



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



VIVIANE ELISÂNGELA GOMES

Cirurgiã Dentista

**CHUMBO NO ESMALTE DENTÁRIO COMO INDICADOR
BIOLÓGICO DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL E SUA RELAÇÃO COM
DEFEITOS DO ESMALTE E CÁRIE EM DENTES DECÍDUOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Doutor em Odontologia, Área de
Cariologia.

200413883

PIRACICABA

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



VIVIANE ELISÂNGELA GOMES

Cirurgiã Dentista

**CHUMBO NO ESMALTE DENTÁRIO COMO INDICADOR
BIOLÓGICO DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL E SUA RELAÇÃO COM
DEFEITOS DO ESMALTE E CÁRIE EM DENTES DECÍDUOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia, Área de Cariologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Sousa

Co-orientador:

Prof. Dr. Jaime A. Cury

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edelcio Gonçalves de Souza

Prof. Dr. Heleno Rodrigues Corrêa Filho

Prof. Dr. Laerte Luiz Bremm

Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Sousa

Prof. Dr. Ronaldo Seichi Wada

Este exemplar foi devidamente homologado
de acordo com a Resolução 06/08.04
Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2004

UNIDADE	FR
Nº CHAMADA	
	UNICAMP
	G585c
V	EX
TOMBO BC/	59718
PROC.	6.117.04
C	☐
D	☒
PREÇO	24,00
DATA	
Nº CPD	

316 id 322959

Ficha Catalográfica

G585c Gomes, Viviane Elisângela.
 Chumbo no esmalte dentário como indicador biológico de exposição ambiental e sua relação com defeitos do esmalte e cárie em dentes decíduos. / Viviane Elisângela Gomes. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
 xi, 70f. : il.

Orientador: Profª Drª Maria da Luz Rosário de Sousa.
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Meio ambiente. 2. Metais Pesados. 3. Epidemiologia. 4. Odontologia. 5. Pré-escolares. I. Sousa, Maria da Luz Rosário de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 17 de Junho de 2004, considerou a candidata VIVIANE ELISÂNGELA GOMES aprovada.

1. Profa. Dra. MARIA DA LUZ ROSARIO DE SOUSA

2. Prof. Dr. LAERTE LUIZ BREMM

3. Prof. Dr. EDELCIO GONÇALVES DE SOUZA

4. Prof. Dr. HELENO RODRIGUES CORRÊA FILHO

5. Prof. Dr. RONALDO SEICHI WADA

A Deus e ao meu Anjo da Guarda,

por me darem coragem de tentar e iluminarem minha mente

À minha família,

meus pais, Nelson e Selma,

que sempre com muito amor me ensinaram a viver

meus irmãos, Rogério e Tatiane,

pelo amor, companheirismo e incentivo

Aos meus amigos,

que tornam a minha existência mais leve a cada dia

dedico este trabalho.

Agradecimento especial

À Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Sousa
por me orientar neste grandioso empreendimento da minha vida,
pela estimável contribuição para minha formação e
principalmente pela paciência e amizade
Muito obrigada.

À Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach,
pela ajuda, amizade e estímulo.

Ao Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury,
pelos ensinamentos e exemplo.

Aos mestres com carinho.

Agradecimentos

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz.

Ao Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Ao Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho, Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Profa. Dra. Maria Cristina Volpato.

Ao Prof. Dr. Laerte Luiz Bremm Coordenador do Curso de Odontologia da Universidade Paranaense (UNIPAR) *campus* Cascavel pela oportunidade, dedicação e acolhida.

Aos queridos colegas Professores do Curso de Odontologia da UNIPAR *campus* Cascavel pela acolhida e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Cariologia e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos, fundamental para minha manutenção em Piracicaba.

À Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião pela orientação durante o Programa de Estágio Docente (PED) da FOP/UNICAMP. Agradeço pela paciência, confiança e estímulo.

Ao Professor Dr. Pedro Luiz Rosalen pelo exemplo de dedicação e capacidade profissional.

