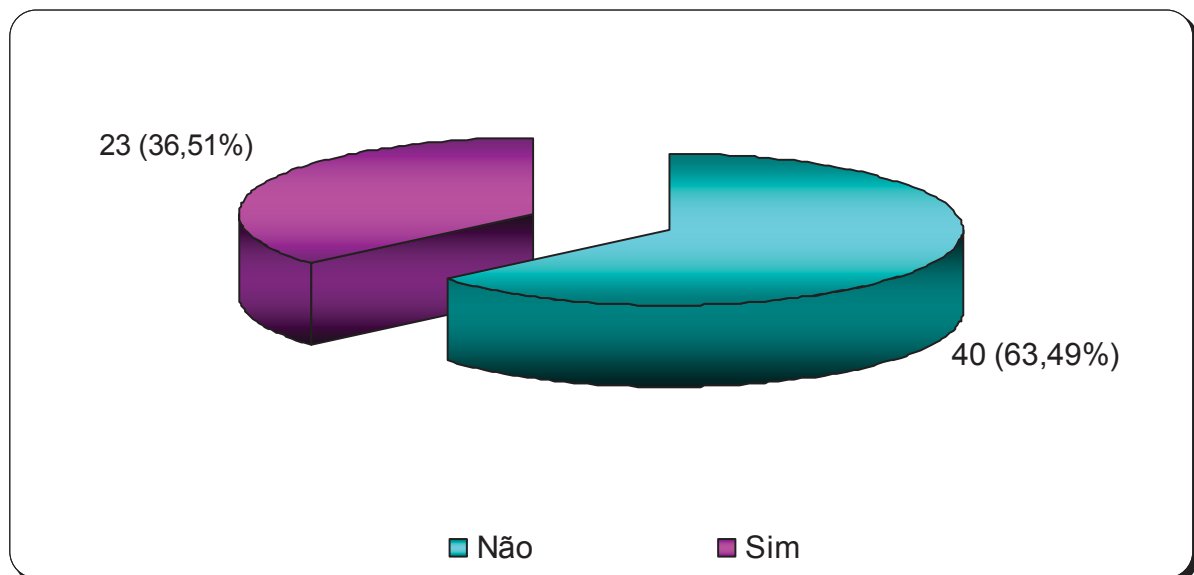


Figura 17- Distribuição do número e da porcentagem dos pacientes do grupo experimental de acordo com a presença ou não de doença crônica e/ou oportunista

Observou-se que 40 (63,49%) crianças não apresentavam nenhum tipo de doença crônica e/ou oportunista, ao passo que 23 (36,51%) a possuíam e, de forma geral, faziam a ingestão de algum tipo de medicamento.

A figura 18 ilustra a distribuição do número e da porcentagem de crianças que utilizavam ou não de medicamentos no momento da anamnese ou até trinta dias anteriores à mesma.

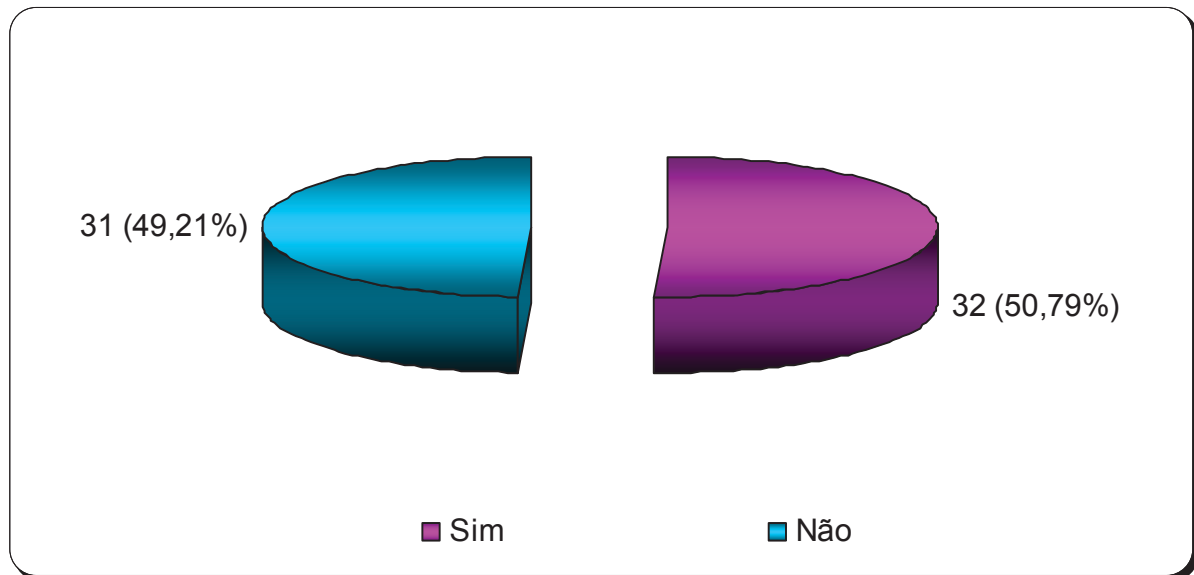


Figura 18- Distribuição do número e da porcentagem da utilização ou não de medicamento pela criança

Observou-se que 31 (49,21%) crianças não estavam ingerindo medicamento e 32 (50,79%) haviam ingerido algum tipo. Esse variou de antibiótico, particularmente amoxicilina, analgésico, antiinflamatório, vitaminas e complexos polivitamínicos, expectorante, anti-histamínico, sulfato ferroso, anticonvulsivante, estimulante de apetite, broncodilatadores, anti-helmíntico e anti-hipertensivo.

4.2 Perfil clínico da pigmentação dentária das fossas e fissuras

Os dados apresentados a seguir se referem às características clínicas da pigmentação dentária das fossas e fissuras, divididas em:

- 4.2.1) Dente acometido;
- 4.2.2) Superfície dentária acometida;
- 4.2.3) Distribuição na superfície (parcial ou pontos separados);
- 4.2.4) Cor (preto ou marrom);
- 4.2.5) Cavitação (ausente ou presente);
- 4.2.6) Textura (dura ou amolecida);
- 4.2.7) Tratamento (monitoramento, selante ou restauração).

4.2.1 Dente acometido

A figura 19 ilustra a distribuição do número e da porcentagem dos dentes acometidos pela pigmentação nas fossas e fissuras.

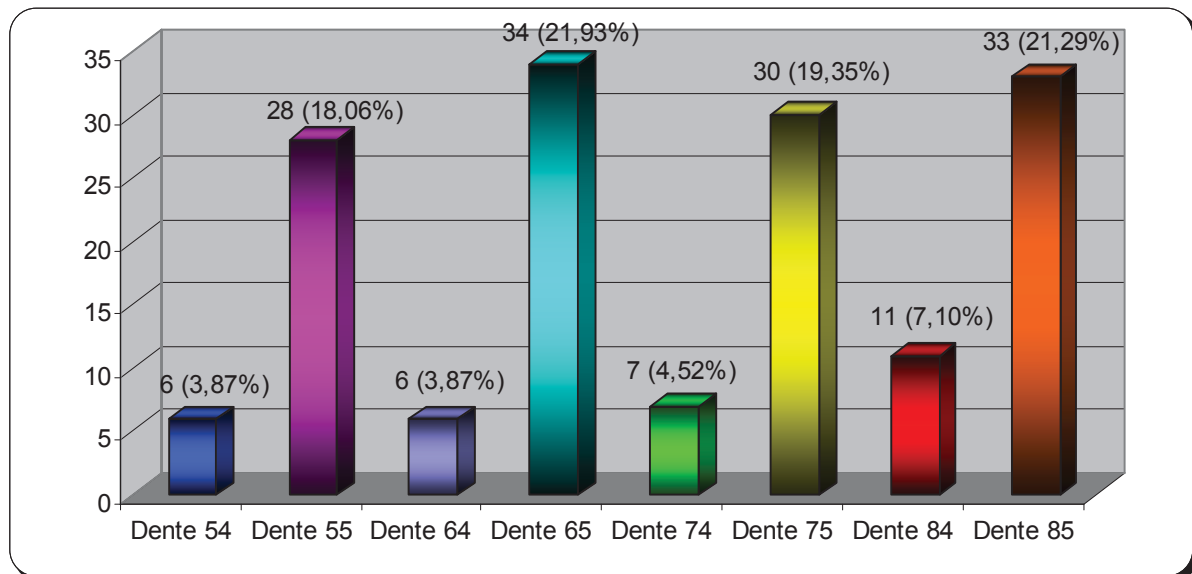


Figura 19- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes que apresentavam pigmentação nas fossas e fissuras

Pôde-se observar que os dentes 65 (21,93%), 85 (21,29%), 75 (19,35%) e 55 (18,06%) foram os que apresentaram a maior frequência de pigmentação nas fossas e fissuras, evidenciando um predomínio significativo dos segundos molares decíduos ($p < 0,01$).

A figura 20 ilustra a distribuição do número e da porcentagem de um agrupamento desses dentes acometidos pela pigmentação nas fossas e fissuras em primeiros e segundos molares.

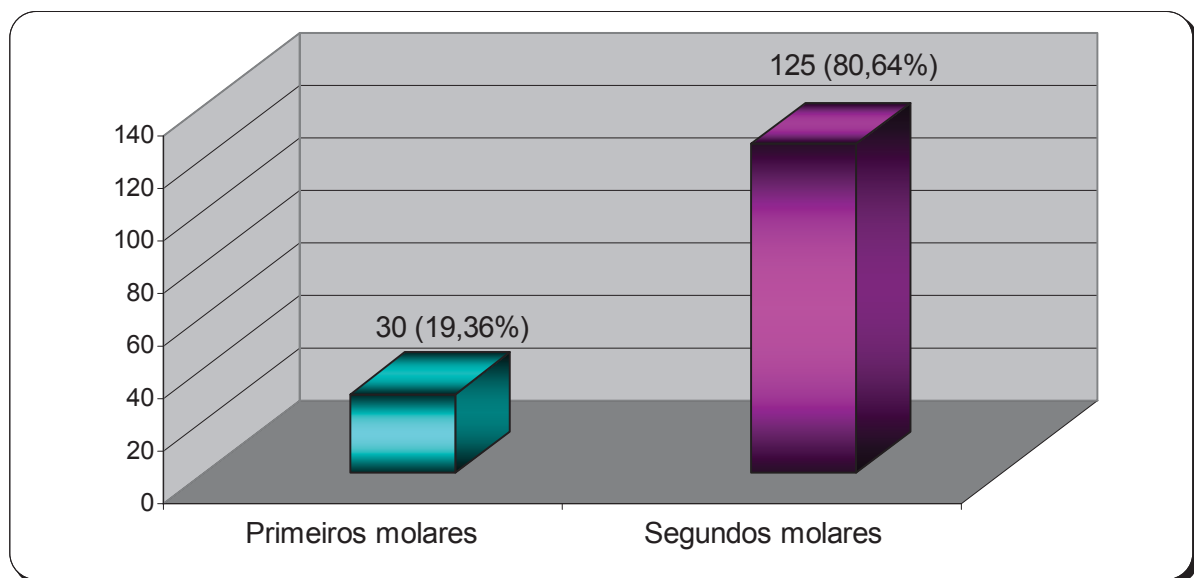


Figura 20- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras de acordo com o agrupamento em primeiros e segundos molares

Notou-se que 125 (80,64%) dos 155 dentes com pigmentação nas fossas e fissuras foram os segundos molares.

A figura 21 ilustra a distribuição do número e da porcentagem de outro agrupamento dos dentes acometidos pela pigmentação, de acordo com o arco superior ou inferior.

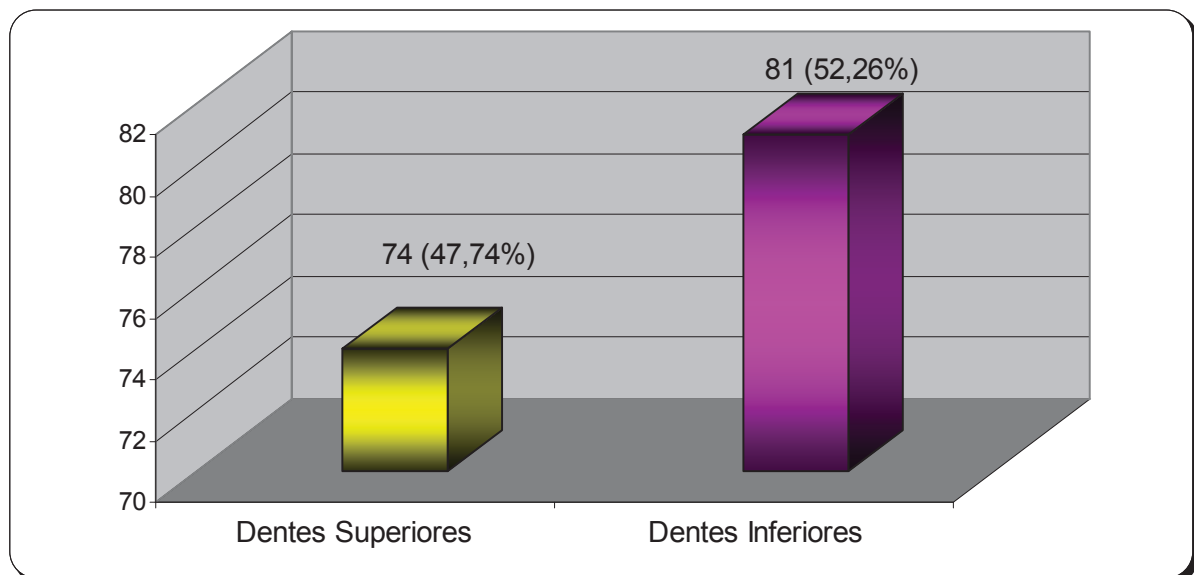


Figura 21- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras de acordo com o arco superior ou inferior

Desse modo, observou-se que 81 (52,26%) dentes se situavam no arco inferior e 74 (47,74%) no arco superior, ressaltando o fato de que a ocorrência de fossas e fissuras pigmentadas não apresenta predileção por maxila ou mandíbula.

4.2.2 Superfície dentária acometida

A figura 22 ilustra a distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a superfície dentária acometida pela pigmentação nas fossas e fissuras.

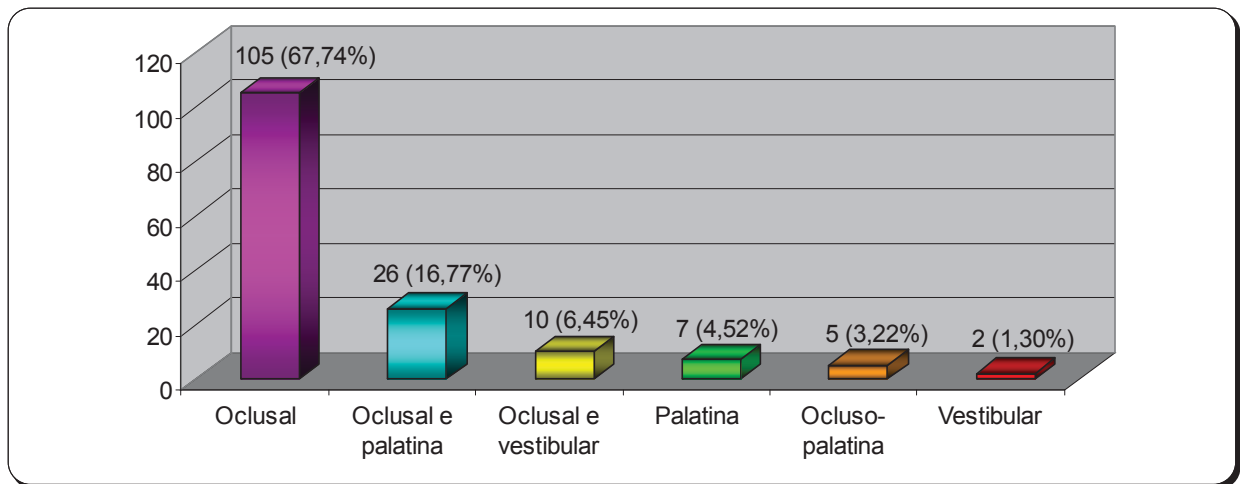


Figura 22- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a superfície dentária em que ocorreu a pigmentação nas fossas e fissuras

O envolvimento de uma única superfície dental foi detectado em 114 (73,55%) dentes, enquanto a distribuição em duas superfícies pôde ser descrita em 41 (26,45%) dentes. Notou-se que a superfície dentária mais acometida pela pigmentação foi a oclusal (105; 67,74%), seguida da oclusal e palatina (26; 16,77%), oclusal e vestibular (10; 6,45%), palatina (7; 4,52%), ocluso-palatina (5; 3,22%) e vestibular (2; 1,30%). A predominância da superfície oclusal foi significativa para todos os dentes envolvidos (com exceção do 55- superfície oclusal e palatina: teste de Komolgorov-Smirnov, $p < 0,01$; teste de Lilliefors, $p < 0,01$).

As figuras 23 e 24 representam um detalhamento dos dados apresentados na figura 22. Observa-se, na figura 23, que nos casos de pigmentação envolvendo uma única superfície dentária, destaca-se nitidamente a superfície oclusal. E ainda que 105 (92,10%) dos 155 dentes avaliados apresentaram a pigmentação na superfície oclusal, seguida da palatina (7; 6,14%) e da vestibular (2; 1,76%). Pela figura 24, verifica-se que a maioria dos casos de pigmentação que se distribui por duas superfícies dentárias está localizado nas superfícies oclusal e palatina.

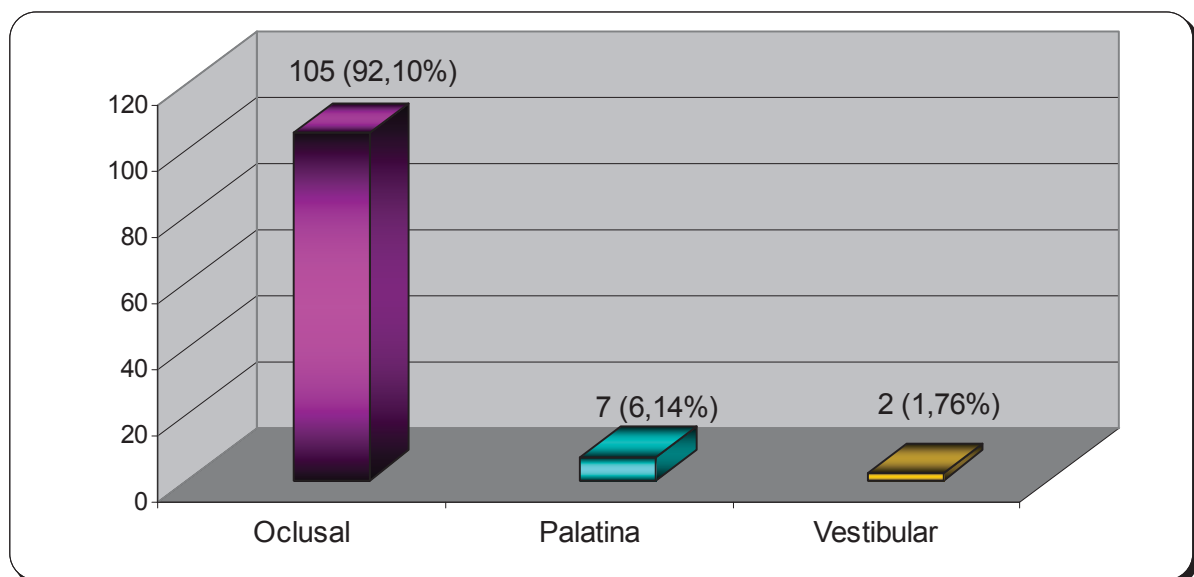


Figura 23- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a pigmentação das fossas e fissuras em uma superfície dentária

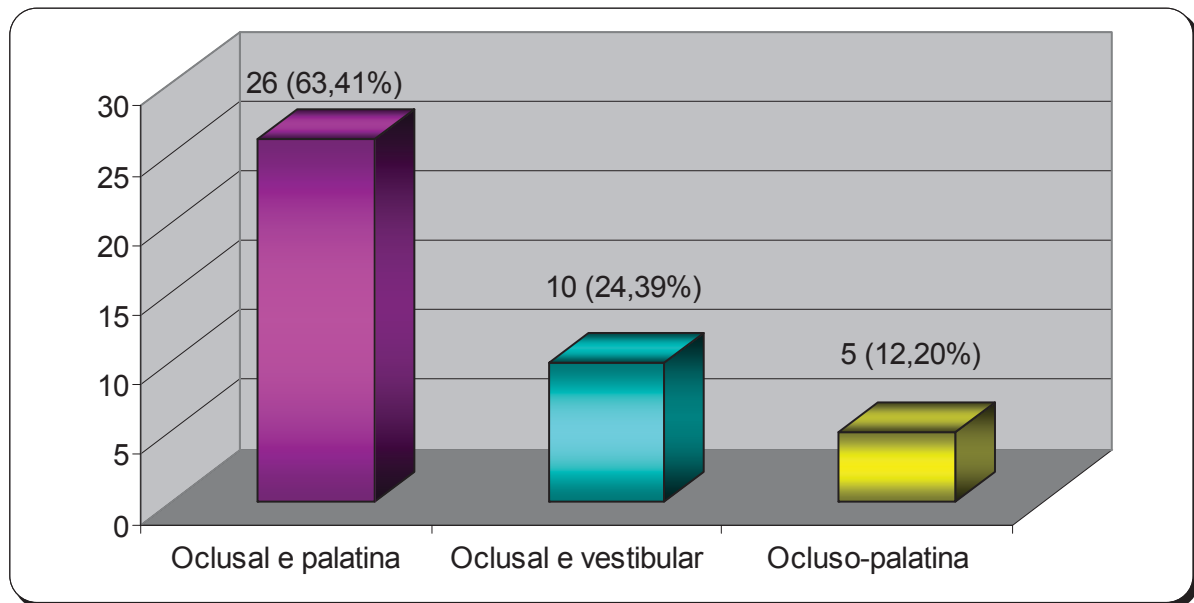


Figura 24- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a pigmentação das fossas e fissuras em duas superfícies dentárias

Observou-se que 26 (63,41%) dentes apresentaram a pigmentação na superfície oclusal e palatina, seguida da oclusal e vestibular (10; 24,39%) e ocluso-palatina (5; 12,20%).

A tabela 1 apresenta a distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a superfície dentária acometida pela pigmentação nas fossas e fissuras em todos os períodos de avaliação clínica.

Tabela 1- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a superfície dentária acometida pela pigmentação nas fossas e fissuras aos 0, 6, 12 e 18 meses

SUPERFÍCIE	TEMPO DE ACOMPANHAMENTO EM MESES N (%)			
	0	6*	12**	18***
Oclusal	105 (67,74%)	96 (69,56%)	86 (67,72%)	71 (68,27%)
Oclusal e palatina	26 (16,77%)	24 (17,39%)	23 (18,11%)	20 (19,23%)
Oclusal e vestibular	10 (6,45%)	9 (6,52%)	9 (7,09%)	8 (7,69%)
Palatina	7 (4,52%)	4 (2,90%)	4 (3,15%)	2 (1,92%)
Ocluso-palatina	5 (3,22%)	4 (2,90%)	4 (3,15%)	2 (1,92%)
Vestibular	2 (1,13%)	1 (0,73%)	1 (0,78%)	1 (0,97%)
Total	155 (100,0%)	138 (100,0%)	127 (100,0%)	104 (100,0%)

* Dezessete dentes foram tratados/ **Onze dentes foram tratados/ *** Seis dentes foram tratados, nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito dentes esfoliaram.

Observou-se que, durante os 18 meses de avaliação, houve um decréscimo de dentes com a superfície pigmentada, sendo mais acentuado em relação à superfície oclusal (34 dentes), seguida oclusal e palatina (6

dentes), palatina (5 dentes), ocluso-palatina (3 dentes), oclusal e vestibular (2 dentes) e vestibular (1 dente).

Esse decréscimo da amostra ocorreu devido à necessidade de tratamento invasivo de 34 dentes. Desses, 17 foram tratados aos 6 meses de avaliação, 11 aos 12 meses e 6 aos 18 meses. Nove (9) dentes não foram examinados devido à desistência de pacientes da pesquisa e 8 dentes esfoliaram.

4.2.3 Distribuição na superfície

A figura 25 ilustra a distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com o modo de distribuição da pigmentação das fossas e fissuras na superfície dentária.

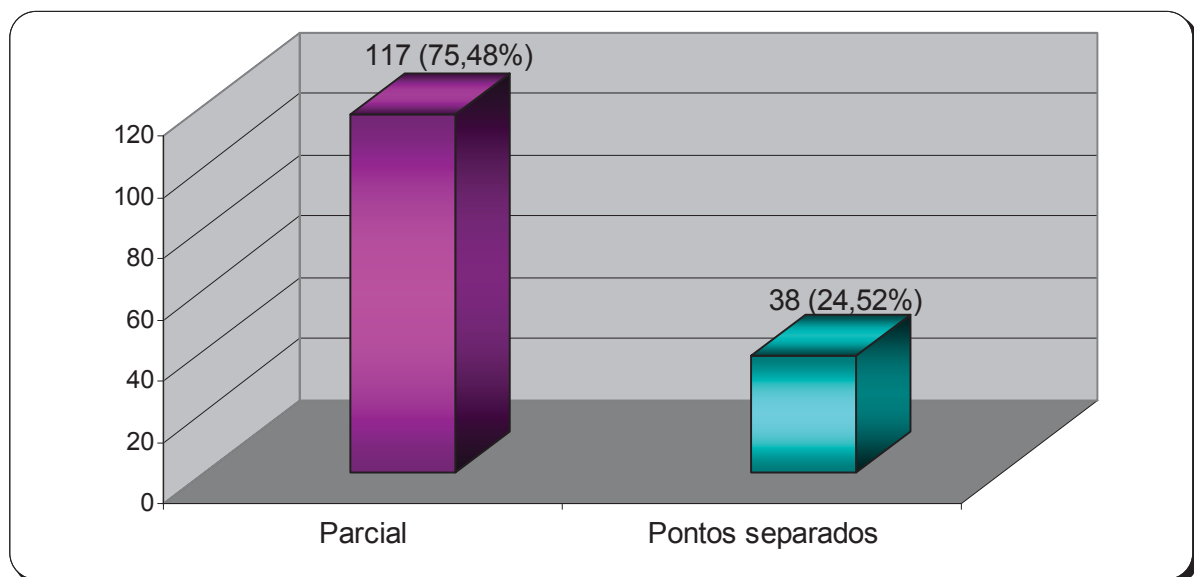


Figura 25- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com o modo de distribuição da pigmentação das fossas e fissuras na superfície dentária

Notou-se que 117 (75,48%) dentes apresentaram a pigmentação das fossas e fissuras distribuída de modo parcial, ao passo que 38 (24,52%) apresentaram a pigmentação distribuída na forma de pontos separados.

Para os segundos molares decíduos, o predomínio do padrão parcial de distribuição foi universal, independentemente do teste estatístico utilizado ($p < 0,01$). Para os primeiros molares decíduos, a predominância do padrão parcial de distribuição também foi observada, mas com menor significância (com valores de p variando entre $p < 0,05$ a $p < 0,01$ para o teste de Lilliefors).

Ressalta-se que um achado clínico de importância nesse estudo é que não foi encontrado em dente algum a pigmentação em todo o sistema de fossas e fissuras.

A tabela 2 apresenta a distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com o modo de distribuição da pigmentação das fossas e fissuras na superfície dentária em todos os períodos de avaliação clínica.

Tabela 2- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com o modo de distribuição da pigmentação das fossas e fissuras aos 0, 6, 12 e 18 meses

DISTRIBUIÇÃO	TEMPO DE ACOMPANHAMENTO EM MESES			
	N (%)			
	0	6*	12**	18***
Parcial	117 (75,48%)	107 (77,54%)	102 (80,31%)	82 (78,85%)
Pontos separados	38 (24,52%)	31 (22,46%)	25 (19,69%)	22 (21,15%)
Total	155 (100,0%)	138 (100,0%)	127 (100,0%)	104 (100,0%)

* Dezessete dentes foram tratados/ **Onze dentes foram tratados/ *** Seis dentes foram tratados e nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito dentes esfoliaram.

Observou-se que no decorrer de 18 meses de avaliação, houve um decréscimo no número de dentes que apresentavam quaisquer um dos padrões de distribuição descritos no presente estudo, mas essa redução não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Ao longo desse período de tempo, observou-se uma redução de 35 dentes no total de elementos dentários acometidos pelo padrão parcial, enquanto, para o padrão de pontos separados, a redução foi de 16 dentes.

4.2.4 Cor

A figura 26 ilustra a distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a cor da pigmentação das fossas e fissuras.

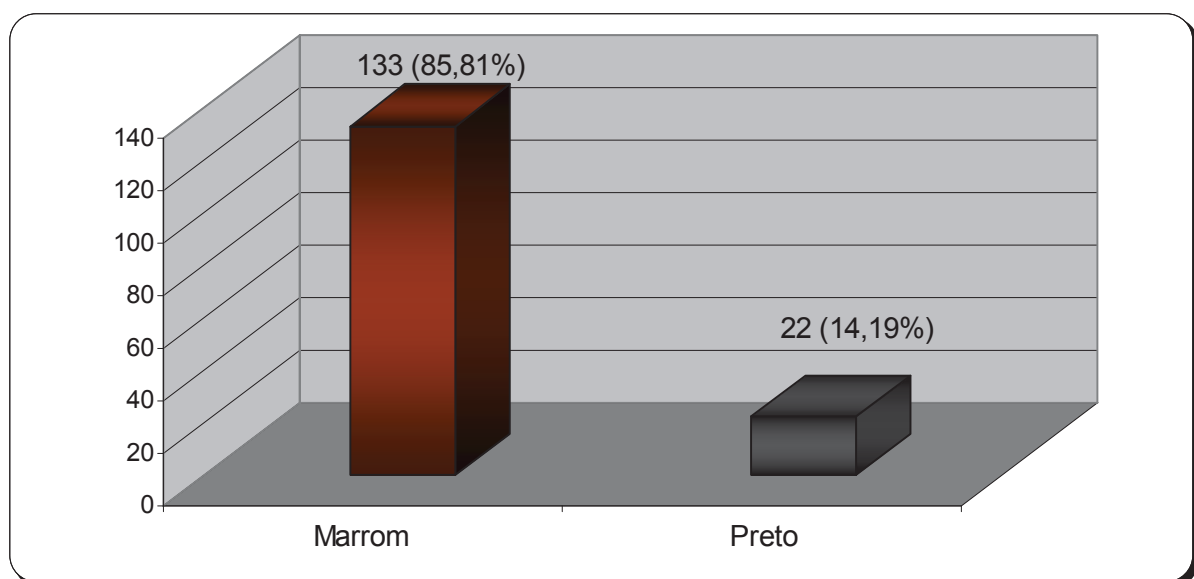


Figura 26- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a cor da pigmentação das fossas e fissuras

Observou-se que 133 (85,81%) dentes possuíam a pigmentação na cor marrom, enquanto 22 (14,19%) a possuíam na cor preto. Essa predominância da cor marrom foi estatisticamente significativa para os

testes aplicados ($p < 0,01$), mas não apresentou quaisquer associações com outros parâmetros; como cavitação, localização e distribuição ou microbiológicos.

A tabela 3 apresenta a distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a cor da pigmentação das fossas e fissuras em todos os períodos de avaliação clínica.

Tabela 3- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a cor da pigmentação das fossas e fissuras aos 0, 6, 12 e 18 meses

COR	TEMPO DE ACOMPANHAMENTO EM MESES			
	N (%)			
	0	6*	12**	18***
Marrom	133 (85,81%)	121 (87,68%)	113 (88,98%)	91 (87,50%)
Preto	22 (14,19%)	17 (12,32%)	14 (11,02%)	13 (12,50%)
Total	155 (100,0%)	138 (100,0%)	127 (100,0%)	104 (100,0%)

* Dezessete dentes foram tratados/ **Onze dentes foram tratados/ *** Seis dentes foram tratados e nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito dentes esfoliaram.

Observou-se que durante os 18 meses de avaliação, houve um decréscimo de dentes com a superfície pigmentada, sendo na cor marrom 42 dentes, seguida da cor preto (9 dentes). Esse decréscimo foi maior no período de 6 meses, para ambas as cores de pigmentação. Entretanto, a análise dessa variável, ao longo dos 18 meses, não apresentou significância estatística ($p > 0,05$).

4.2.5 Cavitação

A tabela 4 apresenta a distribuição do número e da porcentagem dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras de acordo com a ocorrência de cavitação aos 6, 12 e 18 meses de avaliação clínica.

Tabela 4- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a presença ou não de cavitação nas fossas e fissuras aos 6, 12 e 18 meses

CAVITAÇÃO	TEMPO DE ACOMPANHAMENTO EM MESES N (%)		
	6	12	18*
Ausente	138 (89,03%)	127 (92,02%)	104 (94,54%)
Presente	17 (10,97%)	11 (7,98%)	6 (5,46%)
Total	155 (100,0%)	138 (100,0%)	110 (100,0%)

* Nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito dentes esfoliaram.

Aos 6 meses de avaliação, 138 (89,03%) dentes permaneceram hígidos, por outro lado, 17 (10,97%) apresentaram cavitação. Aos 12 meses, 11 dentes cavitaram em relação ao período anterior; permanecendo 127 (92,02%) em monitoramento e sem cavitação. Aos 18 meses, 6 dentes cavitaram enquanto 104 (94,54%) permaneceram em monitoramento e sem cavitação.

Quando os diferentes períodos de tempo são considerados, embora exista tendência de cavitação dos dentes portadores de fossas e fissuras pigmentadas, esse fenômeno não foi significativo aos 6, 12 e 18 meses de

acompanhamento, para todos os grupos de dentes pigmentados ($p > 0,01$).

A tabela 5 apresenta a distribuição do número dos dentes com fossas e fissuras pigmentadas que cavitaram em relação aos períodos de avaliação.

Tabela 5- Distribuição do número dos dentes com fossas e fissuras pigmentadas que cavitaram aos 6, 12 e 18 meses

DENTES	TEMPO DE ACOMPANHAMENTO EM MESES		
	N (%)		
	6	12	18
54	0	1	0
55	6	2	1
64	1	0	0
65	5	3	4
74	1	0	0
75	1	2	1
84	0	1	0
85	3	2	0
TOTAL	17	11	6

Aos 6 meses de avaliação, 17 dentes cavitaram. Desses, seis correspondiam ao dente 55, cinco ao dente 65, três ao dente 85 e um ao dente 75. Logo, a maioria dos dentes com cavitação correspondia aos segundos molares e apenas dois elementos dentais (dente 64 e 74) correspondiam aos primeiros molares.

Aos 12 meses, 11 dentes cavitaram. Desses, três correspondiam ao dente 65 e seis dentes correspondiam aos dentes 55, 75 e 85, na igual

proporção. Apenas dois elementos dentais (dente 54 e 84) correspondiam aos primeiros molares.

Aos 18 meses, 6 dentes cavitaram. Desses, quatro correspondiam ao dente 65 e os outros dois dentes correspondiam aos dentes 55 e 75.

Por meio das médias calculadas, variância e desvio padrão para cada dente com fossas e fissuras pigmentadas, foi possível identificar as principais características dos dentes em que ocorreu a cavitação a partir de dados iniciais e nos tempos de 6, 12 e 18 meses. Logo, a cor predominante dos dentes em que houve a cavitação foi a marrom; a textura amolecida; a distribuição parcial e a superfície mais acometida foi a oclusal e palatina.

4.2.6 *T*extura

Esse tópico foi avaliado a partir do primeiro período de avaliação (6 meses), pois todos os dentes incluídos possuíam, no início da pesquisa a textura dura.

A tabela 6 apresenta a distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a textura da pigmentação das fossas e fissuras aos 6, 12 e 18 meses de avaliação.

Tabela 6- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes de acordo com a textura da pigmentação das fossas e fissuras aos 6, 12 e 18 meses

TEXTURA	TEMPO DE ACOMPANHAMENTO EM MESES N (%)		
	6	12	18*
Dura	138 (89,03%)	127 (92,03%)	104 (94,55%)
Amolecida	17 (10,97%)	11 (7,97%)	6 (5,45%)
Total	155 (100,0%)	138 (100,0%)	110 (100,0%)

* Nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito dentes esfoliaram.

Pôde-se notar que ao longo dos 18 meses de avaliação, 34 dentes apresentaram alteração da textura dura para a amolecida, os quais receberam algum tipo de procedimento restaurador.

Embora exista uma tendência de alteração do número de dentes com a textura dura ao longo do estudo, o mesmo fenômeno foi observado para as pigmentações com textura amolecida, em função de exclusão de pacientes, esfoliação de elementos dentários e tratamento. Apesar desse fenômeno, a grande maioria dos dentes pigmentados manteve a textura dura ao longo do período de 6, 12 e 18 meses ($p < 0,01$).