Aos professores da Banca de Qualificação, Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião e Profa. Dra. Ynara Bosco de Oliveira Lima Arsati, pelas valiosas sugestões e contribuições para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Seichi Wada pelo auxílio na análise estatística, paciência e amizade.

À todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP, pelos fundamentais ensinamentos.

À Profa. Sueli Aparecida de Araújo Pereira, Coordenadora do Programa Saúde do Escolar, por autorizar a realização desta pesquisa junto às pré-escolas.

Às crianças e seus responsáveis pela contribuição fundamental para realização deste estudo.

Às Agentes de Saúde das pré-escolas na aplicação dos questionários e por acompanharem as crianças durante a coleta de dados.

Às funcionárias do Setor de Saúde da Prefeitura Municipal de Piracicaba.

À querida amiga Débora, pelo apoio, carinho, responsabilidade, dedicação e preocupação para comigo durante todo o período de nosso convívio.

À querida amiga Lidiany, pela sua presença constante na minha vida, pelos conselhos mais sensatos e amizade, amenizando os momentos mais difíceis desta caminhada.

Ao querido amigo Fábio Mialhe, pela confiança, ajuda, companheirismo e por estar sempre presente na minha vida.

À querida amiga Silvia, pelo companheirismo, amizade, carinho e valiosas contribuições para minha formação.

Às amigas Rosana, Livia, Lilian e Maria Paula minhas companheiras do Grupo de Estudos em Odontologia Coletiva (GEOC) pela amizade, ajuda e precioso auxílio.

Aos amigos e companheiros de turma: Andréa, Adriana, André, Fábio Mialhe, Fábio Koslóvsk, Iriana, Lidiany, Luciane, Marcelle, Márcia, Roberta, Rosane e Vanessa pela força, amizade, ajuda e companheirismo.

Aos amigos e companheiros de Pós-Graduação: Simone, Alexandre, Dany, Franco, Leonardo, Ferdinando, Mitsue, Celso, Zezé, Léa, Nilza, Ynara, Flávia, Fernando e Maximiliano pelo companheirismo e amizade.

À Profa. Dra. Cinthia P. Machado Tabchoury e aos técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral, da FOP/UNICAMP, José Alfredo Soares, Mariza de Jesus Carlos Soares e Waldomiro Vieira Filho, pela atenção e auxílio no preparo de soluções e dosagens de fósforo.

Ao Prof. Dr. Francisco José Krug, à técnica Tatinha e ao amigo Fernando Barbosa do Laboratório de Química Analítica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA-USP pela acolhida, orientação e realização das dosagens de chumbo.

Às bibliotecárias Marilene Girello e Heloísa M. Cecotti pelo auxílio na correção das referências bibliográficas, formatação da tese e confecção da ficha catalográfica.

Às secretárias Célia, Cidinha, Eliana, Elisa, Érika, Lucilene, Raquel e Sônia, pela atenção e auxílio em todas as fases administrativas.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

"Tenho pensamentos que, pudesse eu trazê-los à luz e dar-lhes vida, emprestariam nova leveza às estrelas, nova beleza ao mundo, e maior amor ao coração dos homens"

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
1. INTRODUÇÃO GERAL	05
2. PROPOSIÇÃO	09
3. CAPÍTULOS	10
3.1. <i>In vivo</i> studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children	10
3.2. Concentração de chumbo, defeitos de esmalte e cárie em dentes decíduos	22
3.3 Relationship between developmental defects of enamel and dental caries in preschool children from Piracicaba, SP, Brazil	42
4. DISCUSSÃO GERAL	54
5. CONCLUSÕES GERAIS	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Introdução Geral e Discussão Geral)	58
ANEXOS	65