Aos 18 meses, observou-se que, embora para os dentes 55, 65, 74, 75 e 85, a textura tenha se mantido dura, para o dente 64, o número de dentes que mantiveram a textura dura não foi significativamente maior do que o número de dentes que apresentaram textura amolecida ($p = 0,15$), o que está relacionado ao total desses elementos dentais com fossas e fissuras pigmentadas.

Quando as variáveis cavidade e textura são comparadas, verificou-se a existência de uma nítida correlação linear positiva entre esses fatores, variando de $R = 1$ para o dente 75 a $R = 0,85$ para o dente 85, o

que evidencia a eficiência da calibração do exame clínico ao longo do período de avaliação, bem como no que se refere à apresentação e análise dos dados.

4.2.7 Tratamento

Esse tópico também foi avaliado a partir dos 6 meses, pois todos os dentes inicialmente incluídos no estudo que apresentavam fossas e fissuras pigmentadas foram classificados como hígidos.

A tabela 7 apresenta a distribuição do número e da porcentagem dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras de acordo com o tipo de tratamento realizado aos 6, 12 e 18 meses de avaliação.

Tabela 7- Distribuição do número e da porcentagem dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras de acordo com o tipo de tratamento realizado aos 6, 12 e 18 meses

TRATAMENTO	TEMPO DE ACOMPANHAMENTO EM MESES		
	N (%)		
	6	12	18*
Monitoramento	138 (89,03%)	127 (81,94%)	104 (75,36%)
Selante invasivo	6 (3,87%)	7 (4,52%)	13 (9,42%)
Restauração	11 (7,10%)	21 (13,54%)	21 (15,22%)
Total	155 (100,0%)	155 (100,0%)	138 (100,0%)

* Nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito dentes esfoliaram.

Aos 6 meses de avaliação, 138 (89,03%) dentes permaneceram em monitoramento, 6 (3,87%) foram selados e 11 (7,10%) restaurados.

Aos 12 meses, 1 dente foi selado e 10 restaurados em relação ao período anterior; permanecendo 127 (81,94%) dentes em monitoramento.

Notou-se que, no último período de avaliação, a maioria dos dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras continuou em monitoramento (104; 75,36%), ao passo que apenas 6 dentes foram selados em relação ao período anterior.

Os dados apresentados evidenciaram que uma pequena minoria do grupo amostral examinado recebeu procedimento restaurador (teste do qui-quadrado, $p < 0,001$) ou selante (teste do qui-quadrado, $p < 0,001$) nos dentes com fossas e fissuras pigmentadas.

Assim, no presente estudo, observou-se que, independentemente do dente avaliado, a maioria dos dentes com fossas e fissuras pigmentadas não foi submetida a tratamento restaurador ou ao selamento de suas fossas e fissuras pigmentadas ($p < 0,05$ a $p < 0,01$). Nesse sentido, observou-se que as diferentes modalidades de tratamento restaurador não apresentaram correlação com quaisquer das características clínicas e radiográficas testadas ($p > 0,05$), não tendo sido possível se determinar um comportamento padrão no tratamento dos dentes pigmentados.

4.2.8 **Confiabilidade das avaliações clínicas**

Em face da presença de um único examinador realizar a avaliação das características clínicas, optou-se por utilizar o teste Anova, com cálculo de coeficiente de concordância de Kendall, a fim de se identificar a confiabilidade das características clínicas registradas para os diferentes dentes, com nível de significância de 5,0%.

Logo, obteve-se como resultado o valor do coeficiente de concordância de 0,79621, próximo ao valor crítico (0,5). Ou seja, embora apenas um examinador tenha realizado o exame clínico, o mesmo demonstrou constância na avaliação de todas as características clínicas em todos os períodos de avaliação.

4.3 Perfil radiográfico dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras

A tabela 8 apresenta a distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico em todos os períodos de avaliação. Os resultados apresentados referem-se à primeira avaliação das radiografias, realizada uma semana após o encerramento da avaliação clínica (18 meses). Nela se comparam os resultados obtidos pelos dois examinadores.

Os dados radiográficos, quando comparados com as variáveis clínicas, como localização e distribuição, não mostram correlações significativas, evidenciando baixa sensibilidade e especificidade, produzindo um baixo índice de correlação linear, o qual tende a zero (R variando de $R=0,45$ a $R= 0,51$).

Tabela 8- Distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico aos 6, 12 e 18 meses (Exame 1)

ESCORE/ TEMPO	0		6*		12**		18***	
	Ex 1	Ex 2	Ex 1	Ex 2	Ex 1	Ex 2	Ex 1	Ex 2
0	148	142	133	128	124	120	98	99
1	0	1	0	1	0	0	0	0
2	7	12	5	9	3	7	6	5
TOTAL	155	155	138	138	127	127	104	104

* Dezessete dentes foram tratados/ **Onze dentes foram tratados/ *** Seis dentes foram tratados e nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito esfoliaram.

Observou-se, em todos os períodos de avaliação, a predominância do escore 0, seguido do escore 2 e apenas duas ocorrências do escore 1. Isso, provavelmente, deve-se ao fato da limitação do exame radiográfico para se detectar uma lesão cáriosa incipiente, restrita ao esmalte em superfície oclusal. Os resultados radiográficos não evidenciaram modificações estatisticamente significativas ao longo do período de avaliação ($p > 0,05$).

A tabela 9 apresenta a distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associada ao escore radiográfico em todos os períodos de avaliação. Os resultados apresentados referem-se à segunda avaliação das mesmas radiografias da tabela anterior. O registro desse segundo escore foi realizado duas semanas após o encerramento da avaliação clínica (18 meses). Nela se comparam os resultados obtidos pelos dois examinadores.

Tabela 9- Distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico aos 6, 12 e 18 meses (Exame 2)

ESCORE/ TEMPO	0		6*		12**		18***	
	Ex 1	Ex 2	Ex 1	Ex 2	Ex 1	Ex 2	Ex 1	Ex 2
0	146	142	130	128	123	120	99	99
1	0	1	0	1	0	0	0	0
2	9	12	8	9	4	7	5	5
TOTAL	155	155	138	138	127	127	104	104

* Dezessete dentes foram tratados/ **Onze dentes foram tratados/ *** Seis dentes foram tratados e nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito esfoliaram.

Nessa tabela, da mesma forma que na anterior, verificou-se em todos os períodos de avaliação a predominância do escore 0, seguido do escore 2 e apenas duas ocorrências do escore 1.

Ressalta-se que, em ambas as tabelas, observaram-se pequenas diferenças inter-examinadores, tanto na primeira quanto na segunda avaliação das radiografias.

A tabela 10 apresenta a distribuição do número dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico em todos os períodos de avaliação. Essa tabela se refere aos dois períodos de exame radiográfico, comparando os resultados do primeiro examinador.

Tabela 10- Distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico aos 6, 12 e 18 meses (Examinador 1)

ESCORE/ TEMPO	0		6*		12**		18***	
	Ex 1	Ex 1	Ex 1	Ex 1	Ex 1	Ex 1	Ex 1	Ex 1
0	148	146	133	130	124	123	98	99
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	7	9	5	8	3	4	6	5
TOTAL	155	155	138	138	127	127	104	104

* Dezessete dentes foram tratados/ **Onze dentes foram tratados/ *** Seis dentes foram tratados e nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito esfoliaram.

Notou-se que, em todos os períodos de avaliação, houve a predominância do escore 0 seguido do escore 2 e ausência dos escore 1.

A tabela 11 apresenta a distribuição numérica dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico em todos os períodos de avaliação. Essa tabela se refere aos dois períodos de exame radiográfico, comparando os resultados do segundo examinador.

Tabela 11- Distribuição do número de dentes com a pigmentação nas fossas e fissuras associado ao escore radiográfico aos 6, 12 e 18 meses (Examinador 2)

ESCORE/ TEMPO	0		6*		12**		18***	
	Ex 2	Ex 2	Ex 2	Ex 2	Ex 2	Ex 2	Ex 2	Ex 2
0	148	142	133	128	124	120	98	99
1	0	1	0	1	0	0	0	0
2	7	12	5	9	3	7	6	5
TOTAL	155	155	138	138	127	127	104	104

* Dezessete dentes foram tratados/ **Onze dentes foram tratados/ *** Seis dentes foram tratados e nove dentes não foram examinados, pois os pacientes desistiram da pesquisa e oito esfoliaram.

Notou-se que, em todos os períodos de avaliação, houve a predominância do escore 0, seguido do escore 2 e apenas duas ocorrências do escore 1.

4.4 Perfil microbiológico dos dentes com pigmentação nas fossas e fissuras

As tabelas 12 e 13 apresentam a frequência de detecção dos microrganismos estudados nas amostras de biofilme supragengival, coletados aos 0 e 12 meses, respectivamente. A população absoluta de cada microrganismo alvo no biofilme coletado é apresentada na tabela 14, enquanto que a participação relativa dos mesmos na microbiota do biofilme é apresentada na tabela 15.

A análise da frequência de detecção dos diferentes microrganismos estudados pode permitir que complexas relações ecológicas entre os membros da microbiota bucal sejam avaliadas. Contudo, não se pode dizer, com segurança, que uma associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de duas espécies bacterianas constitui prova de um relacionamento ecológico sinérgico ou antagonístico, uma vez que tais dados não foram avaliados em estudos laboratoriais sob condições controladas, mas podem ser a base para futuras investigações nesse sentido.

A análise da frequência de detecção dos diferentes microrganismos estudados sugere associações entre os membros do biofilme. Nesse sentido, *E. corrodens* parece ter associações sinérgicas com *C. rectus* (teste do qui-quadrado, $p= 0,017$), *F. nucleatum* (teste do qui-quadrado, $p= 0,017$) e *P. nigrescens* (teste do qui-quadrado, $p= 0,027$), enquanto *C. rectus* estabelece associações sinérgicas com *P. intermedia* (teste do qui-quadrado, $p= 0,032$) e *P. nigrescens* (teste do qui-quadrado com $p= 0,03$).

As associações entre as diferentes espécies de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento preto também foram detectadas, merecendo destaque *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* (teste

do qui-quadrado com $p=0,023$), *P. gingivalis* e *P. intermedia* (teste do qui-quadrado, $p=0,021$), *P. gingivalis* e *P. nigrescens* (teste do qui-quadrado, $p=0,019$).

Tabela 12- Ocorrência de diferentes grupos bacterianos no biofilme supragengival de dentes com pigmentação nas fossas e fissuras (grupo experimental) e dentes sem pigmentação (grupo controle 1 e 2), segundo dados obtidos por amplificação do DNA microbiano por PCR. Resultado da coleta inicial

Microrganismo	Grupos N(%)		
	Grupo experimental N=53	Grupo controle 1 N=53	Grupo controle 2 N=42
<i>Actinomyces</i> spp.	39 (73,58%)	12 (22,64%)	11 (26,19%)
<i>A. israelii</i>	9 (16,98%)	3 (5,66%)	3 (7,14%)
<i>A. naeslundii</i>	13 (24,53%)	6 (11,32%)	6 (14,28%)
<i>A. viscosus</i>	7 (13,21%)	7 (13,21%)	5 (11,90%)
<i>C. rectus</i>	18 (33,96%)	15 (28,30%)	22 (52,38%)
<i>E. corrodens</i>	8 (15,09%)	8 (15,09%)	9 (21,43%)
<i>F. nucleatum</i>	9 (16,98%)	6 (11,32%)	10 (23,81%)
<i>P. micra</i>	5 (9,43%)	3 (5,66%)	2 (4,76%)
<i>P. endodontalis</i>	3 (5,66%)	0 (0,00%)	5 (11,90%)
<i>P. gingivalis</i>	11 (20,75%)	7 (13,21%)	10 (23,81%)
<i>P. intermedia</i>	9 (16,98%)	11 (20,75%)	8 (19,05%)
<i>P. nigrescens</i>	4 (7,55%)	4 (7,55%)	6 (14,28%)

Quando os dados de análise de variância para medidas repetidas são aplicados aos dados de prevalência dos diferentes microrganismos, observa-se que os dentes com fossas e fissuras pigmentadas apresentam uma maior prevalência de actinomicetos ($p= 0,021$), embora essa elevação não tenha sido observada quando cada uma das três espécies testadas é avaliada isoladamente. Para os demais microrganismos, os dados dos três grupos de dentes não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 13- Ocorrência de diferentes grupos bacterianos no biofilme supragengival de dentes com pigmentação nas fossas e fissuras (grupo experimental) e dentes sem pigmentação (grupo controle 1 e 2), segundo dados obtidos por amplificação do DNA microbiano por PCR. Resultado da coleta após 12 meses

Microrganismo	Grupos N(%)		
	Grupo experimental N=42	Grupo controle 1 N=53	Grupo controle 2 N=42
<i>Actinomyces</i> spp.	32 (76,19%)	14 (26,41%)	13 (30,95%)
<i>A. israelii</i>	11 (26,19%)	4 (7,55%)	6 (14,28%)
<i>A. naeslundii</i>	13 (30,95%)	7 (13,21%)	4 (9,52%)
<i>A. viscosus</i>	10 (23,81%)	6 (11,32%)	4 (9,52%)
<i>C. rectus</i>	15 (35,71%)	15 (28,30%)	20 (47,62%)
<i>E. corrodens</i>	9 (21,43%)	10 (18,87%)	13 (30,95%)
<i>F. nucleatum</i>	18 (42,86%)	9 (16,98%)	15 (35,71%)
<i>P. micra</i>	6 (14,28%)	4 (7,55%)	4 (9,52%)
<i>P. endodontalis</i>	0 (0,00%)	1 (1,89%)	2 (4,76%)
<i>P. gingivalis</i>	13 (30,95%)	7 (13,21%)	8 (19,05%)
<i>P. intermedia</i>	13 (30,95%)	16 (30,19%)	10 (23,81%)
<i>P. nigrescens</i>	7 (16,67%)	8 (15,09%)	5 (11,90%)

Quando os dados das tabelas 12 e 13 foram submetidos à análise de variância para medidas repetidas, verificou-se que a prevalência dos diferentes microrganismos não sofreu modificações significativas ao longo do período de acompanhamento. Assim, observou-se uma maior prevalência de microrganismos do gênero *Actinomyces* nos dentes com fossas e fissuras pigmentadas, enquanto que para os demais microrganismos os dados dos três grupos de dentes se mostraram semelhantes.

Tabela 14- População de cocos cariogênicos e microrganismos totais no biofilme coletado do interior das fossas e fissuras pigmentadas (grupo experimental) e não pigmentadas (grupo controle 1 e 2), segundo dados obtidos através de Real-Time PCR. Resultado da coleta inicial

Microrganismos	Número de cópias de DNA alvo/amostra (média ± desvio padrão)		
	Grupo experimental N=53	Grupo controle 1 N=53	Grupo controle 2 N=42
<i>S. mutans</i>	$1,01 \cdot 10^5 \pm 1,22 \cdot 10^4$	$0,88 \cdot 10^5 \pm 3,82 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^5 \pm 8,14 \cdot 10^4$
<i>S. sobrinus</i>	$6,21 \cdot 10^4 \pm 0,98 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^4 \pm 4,3 \cdot 10^4$	$5,53 \cdot 10^4 \pm 9,2 \cdot 10^3$
Total de microrganismos¹	$21,2 \cdot 10^5 \pm 7,6 \cdot 10^5$	$19,0 \cdot 10^5 \pm 11,6 \cdot 10^5$	$18,1 \cdot 10^5 \pm 8,51 \cdot 10^5$

¹ Detectados e quantificados com auxílio de iniciadores universais

Os resultados da tabela 14 evidenciam que, inicialmente, não foram detectadas diferenças significativas entre a participação de cocos cariogênicos no biofilme de dentes com pigmentação nas fossas e fissuras ou de dentes desses pacientes que não apresentavam pigmentação, o mesmo tendo sido relatado para o biofilme obtido de pacientes que não possuíam dentes com pigmentação nas fossas e fissuras (ANOVA, com p variando de $p= 0,68$ a $p= 0,127$). Também não foram verificadas diferenças significativas entre o total de microrganismos detectados no biofilme dos diferentes grupos.

Os resultados da tabela 15 apresentam os dados da participação dos cocos cariogênicos, em termos percentuais na microbiota, reforçando a percepção de que os três grupos estudados apresentavam uma microbiota que, coletivamente, possuía características similares, como também mostrado na tabela 16.

Tabela 15- Participação percentual dos cocos cariogênicos na microbiota presente no biofilme obtido das fossas e fissuras pigmentadas e não pigmentadas, segundo dados obtidos por Real-Time PCR. Resultado da coleta inicial

Microrganismos	Percentual médio (%) da população microbiana nas amostras positivas		
	Grupo experimental N=53	Grupo controle 1 N=53	Grupo controle 2 N=42
<i>S. mutans</i>	4,80 (9,06%)	4,60 (8,68%)	7,70 (18,33%)
<i>S. sobrinus</i>	2,90 (5,47%)	3,95 (7,45%)	3,06 (7,28%)
Total de eubactérias¹	100,0%	100,0%	100,0%

¹ Detectadas e quantificadas com auxílio de iniciadores universais

Tabela 16- População de cocos cariogênicos e microrganismos totais no biofilme coletado do interior de fossas e fissuras pigmentadas (grupo experimental) e não pigmentadas (grupo controle 1 e 2), segundo dados obtidos através de Real-Time PCR. Resultado da coleta após 12 meses

Microrganismos	Número de cópias de DNA alvo/amostra (média ± desvio padrão)		
	Grupo experimental N=42	Grupo controle 1 N=53	Grupo controle 2 N=42
<i>S. mutans</i>	$1,4 \cdot 10^5 \pm 0,93 \cdot 10^4$	$1,46 \cdot 10^5 \pm 7,4 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^5 \pm 6,9 \cdot 10^4$
<i>S. sobrinus</i>	$8,8 \cdot 10^4 \pm 1,33 \cdot 10^4$	$6,7 \cdot 10^4 \pm 2,23 \cdot 10^4$	$7,21 \cdot 10^4 \pm 1,4 \cdot 10^4$
Total de microrganismos¹	$25,3 \cdot 10^5 \pm 6,2 \cdot 10^5$	$18,8 \cdot 10^5 \pm 8,1 \cdot 10^5$	$22,9 \cdot 10^5 \pm 7,2 \cdot 10^5$

¹ Detectados e quantificados com auxílio de iniciadores universais

Tabela 17- Participação percentual dos cocos cariogênicos na microbiota presente no biofilme obtido das fossas e fissuras pigmentadas e não pigmentadas, segundo dados obtidos por Real-Time PCR. Resultado da coleta após 12 meses

Microrganismos	Percentual médio (%) da população microbiana nas amostras positivas		
	Grupo experimental N=42	Grupo controle 1 N=53	Grupo controle 2 N=42
<i>S. mutans</i>	5,50 (13,09%)	6,80 (12,83%)	7,90 (18,81%)
<i>S. sobrinus</i>	3,50 (8,33%)	3,56 (6,72%)	3,14 (7,47%)
Total de eubactérias¹	100,0%	100,0%	100,0%

¹Detectadas e quantificadas com auxílio de iniciadores universais

De acordo com os dados apresentados na tabela 17, a avaliação dos dentes dos três grupos experimentais evidenciou uma ligeira elevação do total de *S. mutans* em todos os três grupos, embora apenas no controle 2 (pacientes que não apresentavam dentes com pigmentação nas fossas e fissuras) essa elevação se mostrou significativa (ANOVA, $p= 0,023$), embora restrita a alguns indivíduos. As flutuações nos níveis de *S. sobrinus* não foram significativas ao longo do período estudado.

As alterações de populações de cocos cariogênicos (*S. mutans* e *S. sobrinus*) somente adquirem significância nos dentes com cavitação (ANOVA, $p= 0,001$), mas em função do pequeno número de lesões cavitadas, essas flutuações na população microbiana perdem a significância. No grupo de dentes pigmentados cavitados, o número médio de cópias de DNA de cocos cariogênicos por amostra foi de $7,8 \cdot 10^5 \pm 3,9 \cdot 10^5$, enquanto que no grupo de dentes com pigmentação não cavitados esse número foi de $1,6 \cdot 10^5 \pm 4,5 \cdot 10^4$.

Discussão

5 Discussão

De uma amostra de 155 dentes com pigmentação nas fossas e fissuras, 80,63% correspondiam aos segundos molares decíduos; sem significância em relação ao arco dental. Dados semelhantes foram encontrados em um estudo de um ano de acompanhamento de observação e controle, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, de pacientes com idade média igual a 10 anos, em fases de dentição mista (92,31%) e permanente (7,69%), apresentando, ao exame visual, fossas e fissuras pigmentadas. Esse demonstrou que os dentes mais afetados são os primeiros molares permanentes (53,6%), segundos molares decíduos (27,5%) e os primeiros molares decíduos (13,0%) (NASSIF; IMPARATO, 2005). Segundos esses autores, essa pigmentação pode ser explicada pelo próprio processo de erupção dentária e seus componentes microbiológicos. Ou seja, durante o processo de erupção desses dentes, a coroa dentária fica próxima à margem gengival e desse modo microrganismos subgengivais do tipo *Bacteroides melanogenicus* colonizam a região. Além disso, a anatomia oclusal desses dentes é complexa e irregular (ROHR; MAKINSON; BURROM, 1991), o que facilita a retenção de biofilme dental e pigmentos da alimentação (KERR, 2008).

A superfície mais acometida pela pigmentação foi a oclusal (67,74%), provavelmente devido ao fato de que a mesma pode apresentar um sistema complexo de fossas e fissuras (ROHR; MAKINSON; BURROM, 1991) que facilita o acúmulo de biofilme dentário e, conseqüentemente, retém pigmentos diversos da dieta, além de ser colonizada por microrganismos do biofilme subgengival (actinomicetos, prevotelas); devido à proximidade com o tecido gengival durante o processo da erupção dentária.

Ao se observar a distribuição da pigmentação na superfície dentária, notou-se que o modo mais comum foi o parcial (75,48%). Isso pode ser

devido ao fato de que os pigmentos até podem se acumular em todo o sistema de fossas e fissuras, entretanto a oclusão com o dente antagonista, o tipo de alimentação (rica em fibras) e os métodos de higiene bucal podem remover, parcialmente, os pigmentos da superfície.

A cor mais comum encontrada nos dentes pigmentados foi a marrom (85,81%), sendo esse dado estatisticamente significativo, todavia não apresentou associações com os outros parâmetros clínicos estudados. Quando se elaborou o delineamento dessa pesquisa, pensou-se que a cor preto predominaria nos achados clínicos e que poderia influenciar no prognóstico do dente. Enfim, observou-se que a cor não foi um fator que direcionou o tratamento.

Essa pigmentação das fossas e fissuras não possui uma etiologia definida. Logo, é possível que a mesma tenha ocorrido devido à pigmentação exógena no fundo das fossas e fissuras, possivelmente por de deposição de pigmentos de dieta (KERR, 2008), pigmentação exógena oriunda de metabolismo bacteriano, onde produtos da ação microbiana sobre componentes de dieta e saliva são depositados na superfície ou irregularidades da superfície dentária (REID; BEELEY; MACDONALD, 1997; KERR, 2008) e áreas de desmineralização seguidas de impregnação com compostos pigmentados exógenos. No grupo experimental, a análise microbiológica denotou associações entre diferentes espécies de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento preto, como *P. endodontalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. gingivalis*, além da maior presença de *Actinomyces* nos dois períodos de coleta (0 e 12 meses) nos pacientes do grupo experimental, embora essa elevação não tenha sido observada quando cada uma das três espécies testadas foi avaliada isoladamente.

Observou-se que pouco mais da metade dos pacientes desse estudo estava ingerindo medicamentos, dentre eles, anti-hipertensivos e anti-histamínicos, que ocasionam uma diminuição do fluxo salivar, dificultando a limpeza mecânica da cavidade bucal. Outros medicamentos podem

estimular e denotar mais facilmente a multiplicação de bactérias cromogênicas (vitaminas, complexos polivitamínicos), bem como o sulfato ferroso pode ocasionar manchas extrínsecas. Esses dados podem ter contribuído para aumentar a quantidade de pigmentação nas fossas e fissuras do grupo experimental, apesar de não ter sido avaliado no grupo controle.

Nassif e Imparato, 2005 relatam que lesões escurecidas presentes em pacientes com história passada de presença de doença cárie, provavelmente, podem estar relacionadas com lesões inativas que incorporaram pigmentos extrínsecos durante o processo de remineralização. Por outro lado, em pacientes sem história passada de presença de lesões, pode-se associar o escurecimento dos sulcos a um selamento biológico.

Christensen et al. (2001), também avaliando pigmentações em fossas e fissuras, indicam que métodos mais efetivos para esse diagnóstico são necessários e, na ausência de fatores extrínsecos que causem a pigmentação, a presença da mesma deve ser avaliada com atenção por clínicos, pois pode se tratar de lesão cariiosa.

Ao longo dos 18 meses 34 dentes cavitaram, sendo que apesar da maioria cavitaram ao longo do primeiro período de avaliação (0-6 meses) não houve diferenças entre os períodos. As principais características dos dentes que apresentaram cavitação foram a cor marrom, a textura amolecida, a distribuição parcial e a superfície mais acometida foi a oclusal e palatina. Além disso, nesses dentes é que a população de cocos cariogênicos se mostrou aumentada, achado esperado de acordo com a literatura (LOESCHE, 1986; DE SOET; DE GRAAF, 1998).

Fazendo uma relação com o aspecto microbiológico presente nos dentes com e sem cavitação, observou-se que os cocos cariogênicos ocorriam em maior número nas superfícies cavitadas, porém devido ao pequeno número de cavitações, nos períodos de coleta, esse número não foi significativo.

Especula-se na literatura que atualmente, pela maior disponibilidade e facilidade de acesso da população às fontes e produtos fluoretados vêm ocorrendo um fenômeno denominado "síndrome do flúor" (LEWIN, 1985; BALL, 1986; RICKETTS et al., 1997). Segundo esses autores, esse fenômeno pode provocar uma mudança no padrão de manifestação da lesão de cárie dentária na forma de uma diminuição da progressão da mesma. Diferentemente da superfície dentária livre, nas regiões de fossas e fissuras em que a ação do flúor é menor, porém existe, explicaria essa redução do avanço da lesão de cárie.

O parâmetro clínico textura esteve intimamente correlacionado à condição dentária, se hígido ou cariado, do dente com fossas e fissuras pigmentadas. Logo, em todos os dentes que cavitaram a textura se apresentava amolecida.

A maioria dos dentes (75,36%) com a pigmentação nas fossas e fissuras permaneceu em monitoramento ao longo dos 18 meses, sendo que uma minoria foi restaurada, independentemente das características do mesmo. Importante ressaltar que a princípio, por se tratar de uma pesquisa clínica realizada com pacientes, nos quais foi possível um acompanhamento clínico periódico, muitos clínicos poderão não acreditar na possibilidade da conduta do monitoramento. Assim procedem, pois normalmente a rotina do acompanhamento clínico de seus pacientes não é fato realizado em seus consultórios. Pois essa pesquisa mostrou exatamente que esse procedimento é possível.

Embora os responsáveis pelos pacientes participantes da pesquisa recebessem orientações periódicas sobre a razão do monitoramento dos dentes com pigmentação, que esse procedimento auxiliaria na decisão de um melhor tratamento e caso houvesse a necessidade de intervenção, a mesma seria realizada pela pesquisadora responsável, intervenções externas ocorreram no presente estudo. A maioria dos casos de tratamento restaurador nos dentes com pigmentação foi realizada por alunos do curso de graduação e cirurgiões-dentistas particulares.

De acordo com Basting; Serra (1999), o acompanhamento vigilante deve anteceder a decisão restauradora, principalmente diante de diagnósticos duvidosos.

Ramires-Romito; Imparato, 1999, levando em consideração o fato de que nem todos os profissionais da Odontologia contam com o conhecimento ou concordam com a conduta de observação e controle de superfícies pigmentadas, sugeriram o selamento oclusal a fim de evitar que seja realizada uma intervenção invasiva desnecessária e, assim, instalar-se o ciclo restaurador repetitivo (ELDERTON, 1997) nesses dentes.

Os idealizadores dessa pesquisa decidiram por associar ao exame clínico das fossas e fissuras pigmentadas o exame radiográfico na tentativa de aumentar a sensibilidade da avaliação (ESPELID; MEJARE; WEERHEIJM, 2003; BRAGA; MENDES; EKSTRAND; 2010; WENZEL, 2004) e de contribuir na verificação de possíveis lesões cariosas ocultas em dentina (WEERHEIJM, 1990; WEERHEIJM, GRYTHUYSEN, VAN AMERONGEN, 1992; RICKETTS et al., 1997; YEHUDA, RON BECHOR, 2008).

Observou-se que os resultados da análise das radiografias confirmaram os achados clínicos em que predominaram dentes com ausência de cavitação. O escore 0, para a avaliação radiográfica, foi evidentemente o mais frequente. Assim, pela análise dos examinadores, pode-se dizer, que o exame radiográfico quase não identificou radioluscência no esmalte (escore 1) e quando esta foi mais perceptível, era observada atingindo a dentina (escore 2). Consideramos assim, que a avaliação radiográfica será de pouca valia se quem a realiza pretende visualizar lesão restrita ao esmalte dentário.

Achado semelhante foi encontrado no estudo de Palma, 1997 em que o exame clínico detectou um maior número de cavidades em relação ao exame radiográfico no diagnóstico de lesões cariosas.

Um dado recente e interessante é que o estudo de Mendes, 2010 mostrou que a inspeção visual associada ao método radiográfico não apresentou vantagem sobre a inspeção visual realizada isoladamente na detecção de lesões de cárie em dentes decíduos na superfície oclusal.

Além disso, o exame radiográfico subestimou as lesões cáries incipientes (escore 1), que, clinicamente, foram a maioria nesse estudo. A literatura mostra o baixo desempenho do exame radiográfico para se detectar lesões em esmalte (WENZEL, 2004; PECORARO; MELLO; REGO, 2005) principalmente na superfície oclusal, devido à sobreposição das cúspides na imagem radiográfica. Além disso, a radiografia interproximal tende a subestimar a perda mineral real das lesões de cárie e não é adequada para se detectar lesões de cárie em estágios iniciais (PITTS, 1996; WENZEL, 2004).

Optou-se pela realização de duas avaliações radiográficas e por dois examinadores para que os resultados pudessem ser comparados e não mostrassem interferência ou tendência intra ou inter-examinadores que viessem a alterar os resultados, antes, proporcionando maior confiabilidade aos mesmos.

Considerando os aspectos microbiológicos, os resultados desse estudo mostraram a presença em todos os grupos de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento preto e de actinomicetos (REID, BEELEY, MACDONALD, 1977; KERR, 2008), maior no grupo experimental. A literatura aponta que esse tipo de bactéria está associada à pigmentação (manchas negras) no terço cervical das superfícies vestibular e lingual de dentes (GASPARETTO, 2003; SABA et al., 2006). Notou-se também que esses microrganismos são próprios da microbiota dos pacientes, pois o tempo de acompanhamento não mostrou modificações significativas na microbiota dos grupos.

Theilade e Pang (1987) em estudo com microscopia eletrônica de varredura de lesões escurecidas demonstraram a presença predominante de filamentos, cocos e bastonetes gram-positivos e determinaram que o

escurecimento é um tipo específico de placa dental com microbiota simples e tendência a se calcificar. Por outro lado, Steiner et al. (1998) e Christensen et al. (2001) têm procurado associar a presença de escurecimento com a necessidade de invasão dos tecidos.

As populações de cocos cariogênicos detectadas apenas foram significativas nos dentes que desenvolveram cavidade ao longo do estudo. Referido achado induz a pensar que a pigmentação das fossas e fissuras pode não estar associada fortemente à cárie dentária. Alguns estudos que correlacionam a presença de pigmentação extrínseca com a prevalência de cárie mostram que ambos apresentam uma relação inversamente proporcional (KOCH et al., 2001; GASPARETTO et al., 2003; HEINRICH-WELTZIEN; MONSE, 2009).

Assim, pela experiência obtida ao longo desses anos, trabalhando com esse assunto, e que foram enfeixados por esta pesquisa que procurou o mais fiel possível seguir um grupo de pacientes com características clínicas específicas em determinados dentes, pode-se afirmar que o aspecto clínico foi o de maior relevância na decisão de tratamento ou monitoramento das fossas e fissuras pigmentadas em molares decíduos, sendo que os seus parâmetros de cavitação e/ou textura amolecida foram decisivos. Dessa forma, a presença de fossas e fissuras pigmentadas nos referidos dentes sem as condições clínicas expostas devem merecer, no mínimo, uma atitude clínica de monitoramento.

Considerações finais

6 Considerações finais

A seguir, destaca-se de forma sucinta, os principais aspectos da presente pesquisa.

- ✓ O aspecto clínico, juntamente com os seus parâmetros de cavitação e textura, é o que apresentou maior relevância na decisão de tratamento ou monitoramento dessas pigmentações dentárias;
- ✓ Os parâmetros clínicos de superfície dentária acometida, distribuição na superfície e cor não se alteraram ao longo do tempo;
- ✓ O aspecto radiográfico apresentou limitações na detecção fiel de ocorrência de lesão cáriosa incipiente na superfície dentária do esmalte, fato comprovado pelos resultados dos escores observados nessa pesquisa;
- ✓ O aspecto microbiológico mostrou a presença de bactérias cromogênicas e de actinomicetos, entretanto pelas pequenas populações de cocos cariogênicos, pode-se presumir que a pigmentação observada não está correlacionada à ocorrência de lesões cárias. O tempo não influenciou a qualidade e quantidade de microrganismos.

Conclusão

7 Conclusão

Baseada nos resultados obtidos dos aspectos clínico, radiográfico e microbiológico de molares decíduos com fossas e fissuras pigmentadas, pode-se afirmar que, excetuando quando da presença das características clínica visível e tátil, de cavitação e textura amolecida, indica-se o monitoramento clínico nessas situações. Pois a ocorrência de fossas e fissuras pigmentadas, nesse trabalho, necessariamente não significou se tratar de lesão cariosa.

Desnecessário dizer que essa conduta será sempre melhor executada em pacientes pertencentes a programas de assistência odontológica rotineira.

Referências

Referências¹

ANGNES, V. et al. Clinical effectiveness of laser fluorescence, visual inspection and radiography in the detection of occlusal caries. **Caries Res.**, v. 39, p. 490-495, 2005.

ASHIMOTO, A. et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immunol.**, v.11, p.266-273, 1996.

AVILA-CAMPOS, M. J.; VELASQUEZ-MELENDZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 44, p. 1-5, 2002.

BALL, I.A. The 'fluoride syndrome': occult caries? **Br. Dent. J.**, v. 160, p. 75-76.

BASTING, R.T.; SERRA, M.C. Occlusal caries: diagnosis and noninvasive treatments. **Quintessence Int.**, v. 30, n. 3, p. 147-148, 1999.

BRAGA, M.M.; MENDES, F.M.; EKSTRAND, K.R. Detection and diagnosis of dental caries lesions. **Dent. Clin. North. Am.**, v. 54, n.3, 2010.

BRUNNER, E.; LANGER, F. Nonparametric analysis of ordered categorical data in designs with longitudinal observations and small sample sizes. **Biometric Journal**, v. 42, p. 663- 675, 2000.

¹ Normalização segundo ABNT NBR 14.724 / 2002

CHRISTENSEN, R.P.; PLOEGER, B.J.; PALMER, T.M. The role of pit-and-fissure discoloration in caries assessment. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, v.22, n.11A, p.996-1002, 2001.

CREANOR, S. L. et al. The prevalence of clinically undetected occlusal dentine caries in Scottish adolescents. **Br. Dent. J.**, v.169, p.126-129, 1990.

DOAN, N. et al. Molecular identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 8, p. 3043-3047, 2000.

EKSTRAND, K.R. et al. Visual and tactile assessment of arrested initial enamel carious lesions: an in vivo pilot study. **Caries Res.**, v. 39, p. 173-177, 2005.

EKSTRAND, K.R.; QVIST V.; THYLSTRUP, A. Light microscope study of the effect of probing in occlusal surfaces. **Caries Res.**; v. 21, n.4, p. 368-374, 1987.

ELDERTON, R.J. Ciclo restaurador repetitivo. In: KRIGER, L. **Promoção de saúde bucal**. São Paulo: Artes Médicas; 1997. p. 195-199.

ESPELID, I.; MEJÀRE, I.; WEERHEIJM, K. EAPD guidelines for use of radiographs in children. **Eur J Paediatr Dent**, v.4, n.1, p. 40-48, 2003.

FRENCKEN, J.E.; MAKONI, F. A treatment technique for tooth decay in deprived communities. **World Health**; v.47, p.15-17, 1994.

FRENCKEN, J. E; HOLMGREM, C.J. **Tratamento restaurador atraumático (ART) para a cárie dentária**. São Paulo: Santos, 2001.106 p.