RESUMO

O chumbo (Pb) é considerado um dos maiores poluentes ambientais e o esmalte dentário pode ser um indicador da exposição pregressa ao mesmo; pois a incorporação do Pb neste tecido é permanente. Uma técnica, *in vivo*, de biópsia de esmalte tornou possível a determinação da concentração do chumbo presente na superfície dentária sem o comprometimento do mesmo. A presença do chumbo na estrutura do esmalte parece estar associada ao aumento da prevalência de defeitos de esmalte e de cárie. Assim, os objetivos apresentados na forma de tese com base em três artigos foram: (1) avaliar a técnica de biópsia de esmalte *in vivo* como uma ferramenta epidemiológica para a determinação da exposição ambiental ao chumbo em crianças de diferentes áreas (industrial e não industrial), (2) relacionar a presença de chumbo, defeitos no esmalte e a cárie dentária nessas crianças e (3) relacionar defeitos de esmalte e cárie em uma população de pré-escolares. No estudo 1, a amostra foi de 329 crianças de pré-escolas municipais de uma área industrial (n=132) e outra não industrial (n=197) da cidade de Piracicaba. Para a biópsia de esmalte foi usada uma solução de HCl 1,6 mol.l⁻¹ em glicerol a 70% (v/v) e o Pb destas amostras foi analisado em espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. No estudo 2 trabalhou-se com a mesma amostra do estudo 1, realizaram-se exames bucais para verificar defeitos de esmalte (índice DDE - Developmental Defects of Enamel Index) e cárie segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS). No estudo 3, foi verificada a presença de hipoplasia, opacidades demarcadas e cárie segundo critérios da OMS, nos pré-escolares (n=2.846). No estudo 1, a concentração de chumbo no esmalte das crianças da região industrial (mediana=169 ppm Pb) foi maior do que das crianças da região não industrial (mediana=118,1 ppm Pb) ($p<0,0001$). E ainda, as biópsias com mais de 3,9 µm de profundidade apresentaram resultados mais adequados para comparação entre os grupos. No estudo 2, não foi observada relação entre a presença de chumbo e os defeitos de esmalte. Houve na região não industrial maior proporção de crianças com cárie entre aquelas com

maiores concentrações de chumbo no esmalte ($p=0,02$), mas isto não foi observado nas crianças da região industrial ($p=0,89$). Houve risco relativo (RR) aumentado de cárie nas crianças da região não industrial. Na população de pré-escolares (estudo 3) observou-se relação entre hipoplasias e cárie ($p<0,0001$), entretanto não foi encontrada relação entre opacidades demarcadas e cárie ($p=0,4110$). Dentre as crianças com hipoplasias houve 27% mais chance de ter cárie em relação às crianças com esmalte normal e não houve risco aumentado de ter cárie dentre as crianças com opacidades demarcadas. Assim, a técnica de biópsia mostrou-se adequada para estudos epidemiológicos de monitoramento da exposição ao chumbo; não houve evidência de relação entre concentração de chumbo no esmalte e defeitos de esmalte, entretanto encontrou-se relação entre chumbo e cárie na região não industrial e que a presença de hipoplasia em dentes decíduos pode ser um fator de risco a cárie dentária, recomendando-se a incorporação deste indicador em levantamentos epidemiológicos.

ABSTRACT

Nowadays, environmental lead pollution has been considered a major public-health and dental enamel could be a biomarker of past exposure to lead, as lead incorporation in this tissue is permanent. An *in vivo* enamel biopsy technique has enabled the lead level in the enamel surface to be determined without harming its integrity. Lead content in the enamel structure seems to be related to an increase in enamel defects and dental caries prevalence, respectively. Thus, the objectives of this study, based on 3 papers, were (1) to test whether enamel biopsies *in vivo* were an appropriate method for screening the population of young children from different areas (industrial and non- industrial) for environmental exposure to lead, (2) to relate the lead content, enamel defects and dental caries among these children and (3) to relate enamel defects and dental caries in the pre-school population. In the first paper, the sample was composed of 329 children from municipal pre-schools in an industrial area (n=132) and another non-industrial area (n=197) in Piracicaba city. A solution of 1.6 mol l⁻¹ HCl in 70% glycerol (v/v) were used for the enamel biopsy procedure and the lead content of these biopsy samples was assessed by graphite furnace atomic absorption spectrometer. The second paper worked with the same children involved in the first paper and clinical examinations to record enamel defects (DDE Index) and dental caries (dmft index) were carried out using FDI and WHO diagnostic criteria, respectively. In the third paper, developmental defects (presence of hypoplasia and demarcated opacity) and dental caries (dmft index) were carried out using WHO diagnostic criteria among the population of pre-school children (n=2,846). In the first paper, lead concentration in enamel biopsies of children from industrial area (median:169 ppm Pb) was significantly higher than that of children living far from industries (median:118.1 ppm Pb) ($P<0.0001$). Data analysis showed that more reliable results for comparisons between groups was found among biopsies deeper than 3.9 μ m. In the second paper, according to lead level, enamel defects and dental caries, a higher proportion of children with caries was found among those with

higher lead levels in enamel from non-industrial area ($P=0.02$); however, the same was not observed among children from industrial area ($P=0.89$). There was high relative risk (RR) of dental caries among children from non-industrial area. Relationship between hypoplasia and dental caries ($P<0.0001$), was observed in the population of preschool children (third paper), however no relationship was observed between demarcated opacities and dental caries ($P<0.4110$). Among children with hypoplasia there was 27.0% more chance of having caries in relation to the children with normal enamel, and there was no increased risk of having caries among the children with demarcated opacities. Thus, enamel biopsy was feasible for population screening for lead content; and there was no evidence of a relation between enamel lead level and enamel defects in both groups, however, there was relationship between enamel lead level and dental caries in the non industrial area. The presence of hypoplasia in deciduous teeth could be a dental caries risk factor, suggesting that this indicator should be used in epidemiological surveys.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O chumbo vem sendo considerado como um dos maiores poluentes ambientais da atualidade com efeitos deletérios à saúde, sendo o pior deles a sua neurotoxicidade (Tvinnereim *et al.*, 1997; Adonaylo & Oteiza, 1999). Seu acúmulo no organismo ocorre principalmente em tecidos mineralizados (Hu *et al.*, 1998), incluindo os tecidos dentários (Shapiro *et al.*, 1972).

A origem ambiental do chumbo inclui tintas e vernizes, emissões automotivas (através de gasolina aditivada com compostos de chumbo) e industriais (principalmente de indústrias que trabalham com mineração, fundição, refino e manufatura do chumbo) além de baterias para automóveis (Shen *et al.*, 1996). O cigarro também apresenta o chumbo como uma das substâncias tóxicas de sua composição, o qual é liberado para o meio ambiente através da fumaça, sendo que mesmo os fumantes passivos estão expostos aos efeitos maléficos deste metal (Franck *et al.*, 1999; Leite, 2001). Casas e prédios antigos que apresentam encanamentos de metal ou que foram pintadas com tintas à base de chumbo podem expor seus moradores à contaminação através da água e da poeira doméstica (Davies *et al.*, 1990; Gulson *et al.*, 1994; Freitas, 2002). A partir das diversas fontes, o chumbo se deposita no solo, contaminando a vegetação e, conseqüentemente, os alimentos e a água (Jin *et al.*, 1997) além de ser mobilizado pelo vento até as vias respiratórias (Freitas, 2002).

Devido a peculiaridades do esmalte dentário, muitos trabalhos têm associado as concentrações de chumbo no esmalte com a exposição pregressa ao mesmo, principalmente em estudos de monitoramento de contaminação ambiental (Cleymaet *et al.*, 1991 a, b, c; Tvinnereim *et al.*, 1997; Tvinnereim *et al.*, 2000; Ericson, 2001). O esmalte dentário tem sido considerado um valioso indicador biológico para a obtenção de dados sobre a vida pregressa de um indivíduo, uma vez que (1) ele é um tecido calcificado que não sofre remodelação ao longo do tempo, registrando permanentemente alterações ocorridas durante a sua formação; (2) as células responsáveis pela sua formação, os ameloblastos,