GASPARETTO et al. Prevalence of black tooth stains and dental caries in Brazilian schoolchildren. **Braz. Dent. J.**, v.14, n.3, p. 157-161, 2003.

HAMILTON, J.C. et al. Early treatment of incipient carious lesions: a two-year clinical evaluation. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.133, n.12, p.1943-1951, 2002.

HEINRICH-WELTZIEN, R.; MONSE, B. Black stain and dental caries in Filipino schoolchildren. **Community Dent. Oral Epidemiol.**, v.37, n.2, p.182-187, 2009.

IMPARATO, J.C.P.; ROCHA, R.O.; RAGGIO, D. P. Realidades e perspectivas na Odontopediatria clínica. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. **Odontopediatria: prevenção**. São Paulo: Artes Médicas, p. 3-19, 2003.

KERR, A.R. Tooth Discoloration. 2008. Disponível em <http://emedicine.medscape.com/article/1076389-overview>. Acesso em: 01 ago 2010.

KIDD, E.A.; TAYLOR, M.N.; WILSON, R.F. Prevalence of clinically undetected and untreated molar occlusal dentine caries in adolescents on the Isle of Wight. **Caries Res.**, v.26, n.5, p.397-401, 1992.

KOCH, M.J.et al. Black stain and dental caries in schoolchildren in Potenza, Italy. **J. Dent. Child.**, v.68, n.5-6, p. 353-355, 2001.

KRAMER, P.F.; FELDENS, C.A.; ROMANO, A. R. **Promoção de saúde bucal em odontopediatria**: diagnóstico, prevenção e tratamento da cárie oclusal. São Paulo: Artes Médicas, 144p, 2000.

LEWIN, D.A. Fluoride syndrome. **Br. Dent. J.**, v. 158, p.39, 1985.

LOESCHE, W. J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v.50, n.4, p. 353-380, 1986.

LUSSI A.; FRANCESCUT, P. Performance of conventional and new methods for the detection of occlusal caries in deciduous teeth. **Caries Res.**, v. 37, p. 2-7, 2003.

MENDES, FAUSTO MEDEIROS. **Avaliação dos benefícios dos métodos radiográfico e de fluorescência a laser associados à inspeção visual na detecção de lesões de cárie em dentes decíduos**. 2010. 148f. Tese (Livre- docência em Odontopediatria)- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MOTA, L. Q. et al. Diagnóstico da cárie oclusal incipiente. **J. Bras. Odontopediatr. Odontol. Bebê**, v.5, p.321-327, 2002.

MOUNT, G. J. Minimal treatment of the carious lesion. **Int. Dent. J.**; v.41, n.1, p.55-59, 1991.

NASSIF, A.C.S.; IMPARATO, J.C.P. Atualidades e perspectivas para detecção, diagnóstico e tratamento de lesões de cárie pigmentadas de sulcos e fossetas. In: IMPARATO, J.C.P. et al. **ART. Tratamento restaurador atraumático. Técnicas de mínima intervenção para o tratamento da doença cárie dentária**. Curitiba: Maio; 2005. p. 381-389.

PALMA, R.G. **Avaliação clínica de diferentes métodos de diagnóstico de lesões de cárie de superfícies proximal e oclusal.** 1997. 128f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PECORARO, P.V.B.F.; MELLO, J.B.; REGO, M.A. Diagnóstico da cárie oclusal: Considerações comparativas entre os métodos da inspeção visual, inspeção tátil e exame radiográfico convencional. **Rev. Odontol. da Univer. Cidade de São Paulo**, v.17, n.2, p. 171-176, 2005.

PINTO, A.C.G. **Odontopediatria clínica: diagnóstico da doença cárie.** São Paulo: Artes médicas, v.11, p.33-39, 1998.

PITTS, N.B. The use of bitewing radiographs in the management of dental caries: scientific and practical considerations. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v. 25, n. 1, p. 5-16, 1996.

PITTS, N.B. Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? **Caries Res.**, v. 38, p. 294-304, 2004.

RAMIRES-ROMITO, A.C.D.; IMPARATO, J.C.P. Selamento oclusal como proposta não terapêutica: relato de um caso clínico. **J.B.P.**, v.2, n.6, p.119-125, 1999.

REID, J.S.; BEELEY, J.A.; MACDONALD, D.G. Investigations into Black Extrinsic Tooth Stain. **J. Dent. Res.**, v.56, n.8, p.895-899, 1977.

RICKETTS, D.N. et al. Relating visual and radiographic ranked scoring systems for occlusal caries detection to histological and microbiological evidence. **Oper. Dent.**, v.58, n.2, p.231-287, 2002.

RICKETTS, D.N.; KIDD, E.A.; BEIGHTON, D. Operative and microbiological validation of visual, radiographic and electronic diagnosis of occlusal caries in non-cavitated teeth judged to be in need of operative care. **Br. Dent. J.**, v.179, n.6, p.214-220, 1995.

RICKETTS, D. et al. Hidden caries: what is it? Does it exist? Does it matter? **Int. Dent. J.**, v.47, p. 259-265, 1997.

ROHR, M.; MAKINSON, O.F.; BURROW, M.F. Pits and fissures: morphology. **J. Dent. Child.**, v.58, n.2, p.97-103, 1991.

SABA et al. Black stains in the mixed dentition: a PCR microbiological study of the etiopathogenic bacteria. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 30, n.3, p.219-224, 2006.

DE SOET, J.J., DE GRAAFF, J. Microbiology of carious lesions. **Dent. Update**, v.25, n.8, p.319-324, 1998.

SOUZA-ZARONI, W.C. et al. Validity and Reproducibility of Different Combinations of Methods for Occlusal Caries Detection: An in vitro Comparison. **Caries Res.**, v. 40, p. 141-201, 2006.

STEINER, M.; HELFENSTEIN, U.; MENGHINI, G. Association of salivary mutans streptococci with discolored pits and fissures. **Community Dent. Oral. Epidemiol.**, v.26, n.6, p.412-417, 1998.

TEN CATE, J.M. Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science. **Caries Res.**, v. 38, p. 245-257, 2004.

THEILADE, J.; PANG, K.M. Scanning electron microscopy black stain on human permanent teeth. **Scanning Microsc.**, v.1, n.4, p.1983-1989, 1987.

TOLEDO, O. A. Cariologia. In:____. **Odontopediatria: fundamentos para a prática clínica**. São Paulo: Premier, p.105-126, 1996.

TOVO, M. F. **Avaliação do método fotográfico, exame visual, visual-tátil e radiográfico no diagnóstico de lesões de cárie em superfície oclusal de molares decíduos**. 1996. 131f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru. 1996.

VAN DORP, C.S.; EXTERKATE, R.A.; TEN CATE, J.M. The effect of dental probing on subsequent enamel demineralization. **J. Dent. Child.**, v.55, p.343- 347, 1988.

WEERHEIJM, K.L.; GRUYTHUYSEN, R.J.M.; VAN AMERONGEN, W.E. Prevalence of hidden caries. **J. Dent. Child.**, v.59, p.408-412, 1992.

WEERHEIJM, K.L. et al. Occlusal hidden caries: a bacteriological profile. **J. Dent. Child.**, v.59, p.428-432, 1990.

WENZEL, A.; LARSEN, M.J.; FEJERSKOV, O. Detection of occlusal caries without cavitation by visual inspection, film radiographs, xeroradiographs, and digitized radiographs. **Caries Res.**, v.25, p.365-371, 1991.

WENZEL, A. Bitewing and digital bitewing radiography for detection of caries lesions. **J. Dent. Res.**, v. 83, p. 72-75, 2004.

XIA, T.; BAUMGARTNER, J.C. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. **J. Endod.**, v. 28, p. 549-552, 2003.

YOSHIDA, A. et al. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.9, p.4438-4441, 2003.

ZADIK, Y.; BECHOR, R. Hidden occlusal caries: challenge for the dentist. **NY State Dent. J.**, v.74, n.4, p. 46-50, 2008.

A nexos

ANEXOS

ANEXO 1

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP-

OF. 137/2007
CEP
SFCD/bri

Araçatuba, 29 de outubro de 2007.

Referência Processo FOA 2007-01540

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto "ESTUDO DOS COMPORTAMENTOS CLÍNICO, RADIOGRÁFICO E MICROBIOLÓGICO DE FÓSSULAS E FISSURAS PIGMENTADAS EM MOLARES DECÍDUOS. AVALIAÇÃO LONGITUDINAL" expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado o relatório parcial em 27/10/2008 e o relatório final em 27/04/2009.

Prof. Dr. Stefan Fiúza de Carvalho Dekon
Coordenador do CEP

Ilmo. Senhor
Dr. ROBSON FREDERICO CUNHA
Araçatuba-SP-

Ciente.De acordo.

10/12/2007

Dr. Robson Frederico Cunha

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária –
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (18) 620-3203 E-mail: diretor@foa.unesp.br

ANEXO 2

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP
(Resolução nº 01 de 13/06/98 – CNS)

TERMO DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente:			
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:		Cidade:	U.F.
Telefone:		CEP:	

1. Responsável Legal:			
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento:	
Endereço:		Cidade:	U.F.
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):			

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Título do protocolo de pesquisa: Estudo dos comportamentos clínico, radiográfico e microbiológico de fósulas e fissuras pigmentadas em molares decíduos. Avaliação longitudinal.		
1. Pesquisador responsável: Janaína Zavitoski Silva		
Cargo/função: Pós-graduanda	Inscr.Cons.Regional: 79.072	Unidade ou Departamento do Solicitante: Departamento de Odontologia Infantil e Social
3. Avaliação do risco da pesquisa: (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo).		
<input checked="" type="checkbox"/> X SEM RISCO <input type="checkbox"/> RISCO MÍNIMO <input type="checkbox"/> RISCO MÉDIO <input type="checkbox"/> RISCO MAIOR		
4. Justificativa e os objetivos da pesquisa (explicitar): Justifica-se o presente estudo por tratar de um tema atual e polêmico, no qual se pretende contribuir com o número de pesquisas que abordam o diagnóstico e manejo de fósulas e fissuras pigmentadas em molares decíduos. Acrescenta-se ainda, a possibilidade concreta de executar este estudo <i>in vivo</i> de forma longitudinal e a associação da metodologia de análise clínica e microbiológica, propiciando maior confiabilidade aos resultados. Os objetivos da pesquisa são: <ul style="list-style-type: none"> • Verificar os comportamentos clínico, radiográfico e microbiológico de fósulas e fissuras pigmentadas de molares decíduos; • Relacionar: <ul style="list-style-type: none"> ✓ a coloração e textura das fósulas e fissuras, bem como a distribuição da pigmentação na superfície oclusal com o desenvolvimento de cavidade cariada; ✓ os aspectos clínicos (textura, cor e distribuição) com a presença ou não de imagem radiolúcida em esmalte e/ou dentina; os achados clínico-radiográficos com os aspectos quantitativos e qualitativos da microbiota que coloniza a região de fósulas e fissuras dos dentes acometidos e controles (sem pigmentação ou comprometimento nas fósulas e fissuras).		

5. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: (explicitar) Previamente à realização da pesquisa o projeto será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa
--

Humana da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- Unesp, sendo sua parte experimental realizada a partir da aprovação do mesmo e da obtenção do consentimento livre e esclarecido dos responsáveis pelos pacientes participantes.

1. Grupo amostral

Faz-se fundamental relatar a característica da amostra utilizada para esta pesquisa que apresentará um delineamento retrospectivo e longitudinal. Participarão da presente pesquisa pacientes na faixa de 3 a 10 anos de idade que freqüentam a Clínica de Prevenção da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-Unesp. A referida clínica possui atualmente 500 pacientes regularmente matriculados e estima-se selecionar aproximadamente 150 destes, em que se espera obter uma média de 300 dentes para o estudo.

Convém ressaltar que todos estes pacientes iniciaram a assistência odontológica no Programa da Bebê-Clínica (para pacientes de 0 a 4 anos de idade) e que foi durante esta fase que realizou-se o diagnóstico e posterior registro da presença de molares decíduos com fóssulas e fissuras pigmentadas (marrom ou preto).

2. Critérios de inclusão

Incluir-se-ão no estudo pacientes saudáveis que apresentarem os molares decíduos com as fóssulas e fissuras parcial ou completamente pigmentadas (marrom ou preto), considerando as superfícies oclusais, vestibulares, linguais (molares inferiores) e palatinas (molares superiores).

3. Critérios de exclusão

Por ocasião do exame clínico inicial, serão excluídos do estudo aqueles pacientes que:

✓ Apresentarem alguma lesão de cárie com cavitação em qualquer superfície do dente avaliado;

✓ Pela análise anamnésica for verificada que a pigmentação das fóssulas e fissuras deve-se a outras razões como ingestão de medicamentos e/ou uso de produtos odontológicos (solução cariostática);

✓ E os que por livre e espontânea vontade não desejarem participar da pesquisa.

4. Exame clínico

Os pacientes selecionados receberão previamente ao exame clínico uma profilaxia dental com pedra pomes e água utilizando-se uma escova de Robinson (Microdont, Micro Usinagem de Precisão Ltda, Socorro, São Paulo, Brasil), acoplada em motor de baixa rotação e contra-ângulo (Dabi Atlante Indústria de Equipamentos Médicos e Odontológicos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) para remoção do biofilme dental. A seguir, será realizado o exame clínico, visual e tátil, do dente que apresente pigmentação em alguma de suas fóssulas e fissuras com iluminação artificial do campo operatório, espelho clínico e uma sonda exploradora com extremidade romba (Organização Mundial da Saúde).

Os pacientes selecionados terão os molares decíduos registrados em ficha específica elaborada pelos pesquisadores. Esta consta, primeiramente, dos seguintes dados clínicos: o dente e a respectiva superfície envolvida, a data inicial da observação da pigmentação e o tratamento instituído (monitoramento, selante ou restauração). A seguir, registrar-se-ão as características da pigmentação: distribuição na superfície oclusal (parcial ou abrangendo toda a fissura), coloração (preto ou marrom), textura (dura e seca ou amolecida e úmida) e o desenvolvimento de lesão cavitada após o início da pesquisa. As avaliações clínicas serão realizadas por um único examinador, em intervalos de 6 meses, durante um período mínimo de 18 meses.

5. Exame radiográfico

Concomitantemente ao exame clínico, será realizado exame radiográfico interproximal dos molares decíduos com fóssulas e fissuras pigmentadas. Para a obtenção das radiografias interproximais, será utilizado o aparelho Spectro II (Dabi Atlante), filme radiográfico Kodak INSIGHT - Eastman Kodak Company, New York, USA - com tempo de exposição de 0,5 segundos. As radiografias serão posicionadas com o auxílio de um posicionador radiográfico interproximal infantil (INDUSBELLO Ind. de Instrumentos Odontológicos Ltda, Londrina, Paraná, Brasil). O procedimento de revelação e fixação das mesmas será realizado de acordo com o método temperatura-tempo. Além dos exames clínico e radiográfico, será coletado biofilme do sulco pigmentado e submetido à análise microbiológica.

6. Desconfortos e riscos esperados: (explicitar)

Não haverá desconfortos, nem riscos para o paciente.

7. Benefícios que poderão ser obtidos: (explicitar)

A pesquisa objetiva um acompanhamento longitudinal dos pacientes, a fim de buscar um tratamento conservador em detrimento ao restaurador.

8. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: (explicitar)

Não há procedimentos alternativos.

9. Duração da pesquisa: A partir da aprovação pelo CEP, a pesquisa durará 18 meses.

10. Aprovação do Protocolo de pesquisa pelo comitê de ética para análise de projetos de pesquisa em

/ /

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

1. Recebi esclarecimentos sobre a garantia de resposta a qualquer pergunta, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo.
2. Recebi esclarecimentos sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar no estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu tratamento.
3. Recebi esclarecimento sobre compromisso de que minha identificação se manterá confidencial tanto quanto a informação relacionada com a minha privacidade.
4. Recebi esclarecimento sobre a disposição e o compromisso de receber informações obtidas durante o estudo, quando solicitada, ainda que possa afetar minha vontade em continuar participando da pesquisa.
5. Recebi esclarecimento sobre a disponibilidade de assistência no caso de complicações e danos decorrentes da pesquisa.
Observações complementares.

IV – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador, conforme registro nos itens 1 a 6 do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Araçatuba, 06 de dezembro de 2007.