são extremamente sensíveis a alterações sistêmicas (Eisenmann, 1998); (3) o período de formação dos dentes se estende por toda a infância e adolescência, se forem consideradas as duas dentições e ainda, (4) o esmalte dentário é facilmente observável (exame visual da cavidade bucal), sem necessidade de exames complexos para se chegar a uma conclusão sobre a época em que pode ter ocorrido uma determinada alteração (Gerlach *et al.*, 2000). O indicador biológico mais comumente utilizado para monitoramento de exposição ambiental ao chumbo é o sangue (Rabinowitz, 1995; Moss *et al.*, 1999), entretanto, este possui a limitação de ser um marcador de exposição recente, uma vez que seu tempo de vida média é de 25 dias. O chumbo absorvido pelo organismo se concentra particularmente nos ossos e dentes (Barry & Mossman, 1970; Goyer, 1993).

Segundo Brudevold & Steadman (1956), o chumbo está presente no esmalte em maiores concentrações na superfície dentária e posteriormente, Brudevold *et al.* (1975) propuseram uma técnica de biópsia de esmalte pela qual tornou-se possível a determinação da concentração do chumbo presente na superfície dentária. Desde então, muitos trabalhos têm utilizado esta técnica com sucesso em estudos epidemiológicos, devido a sua facilidade de realização *in vivo* (Brudevold *et al.*, 1977; Cleymaet *et al.*, 1991 a b c; Gomes *et al.*, 2003).

Dentro deste contexto, alguns pesquisadores têm relacionado a presença do chumbo durante a formação dos tecidos dentários com a ocorrência de possíveis alterações na ultraestrutura do esmalte (Gerlach *et al.*, 2000) e em estudos com animais, verificou-se que dentre os animais do grupo experimental, no qual ratas eram expostas ao Pb através da água de beber durante a gestação e no período de amamentação, houve aumento de 40% na prevalência de cárie dentária nos filhotes quando comparados ao grupo controle (Watson *et al.*, 1997). Em outro estudo com ratos, os grupos experimentais foram expostos ao chumbo também pela água de beber durante 70 dias e verificou-se ao final do experimento, diminuição no conteúdo mineral e atraso na formação do esmalte quando comparados aos animais do grupo controle (Gerlach *et al.* 2002). Estes achados podem apontar para uma possível relevância clínica, partindo-se do

princípio que um esmalte com alterações em sua ultraestrutura poderia resultar clinicamente, na presença de defeitos de esmalte e estes, por sua vez, tornariam o esmalte mais susceptível à desmineralização (Suckling *et al.*, 1997; Simmer, 2001).

Assim, estudos epidemiológicos têm sido conduzidos a fim de verificar a relevância para a saúde pública das concentrações de chumbo no esmalte dentário e seu impacto na prevalência de defeitos de esmalte (Gil *et al.*, 1996; Brook *et al.*, 1997), particularmente os de causa não conhecida, e cárie (Brudevold *et al.*, 1977; Cleymaet *et al.*, 1991 a b c; Tvinnereim *et al.*, 1997; Tvinnereim *et al.*, 2000). Embora, mesmo estes trabalhos sendo considerados contribuições importantes para a literatura, não foram suficientes para instituir uma clara relação entre a presença de chumbo, defeitos de esmalte e cárie, sendo unânimes em concluir que o assunto não está esgotado e que mais estudos devam ser conduzidos a fim de esclarecer estas relações, bem como os seus mecanismos de ação.

A investigação epidemiológica para a causa dos defeitos de esmalte tem sido um desafio, devido à dificuldade na realização de estudos longitudinais retrospectivos que contemplem informações fidedignas que possam levar a uma relação causal (Suckling *et al.*, 1987). Embora a literatura internacional tenha relacionado a presença de contaminantes ambientais, como a dioxina, os organoclorados e também metais pesados (Alaluusua *et al.*, 1996 a b; Alaluusua *et al.*, 1999; Jan & Vrbic, 2000; Holttta *et al.*, 2001) com os defeitos de esmalte estas relações de causa-efeito devem ser melhor investigadas.

Por outro lado os estudos epidemiológicos sobre defeitos de esmalte, têm apontado uma relação entre as hipoplasias e as opacidades demarcadas com o aumento do risco de cárie (Matee *et al.*, 1992; Matee *et al.*, 1994; Kanchanakamol *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Montero *et al.*, 2003).