Assinatura

Testemunha

Nome:

Endereço.:

Telefone .:

R.G.:

Testemunha

Nome:

Endereço.:

Telefone .:

R.G.:

ANEXO 3

1 IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____

Naturalidade: _____ Estado: _____

Data de nascimento: _____

Prontuário: _____

Nome da mãe: _____

Local de trabalho: _____ Telefone: _____

Nome do pai: _____

Local de trabalho: _____ Telefone: _____

Endereço (paciente): _____

Bairro: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone residencial(s) _____

Telefone- recado _____

Escola em que estuda: _____

Período: () matutino () vespertino

Nome de algum parente/vizinho: _____

Endereço 2: _____

Bairro: _____ CEP: _____

Telefone(s) _____

2 HISTÓRIA MÉDICA

2.1 O paciente está tomando algum medicamento atualmente? () Sim () Não

Em caso afirmativo, qual? _____

2.2 O paciente apresenta alguma doença crônica? () Sim () Não

Em caso afirmativo, qual? _____

3 EXAME CLÍNICO VISUAL E TÁTIL: CARACTERÍSTICAS DO SULCO PIGMENTADO

DATA DO DIAGNÓSTICO: ____/____/____

AVALIAÇÃO: ____/____/____

3.1 DENTE E SUPERFÍCIE ACOMETIDA

Arco superior

() 54 () O () OP () OV () P () V

() 55 () O () OP () OV () P () V

() 64 () O () OP () OV () P () V

() 65 () O () OP () OV () P () V

Arco inferior

() 74 () O () OP () OV () P () V

() 75 () O () OP () OV () P () V

() 84 () O () OP () OV () P () V

() 85 () O () OP () OV () P () V

3.2 DISTRIBUIÇÃO NA SUPERFÍCIE

Arco superior

() 54 () Parcial () Total () Pontos separados

() 55 () Parcial () Total () Pontos separados

() 64 () Parcial () Total () Pontos separados

() 65 () Parcial () Total () Pontos separados

Arco inferior

() 74 () Parcial () Total () Pontos separados

() 75 () Parcial () Total () Pontos separados

() 84 () Parcial () Total () Pontos separados

() 85 () Parcial () Total () Pontos separados

3.3 COR

Arco superior

() 54 () Marrom () Preta

() 55 () Marrom () Preta

() 64 () Marrom () Preta

() 65 () Marrom () Preta

Arco inferior

() 74 () Marrom () Preta

() 75 () Marrom () Preta

() 84 () Marrom () Preta

() 85 () Marrom () Preta

3.4 TEXTURA

Arco superior

() 54 () Dura () Amolecida

() 55 () Dura () Amolecida

() 64 () Dura () Amolecida

() 65 () Dura () Amolecida

Arco inferior

() 74 () Dura () Amolecida

() 55 () Dura () Amolecida

() 84 () Dura () Amolecida

() 85 () Dura () Amolecida

3.5 CAVITAÇÃO

Arco superior

() 54 () Presente () Ausente

() 55 () Presente () Ausente

() 64 () Presente () Ausente

() 65 () Presente () Ausente

Arco inferior

() 74 () Presente () Ausente

() 75 () Presente () Ausente

() 84 () Presente () Ausente

() 85 () Presente () Ausente

3.6 TRATAMENTO

Arco superior

() 54 () Selante () Restauração () Monitoramento

() 55 () Selante () Restauração () Monitoramento

() 64 () Selante () Restauração () Monitoramento

() 65 () Selante () Restauração () Monitoramento

Arco inferior

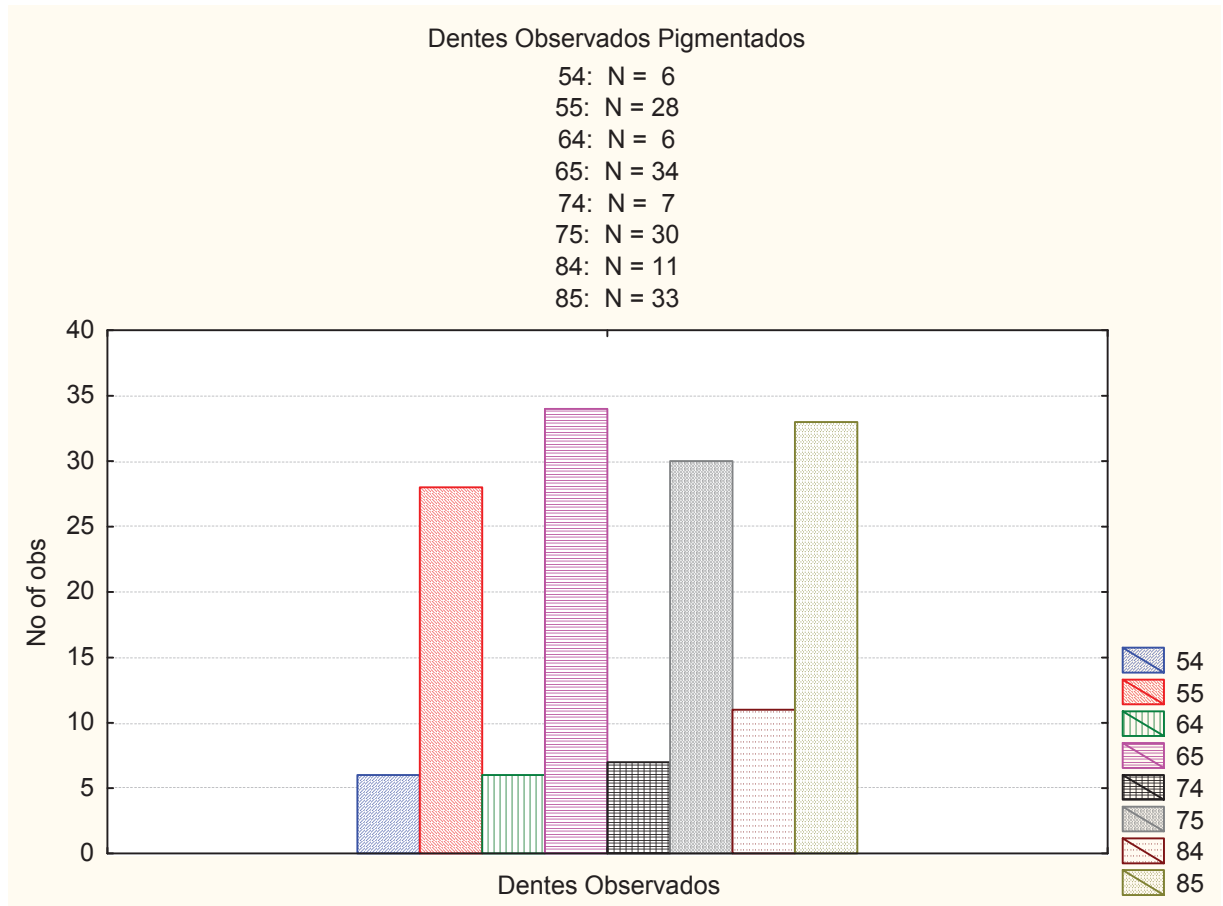
() 74 () Selante () Restauração () Monitoramento

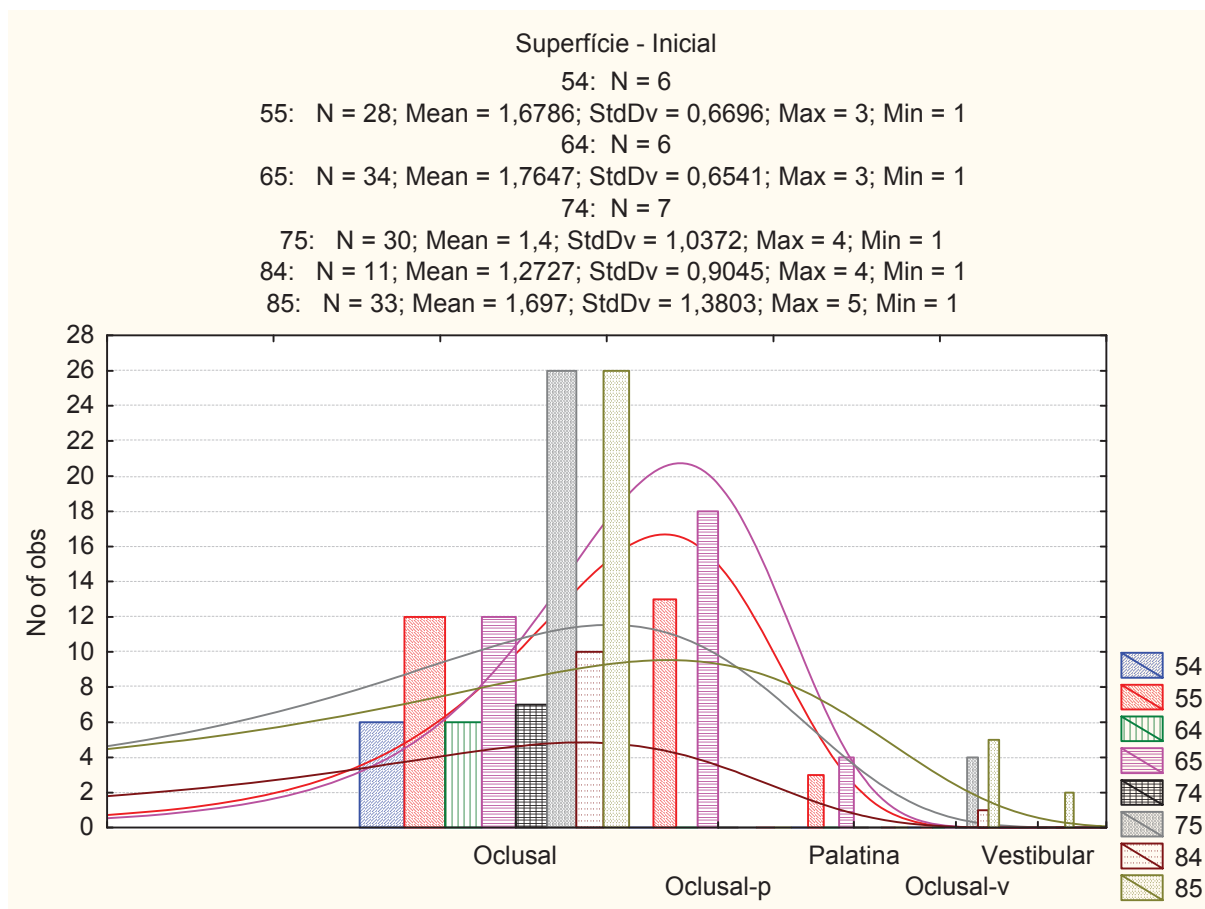
() 75 () Selante () Restauração () Monitoramento

() 84 () Selante () Restauração () Monitoramento

() 85 () Selante () Restauração () Monitoramento

ANEXO 4

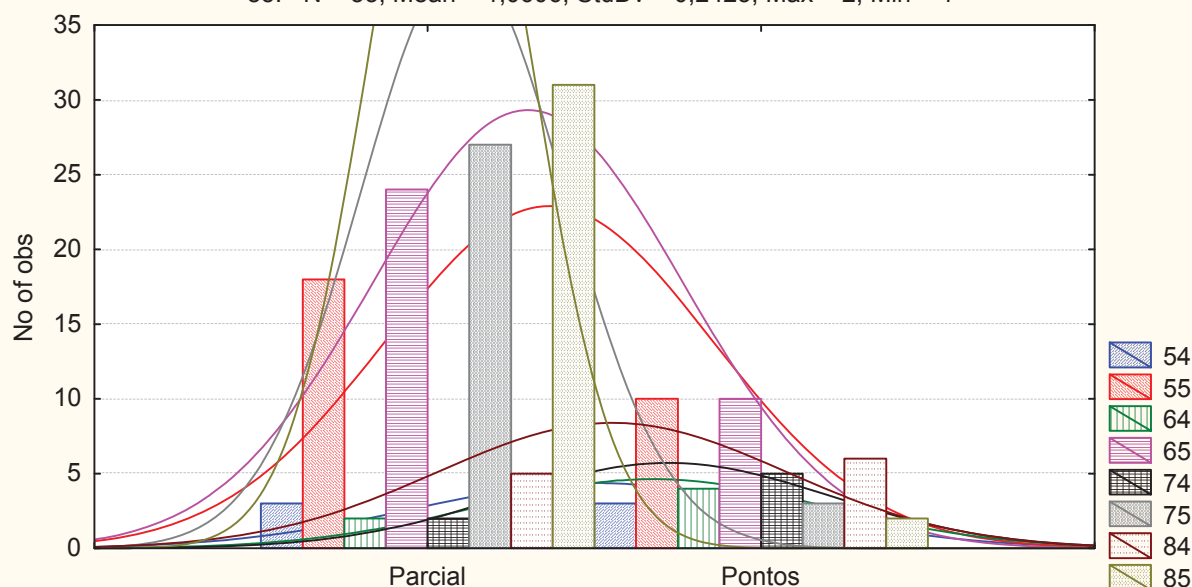




Tests of Normality (Dados iniciais do supig agrupad in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
55	28	0,273123	p < 0,05	p < 0,01
64	6	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
65	34	0,287537	p < 0,01	p < 0,01
74	7	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
75	30	0,516785	p < 0,01	p < 0,01
84	11	0,527579	p < 0,01	p < 0,01
85	33	0,481075	p < 0,01	p < 0,01

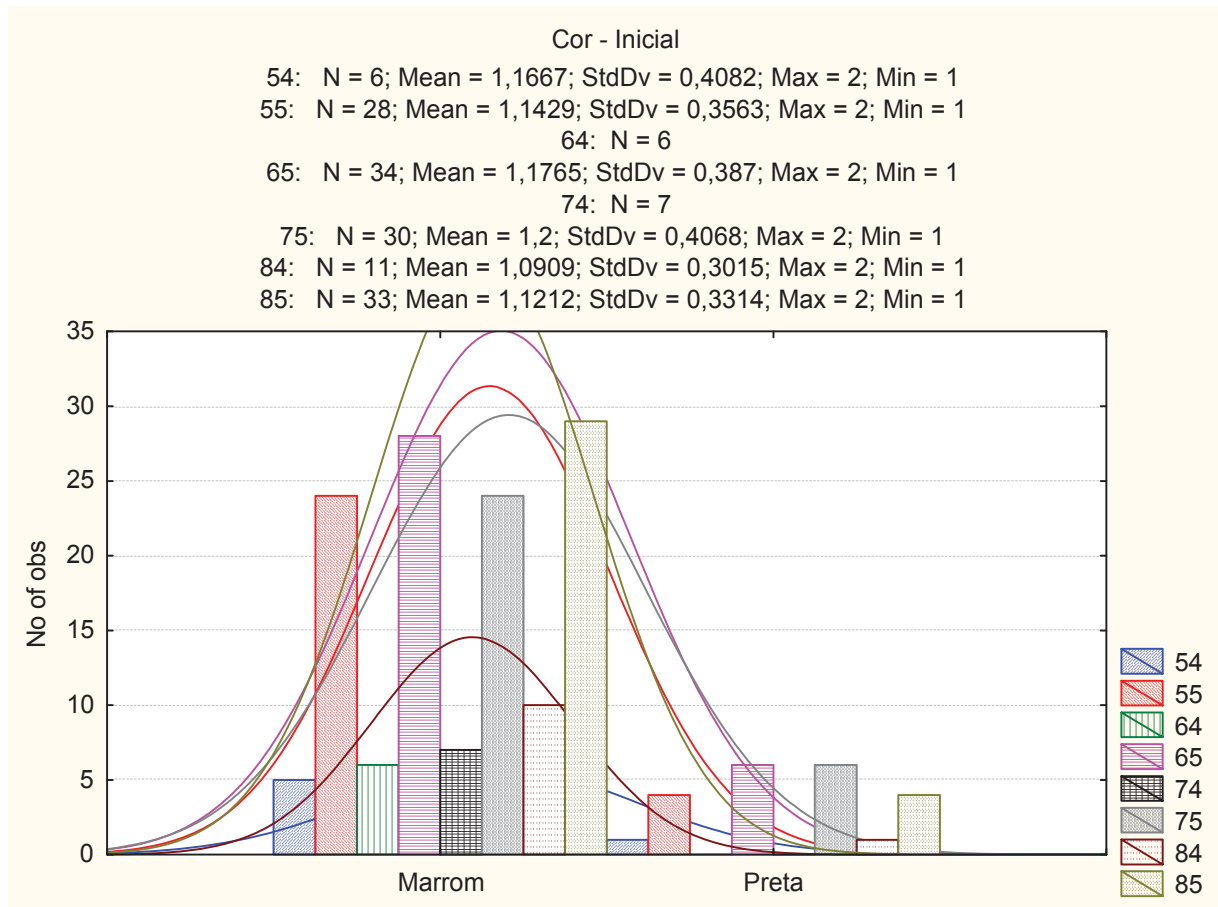
Distribuição - Inicial

54: N = 6; Mean = 1,5; StdDv = 0,5477; Max = 2; Min = 1
 55: N = 28; Mean = 1,3571; StdDv = 0,488; Max = 2; Min = 1
 64: N = 6; Mean = 1,6667; StdDv = 0,5164; Max = 2; Min = 1
 65: N = 34; Mean = 1,2941; StdDv = 0,4625; Max = 2; Min = 1
 74: N = 7; Mean = 1,7143; StdDv = 0,488; Max = 2; Min = 1
 75: N = 30; Mean = 1,1; StdDv = 0,3051; Max = 2; Min = 1
 84: N = 11; Mean = 1,5455; StdDv = 0,5222; Max = 2; Min = 1
 85: N = 33; Mean = 1,0606; StdDv = 0,2423; Max = 2; Min = 1

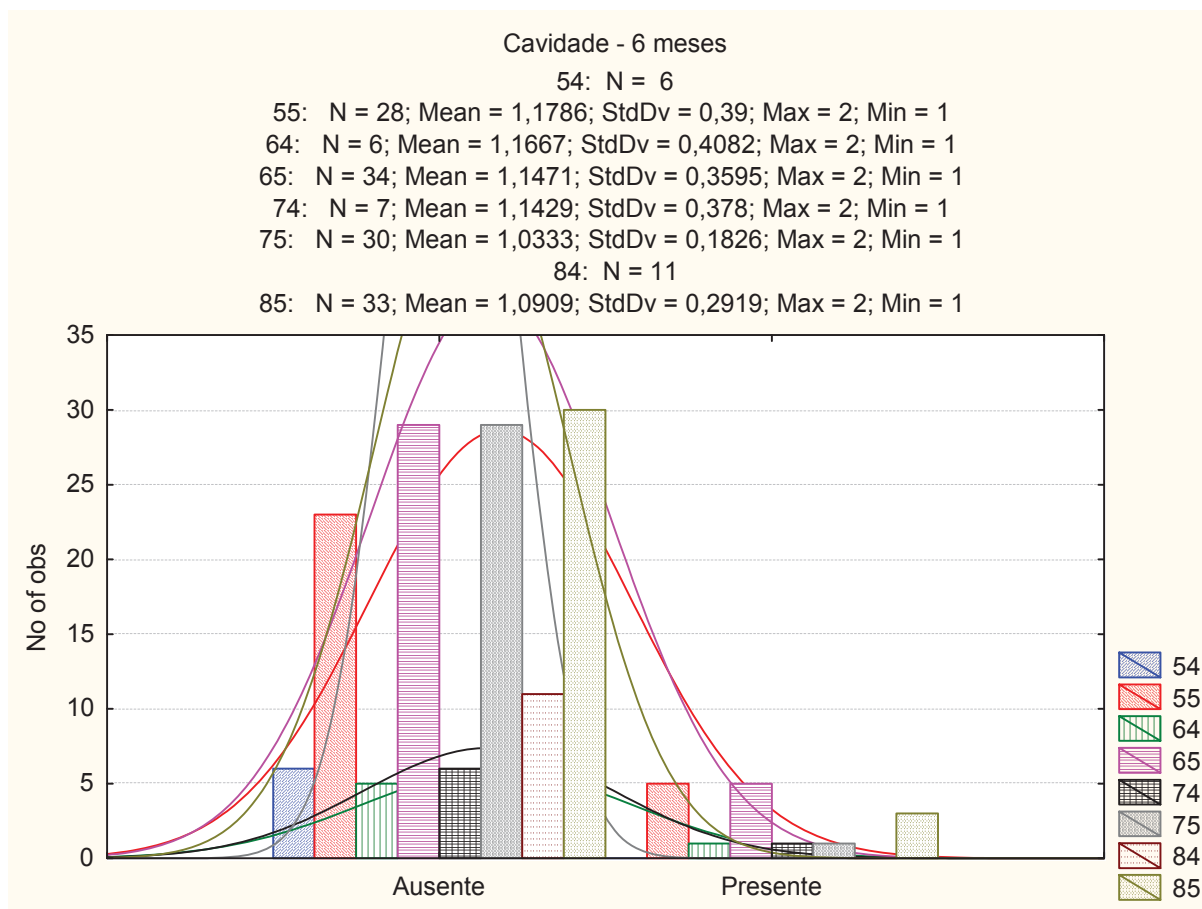


Tests of Normality (Dados iniciais do supig agrupad in teste1.stw)