Atualmente, a presença de hipoplasias de esmalte tem sido considerada um fator de risco de cárie tão relevante quanto a infecção precoce por *S. mutans* e presença de dieta cariogênica (Milgron *et al.*, 2000). Considerando-se que este

tipo de defeito de esmalte compromete sua estrutura em quantidade, ou seja, forma nichos de retenção de placa dental, pode propiciar a instalação e a progressão da doença cárie.

Assim, essa tese, em formato alternativo, se propõe a avaliar a técnica de biópsia de esmalte como uma ferramenta epidemiológica para a determinação da exposição ambiental ao chumbo em crianças de diferentes áreas (industrial e não industrial), bem como a relação entre estas concentrações de chumbo, defeitos de esmalte e cárie nestas crianças e por fim, verificar a relação entre defeitos de esmalte e cárie em uma população de pré-escolares.

2. PROPOSIÇÃO

Esta tese foi dividida em três artigos que estão contemplados nos capítulos 1, 2 e 3.

Os objetivos deste estudo foram:

1. verificar se a técnica de biópsia de esmalte *in vivo* proposta é uma ferramenta epidemiológica adequada para a determinação da exposição ambiental ao chumbo (Capítulo 1);
2. relacionar a presença de chumbo, os defeitos no esmalte e a cárie dentária (Capítulo 2) e
3. relacionar defeitos de esmalte e cárie em uma população de pré-escolares (Capítulo 3).

Este trabalho foi realizado no formato alternativo (Ceccotti, 2003), conforme a deliberação da Comissão Central de Pós-graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) nº 001/98 (Anexos 1 e 2).

3. CAPÍTULOS

3.1. CAPÍTULO 1

***In vivo* studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children ***

Viviane Elisângela Gomes

Maria da Luz Rosário de Sousa

Fernando Barbosa Jr

Francisco José Krug

Maria da Conceição Pereira Saraiva

Jaime Aparecido Cury

Raquel Fernanda Gerlach

** Artigo publicado em 2004 no periódico The Science of the Total Environment volume 320, número 1, páginas 25-35.*

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

**the Science of the
Total Environment**
An International Journal for Scientific Research
into the Environment and its Relationship with Man

The Science of the Total Environment 320 (2004) 25–35

www.elsevier.com/locate/scitotenv

In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children

Viviane Elisângela Gomes^a, Maria da Luz Rosário de Sousa^a, Fernando Barbosa Jr^b,
Francisco José Krug^b, Maria da Conceição Pereira Saraiva^c, Jaime Aparecido Cury^d,
Raquel Fernanda Gerlach^{e,*}

^aDepartment of Community Dentistry, Dental School of Piracicaba, State University of Campinas – FOP/UNICAMP, Av. Limeira, 901, CEP 13414-018, Piracicaba, SP, Brazil

^bDepartment of Analytical Chemistry, Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of São Paulo – CENA/USP, Av. Centenário, 303, CEP 13400-970, Piracicaba, SP, Brazil

^cDepartment of Pediatric and Community Dentistry, FORP/USP, Av. do Café, S/N, Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^dDepartment of Physiological Sciences, Dental School of Piracicaba, State University of Campinas – FOP/UNICAMP, Av. Limeira, 901, CEP 13414-018, Piracicaba, SP, Brazil

^eDepartment of Morphology, Estomatology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo – FORP/USP, Av. do Café, S/N, Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 28 March 2003; accepted 13 August 2003

Abstract

The amount of lead in the superficial enamel of deciduous teeth from 4- and 5-year-old children was determined by means of an enamel biopsy followed by lead analysis by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Children examined in this study ($n=329$) attended public preschools in the city of Piracicaba, SP, Brazil. The selection of preschools was based on geographical location: some were located in an industrial area of the city, whereas others were located in an area devoid of industries. The objectives of this study were (1) to test whether enamel biopsies were an appropriate method for lead content population screening in young children; (2) to verify the lead content of superficial enamel of preschool children's deciduous teeth and to compare the results obtained from children exposed to different environments; (3) to analyze how biopsy depth correlated with lead content and affected comparisons between groups. An adhesive tape with a central hole (diameter=1.6 mm) was placed on one of the upper central incisors. Five microliters of 1.6 mol l^{-1} HCl in 70% glycerol (v/v) were applied to this area for 20 s, followed by a rinse with 5- μl ultrapurified water for 10 s. It was shown that the technique was feasible for population studies on young children. The lead concentration in enamel biopsies from the industrial area children (median: 169 ppm Pb) was significantly higher than that from the children living far from industries (118.1 ppm Pb) ($P<0.0001$). Analysis of the data showed that biopsies deeper than 3.9 μm gave more reliable results for comparisons between

*Corresponding author. Tel.: +55-16-602-4065; fax: +55-16-633-0999.
E-mail address: rfgerlach@forp.usp.br (R.F. Gerlach).

groups. To our knowledge, this study is the first to use an enamel microbiopsy to characterize a large sample of young children in vivo for lead monitoring in teeth.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Heavy metals; Lead; Enamel; Biopsy; Environment; Epidemiology; Brazil; Deciduous teeth; Preschool children

1. Introduction

Lead is one of the major environmental pollutants in industrialized areas (Cleymaet et al., 1991b). Contamination with lead is associated with many conditions, but one of the major concerns is decreased neuropsychological and neurobehavioral outcomes in developing children (Needleman and Bellinger, 1991). Because children exposed to lead are at a particular health risk, markers for the assessment of lead exposure in children are a matter of great interest.

Even though blood is by far the most widely used marker (Rabinowitz, 1995), it is by no means the perfect marker, since it better reflects recent exposures. Deposition of lead is much greater in skeletal tissues than in soft tissues (Hu et al., 1998). Bone is considered to be a more reliable marker for chronic lead exposure, but in most cases it is not suitable to be used routinely for human subjects, since it requires a bone biopsy, which is a highly invasive procedure. Recently, the development of X-ray fluorescence instruments has provided a new perspective for in vivo lead determination in human bone. Although this is an attractive method, it is still not of widespread use and has not been well established for lead screenings in clinical laboratories (Todd et al., 2000). Teeth have been recognized to provide a useful long-term record of lead uptake (Shapiro et al., 1972). Also, teeth may reflect early exposure even after blood lead level has returned to normal (Needleman and Bellinger, 1991). Many authors have emphasized the advantages of using teeth for lead determination (Brudevold and Steadman, 1956; Brudevold et al., 1975, 1977; Fergusson and Purchase, 1987; Rabinowitz et al., 1991; Gulson, 1996; Budd et al., 1998; Bloch et al., 1998; Budd et al., 2000; Tvinnereim et al., 2000). One advantage of teeth lies in the fact that deciduous teeth exfoliate, and can thus be used without any inva-

sive procedure (Rabinowitz et al., 1993). Deciduous teeth, however, are not a uniform mass of calcified tissues. Despite the fact that most studies have dealt with whole tooth lead content so far, teeth are anatomically complex (Rabinowitz, 1995), being composed of different calcified tissues that harbor different concentrations of organic and mineral elements according to their own developmental characteristics (Purchase and Fergusson, 1986). Furthermore, it is not always easy to collect exfoliated teeth from a population, besides the fact that the collection of deciduous teeth by itself will not provide the researcher with important information regarding the past history of the child, which is more easily collected when the child is examined and a questionnaire is filled by the parents. Another drawback of studies on exfoliated teeth is the frequent use of many different teeth from many different regions, which makes comparisons difficult.