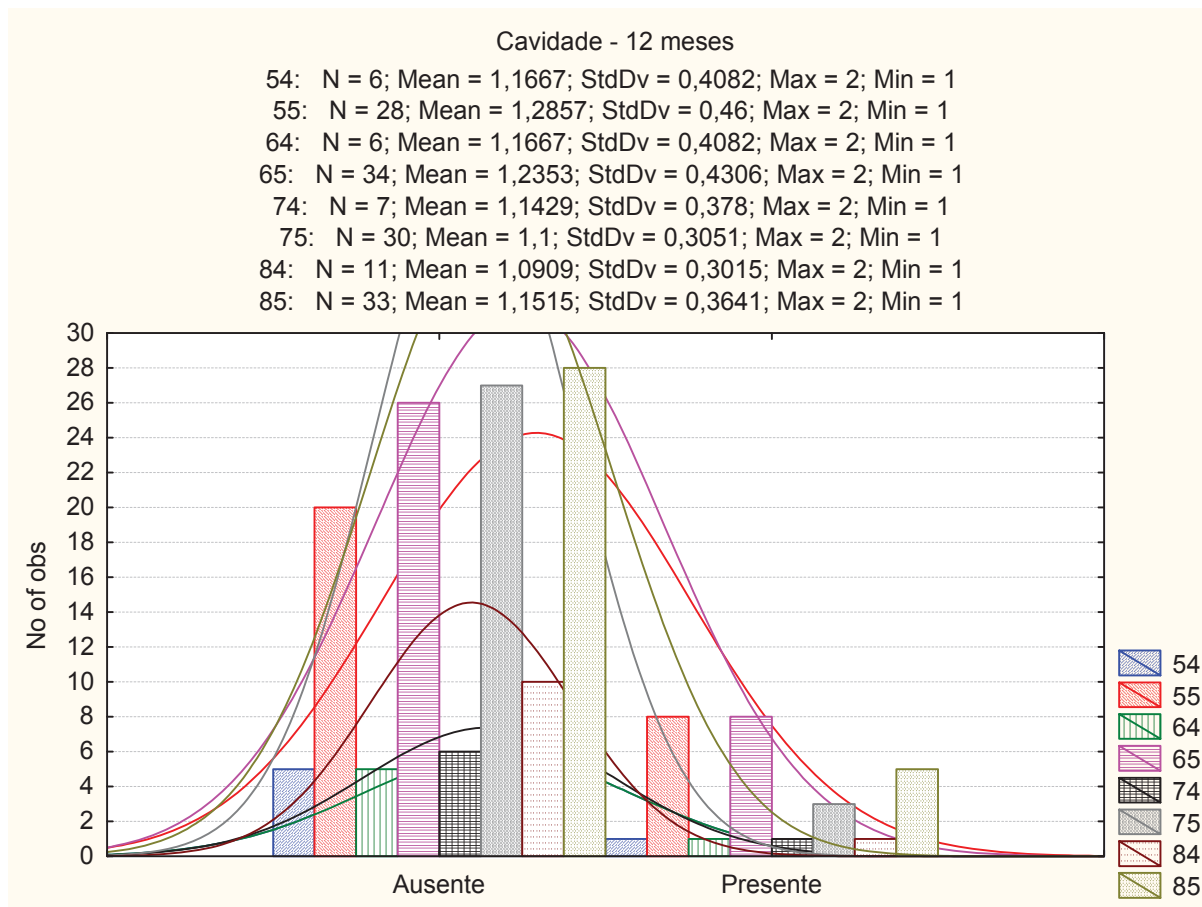
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	0,319345	p > 0,20	p < 0,05
55	28	0,410750	p < 0,01	p < 0,01
64	6	0,407364	p > 0,20	p < 0,01
65	34	0,443473	p < 0,01	p < 0,01
74	7	0,435193	p < 0,15	p < 0,01
75	30	0,528442	p < 0,01	p < 0,01
84	11	0,353410	p < 0,10	p < 0,01
85	33	0,538147	p < 0,01	p < 0,01



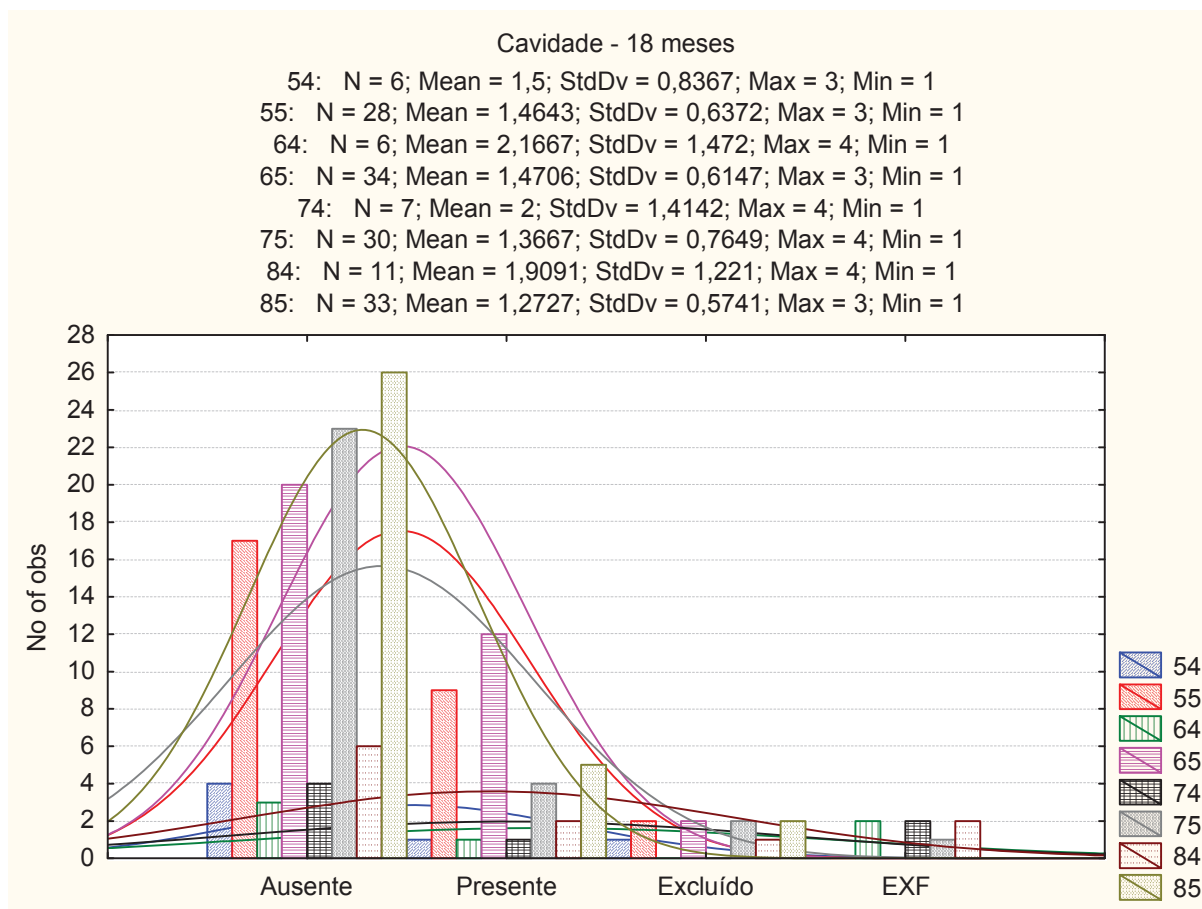
Tests of Normality (Dados iniciais do supig agrupad in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	0,491788	p < 0,0,1	p < 0,01
55	28	0,512893	p < 0,01	p < 0,01
64	6	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
65	34	0,499353	p < 0,01	p < 0,01
74	7	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
75	30	0,488498	p < 0,01	p < 0,01
84	11	0,527579	p < 0,01	p < 0,01
85	33	0,521501	p < 0,01	p < 0,001



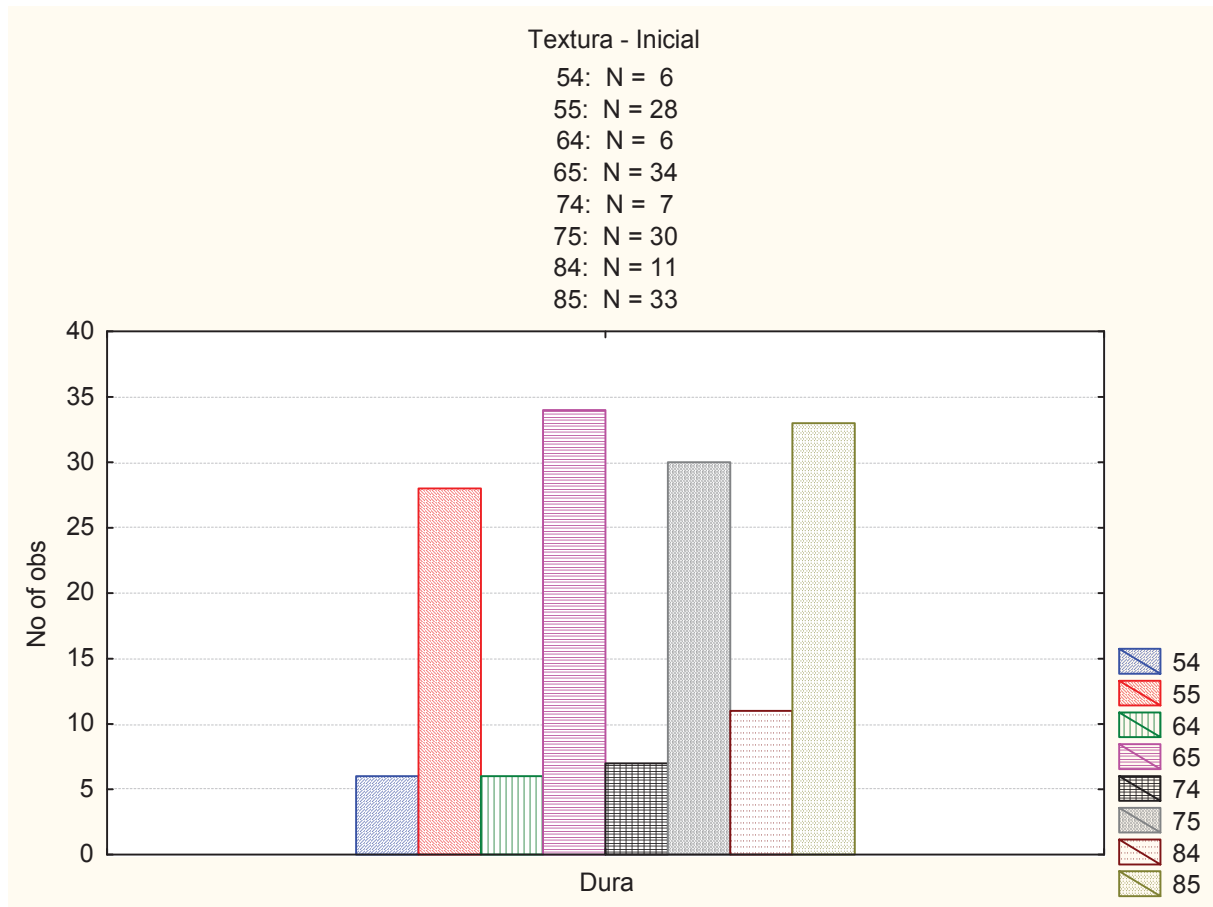
Tests of Normality (Dados de 6 meses in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
55	28	0,497899	p < 0,01	p < 0,01
64	6	0,491788	p < 0,10	p < 0,01
65	34	0,511699	p < 0,01	p < 0,01
74	7	0,504414	p < 0,05	p < 0,01
75	30	0,539101	p < 0,01	p < 0,01
84	11	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
85	33	0,531342	p < 0,01	p < 0,01



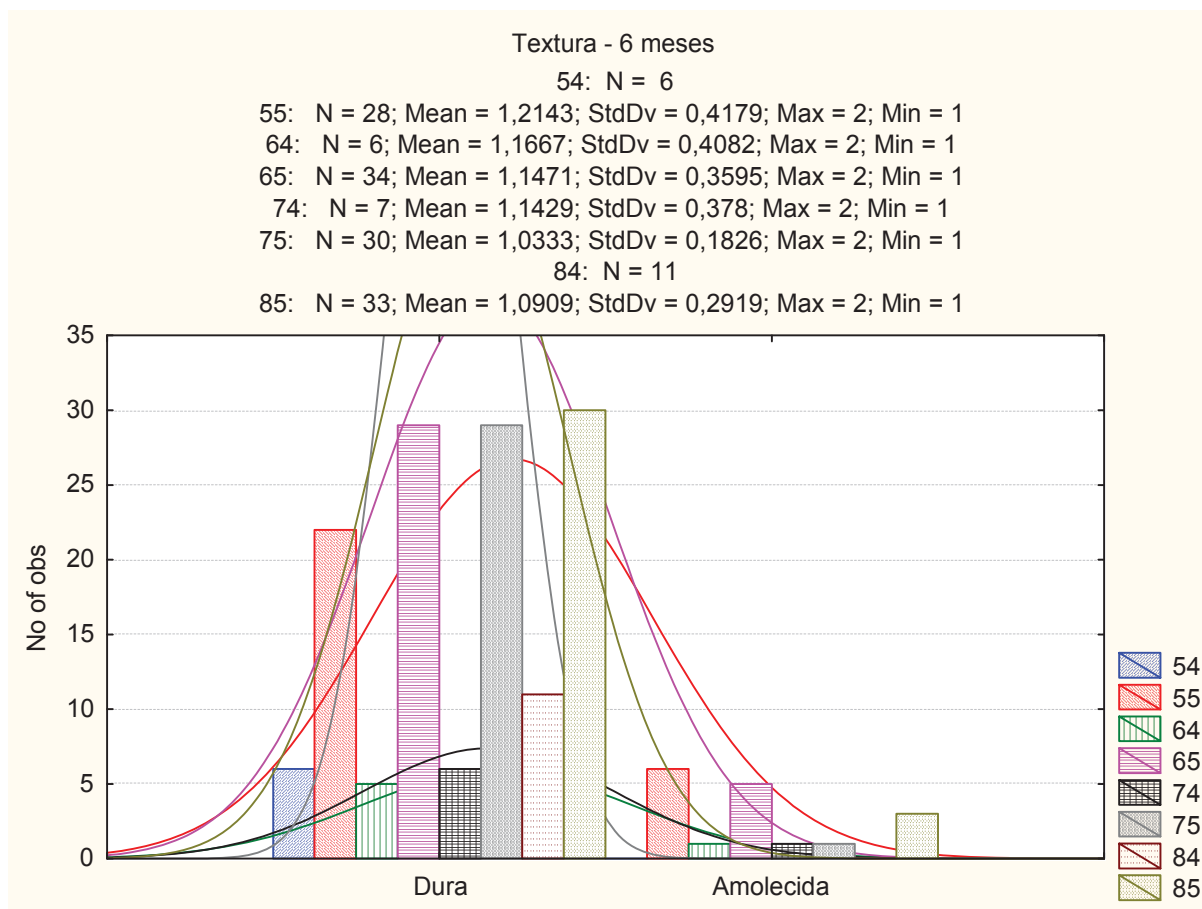
Tests of Normality (Dados de 12 meses in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	0,491788	p < 0,10	p < 0,01
55	28	0,447005	p < 0,01	p < 0,01
64	6	0,491788	p < 0,10	p < 0,01
65	34	0,472339	p < 0,01	p < 0,01
74	7	0,504414	p < 0,05	p < 0,01
75	30	0,528442	p < 0,01	p < 0,01
84	11	0,527579	p < 0,01	p < 0,01
85	33	0,509826	p < 0,01	p < 0,01



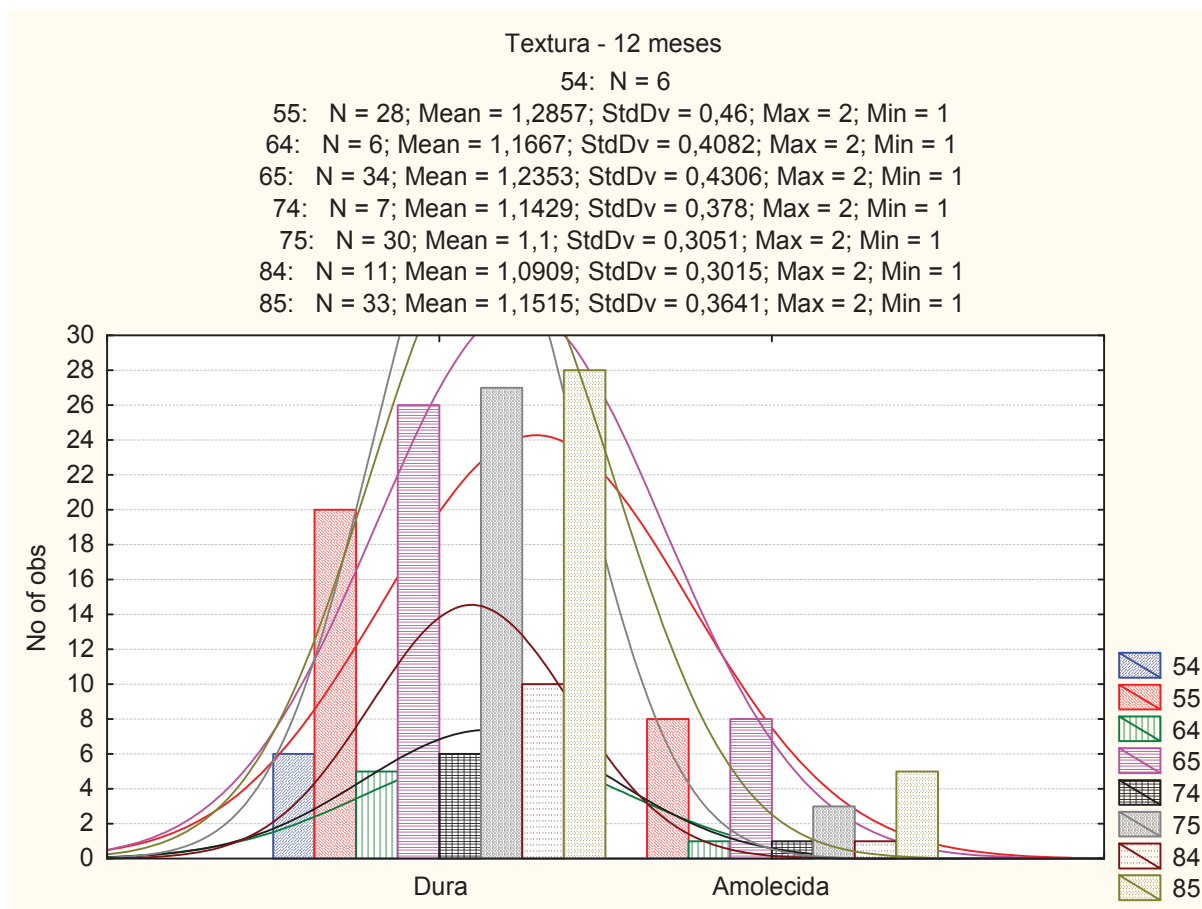
Tests of Normality (Dados de 18 meses in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	0,391618	p > 0,20	p < 0,01
55	28	0,374013	p < 0,01	p < 0,01
64	6	0,285993	p > 0,20	p < 0,15
65	34	0,366253	p < 0,01	p < 0,01
74	7	0,331679	p > 0,20	p < 0,05
75	30	0,450829	p < 0,01	p < 0,01
84	11	0,317176	p < 0,20	p < 0,01
85	33	0,470515	p < 0,01	p < 0,01



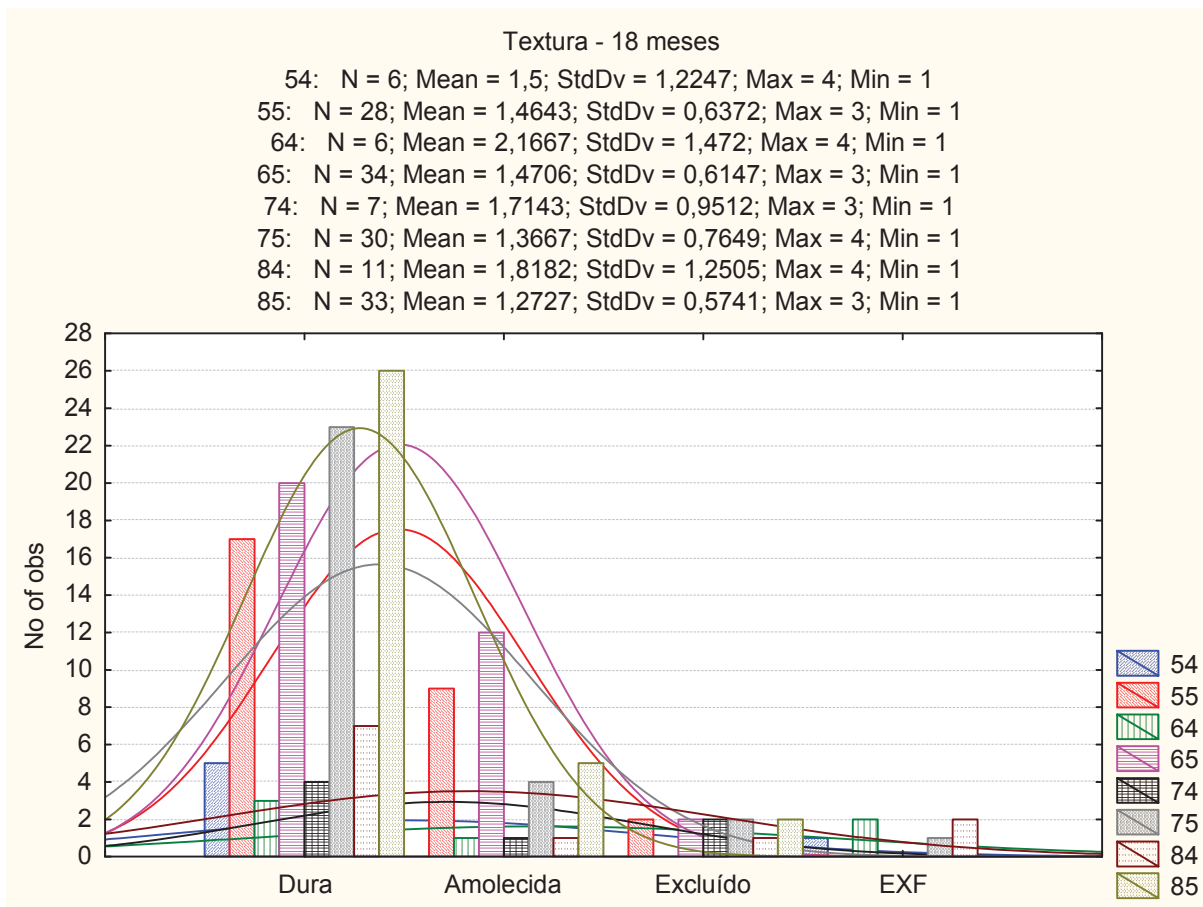
Tests of Normality (Dados iniciais do supig agrupad in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
55	28	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
64	6	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
65	34	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
74	7	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
75	30	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
84	11	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
85	33	1,000000	p < 0,01	p < 0,01



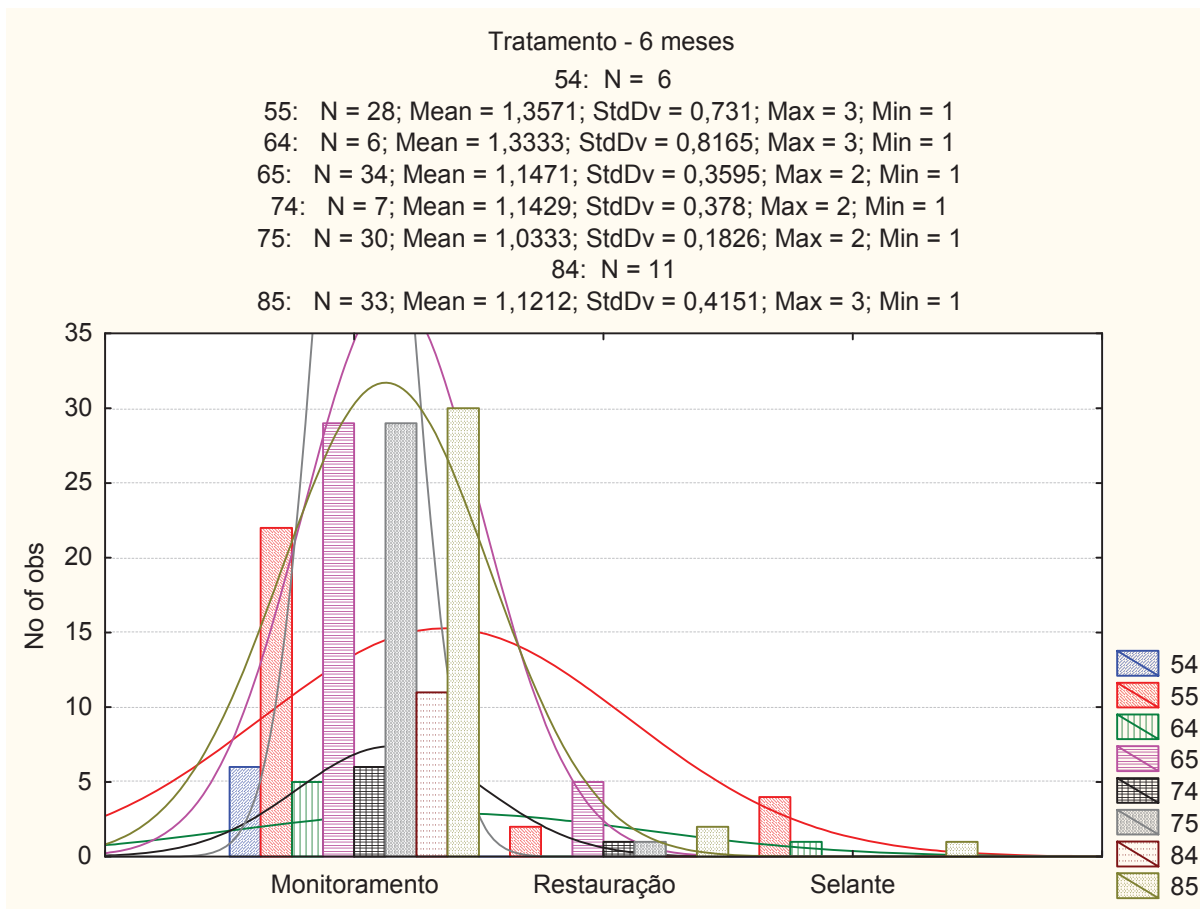
Tests of Normality (Dados de 6 meses in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
55	28	0,481677	p < 0,01	p < 0,01
64	6	0,491788	p < 0,10	p < 0,01
65	34	0,511699	p < 0,01	p < 0,01
74	7	0,504414	p < 0,05	p < 0,01
75	30	0,539101	p < 0,01	p < 0,01
84	11	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
85	33	0,531342	p < 0,01	p < 0,01



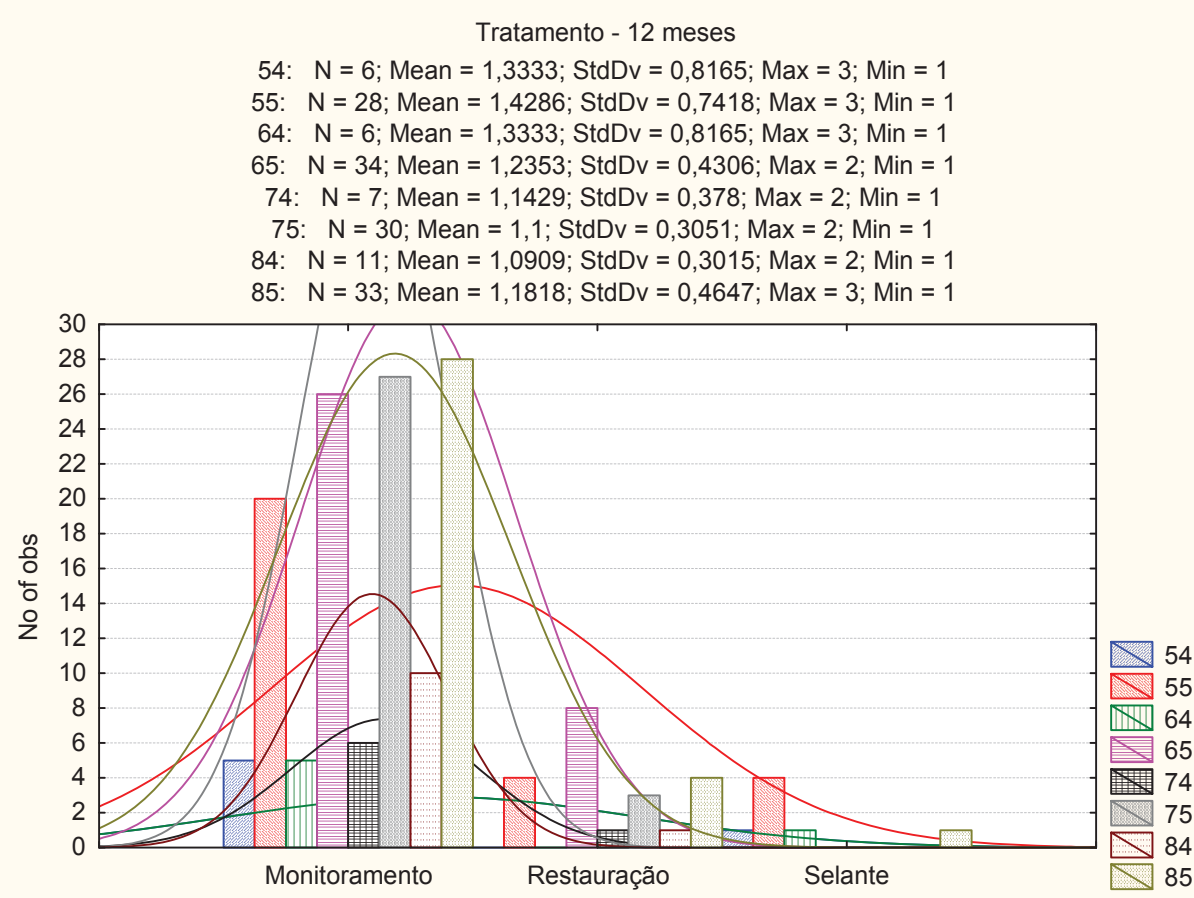
Tests of Normality (Dados de 12 meses in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
55	28	0,447005	p < 0,01	p < 0,01
64	6	0,491788	p < 0,10	p < 0,01
65	34	0,472339	p < 0,01	p < 0,01
74	7	0,504414	p < 0,05	p < 0,01
75	30	0,528442	p < 0,01	p < 0,01
84	11	0,527579	p < 0,01	p < 0,01
85	33	0,509826	p < 0,01	p < 0,01



Tests of Normality (Dados de 18 meses in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
55	28	0,374013	p < 0,01	p < 0,01
64	6	0,285993	p > 0,20	p < 0,15
65	34	0,366253	p < 0,01	p < 0,01
74	7	0,345084	p > 0,20	p < 0,05
75	30	0,450829	p < 0,01	p < 0,01
84	11	0,379907	p < 0,10	p < 0,01
85	33	0,470515	p < 0,01	p < 0,01



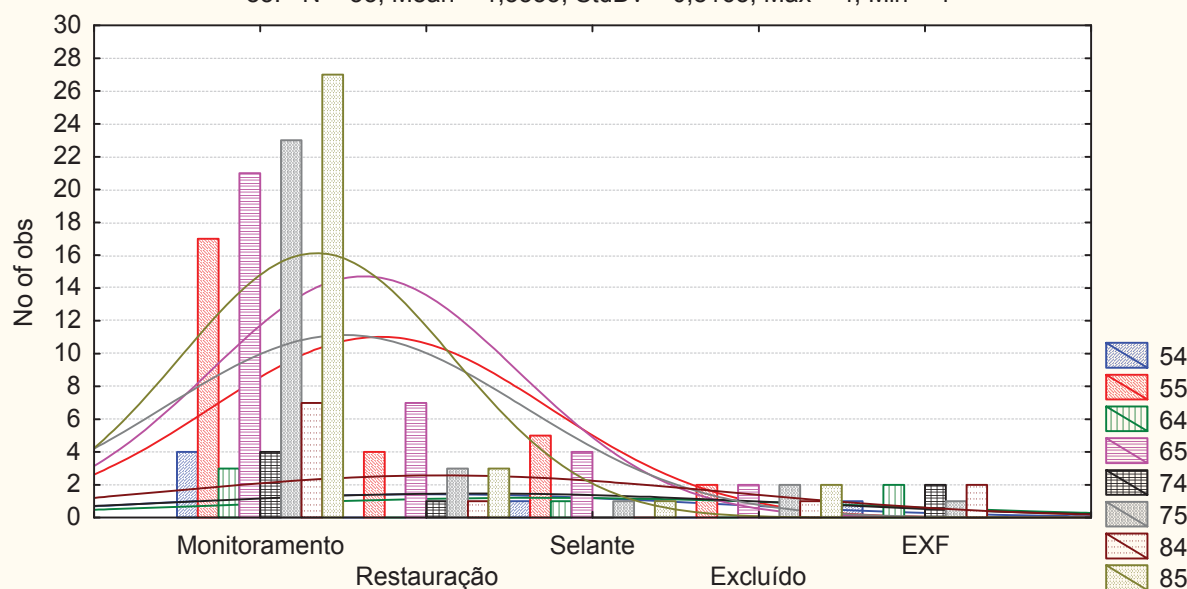
Tests of Normality (Dados de 6 meses in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
55	28	0,473135	p < 0,01	p < 0,01
64	6	0,491788	p < 0,10	p < 0,01
65	34	0,511699	p < 0,01	p < 0,01
74	7	0,504414	p < 0,05	p < 0,01
75	30	0,539101	p < 0,01	p < 0,01
84	11	1,000000	p < 0,01	p < 0,01
85	33	0,523937	p < 0,01	p < 0,01



Tests of Normality (Dados de 12 meses in teste1.stw)				
	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	0,491788	p < 0,10	p < 0,01
55	28	0,432568	p < 0,01	p < 0,01
64	6	0,491788	p < 0,10	p < 0,01
65	34	0,472339	p < 0,01	p < 0,01
74	7	0,504414	p < 0,05	p < 0,01
75	30	0,528442	p < 0,01	p < 0,01
84	11	0,527579	p < 0,01	p < 0,01
85	33	0,500694	p < 0,01	p < 0,01

Tratamento - 18 meses

54: N = 6; Mean = 2; StdDv = 1,6733; Max = 5; Min = 1
 55: N = 28; Mean = 1,7143; StdDv = 1,0131; Max = 4; Min = 1
 64: N = 6; Mean = 2,6667; StdDv = 1,9664; Max = 5; Min = 1
 65: N = 34; Mean = 1,6176; StdDv = 0,9216; Max = 4; Min = 1
 74: N = 7; Mean = 2,2857; StdDv = 1,8898; Max = 5; Min = 1
 75: N = 30; Mean = 1,5; StdDv = 1,0748; Max = 5; Min = 1
 84: N = 11; Mean = 2,0909; StdDv = 1,7003; Max = 5; Min = 1
 85: N = 33; Mean = 1,3333; StdDv = 0,8165; Max = 4; Min = 1



Tests of Normality (Dados de 18 meses in teste1.stw)

	N	max D	K-S - p	Lilliefors - p
54	6	0,391618	p > ,20	p < ,01
55	28	0,366744	p < ,01	p < ,01
64	6	0,301664	p > ,20	p < ,10
65	34	0,366275	p < ,01	p < ,01
74	7	0,323283	p > ,20	p < ,05
75	30	0,445775	p < ,01	p < ,01
84	11	0,375801	p < ,10	p < ,01
85	33	0,476636	p < ,01	p < ,01

Variable	Friedman ANOVA and Kendall Coeff. of Concordance (dente65.sta) ANOVA Chi Sqr. (N = 34, df = 6) = 162,4259 p =0,00000 Coeff. of Concordance = ,79621 Aver. rank r = ,79003			
	Average Rank	Sum of Ranks	Mean	Std.Dev.
Cor	1,441176	49,0000	1,1765	0,386953
Distribuição	4,294118	146,0000	101,2941	0,462497
Superfície	4,808824	163,5000	101,5882	0,701412
Textura	5,132353	174,5000	101,7059	0,578892
Cavidade	5,132353	174,5000	101,7059	0,578892
Tratamento	5,632353	191,5000	102,0294	0,758199
sexo	1,558824	53,0000	1,2941	0,462497