In 1975, Brudevold et al. proposed the use of a procedure called enamel biopsy for lead determinations in superficial enamel using permanent tooth samples. Thereafter, most of the studies found in the literature using enamel biopsies for lead monitoring used permanent teeth samples (Brudevold et al., 1977; Purchase and Fergusson, 1986; Cleymaet et al., 1991a,b,c,d). The enamel biopsy consists of the removal of a layer of enamel by acid etching of a limited area on the tooth surface. Using biopsies to assess lead exposure in young children enables investigators to easily collect data of past exposure to lead in populations without the difficulties associated with collecting exfoliated teeth. Also, it can potentially provide investigators with samples that are more representative of the exposure to lead (for instance, from superficial enamel only, instead of a mixture of all tissues that constitute a tooth).

This study examined the lead content of deciduous incisor surface enamel of 4- and 5-year-old

children living in the city of Piracicaba, SP, Brazil, by means of an *in vivo* acid etch biopsy. No studies had been done before on the lead content of teeth in this city. Piracicaba has 329 158 inhabitants¹ and has an industrial area in which a battery factory operates. Recently, lead contamination started to be a major public health concern in several industrialized cities in the state of São Paulo. In these cities, environmental contamination by lead is detected in soil and water, and children's blood lead levels are high due to industries that have not followed regulations about minimizing the health hazards of heavy metal contamination in the past decades.

The objectives of the present study were (1) to test whether enamel biopsies are an appropriate method for lead content population screening in young children; (2) to verify the lead content of superficial enamel of preschool children's deciduous teeth and to compare the results obtained from children exposed to different environments (industrial and non-industrial areas); (3) to analyze how biopsy depth correlates with lead content and how biopsy depth affects comparisons between groups.

2. Materials and methods

2.1. Study areas and cohort description

The study proposal was submitted to the Research Ethics Committee of FOP/UNICAMP (approval protocol no. 26/99) according to Resolution 196/96 of the National Commission of Ethics in Research. Parents or a guardian had to sign informed consent prior to enrollment of the child in the study. Parents or the person responsible for the child was also asked to fill out a questionnaire in which many aspects of the child's life were recorded, especially those concerning exposure to lead.

This study included a total of 329 children aged 4 and 5 years who attended public kindergartens in the city of Piracicaba, SP, Brazil (Fig. 1). Six kindergartens (corresponding to 197 children) were located in an area far from industries, and 4

kindergartens (132 children) were located in the industrial area of the city. The distance between these two areas was 12.5 km. Sample size was calculated on the basis of a pilot study that verified the prevalence of enamel defects in a sample of preschool children in Piracicaba, since this study was part of a larger project aimed at detecting risk factors for enamel defects in the population of preschool children from this city and included lead contamination as a risk factor. The inclusion criteria for enrollment in the study were presence of clinically sound upper deciduous incisors and residence of the child and his/her family in the area since the mother's gestation.

2.2. Enamel biopsy

Some modifications were made to the original technique (Brudevold et al., 1975) in order to adapt it to the present sample. Briefly, the diameter of the adhesive tape perforation limiting the sampling area was decreased, as also were the volume of acid solution and the time of etching. Teeth were cleaned with pumice slurry and a rotating brush, washed and dried. The working area was isolated with cotton rolls prior to the biopsy. All instruments used during the procedure were cleaned with 10% v/v nitric acid (HNO₃) in order to remove possible previous contaminations. Centrifuge tubes used to collect the samples were also washed with 10% nitric acid. Lead-free adhesive tape (magic tape, 810 Scotch[®]-3M) with a circular perforation (diameter=1.6 mm) was firmly placed on the labial surface of one of the maxillary deciduous central incisors (51 or 61), demarcating the biopsy site. The sampling site was etched once according to the following procedure: 5 µl of 1.6 mol l⁻¹ HCl in 70% glycerol (v/v) was applied to this area for 20 s and during this time the drop was gently agitated with the pipette tip. The biopsy solution was then transferred to a 0.2-ml centrifuge tube (Axygen Scientific, Inc., Union City, USA) already containing 200-µl ultrapurified water. Next, the surface was rinsed once with 5-µl ultrapurified water for 10 s, which was also transferred to the centrifuge tube. The tape was removed, and the tooth was washed with water for

¹ Censo demográfico 2000. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, www.ibge.gov.br (Demographic census 2000. Brazilian Institute of Geography and Statistics).

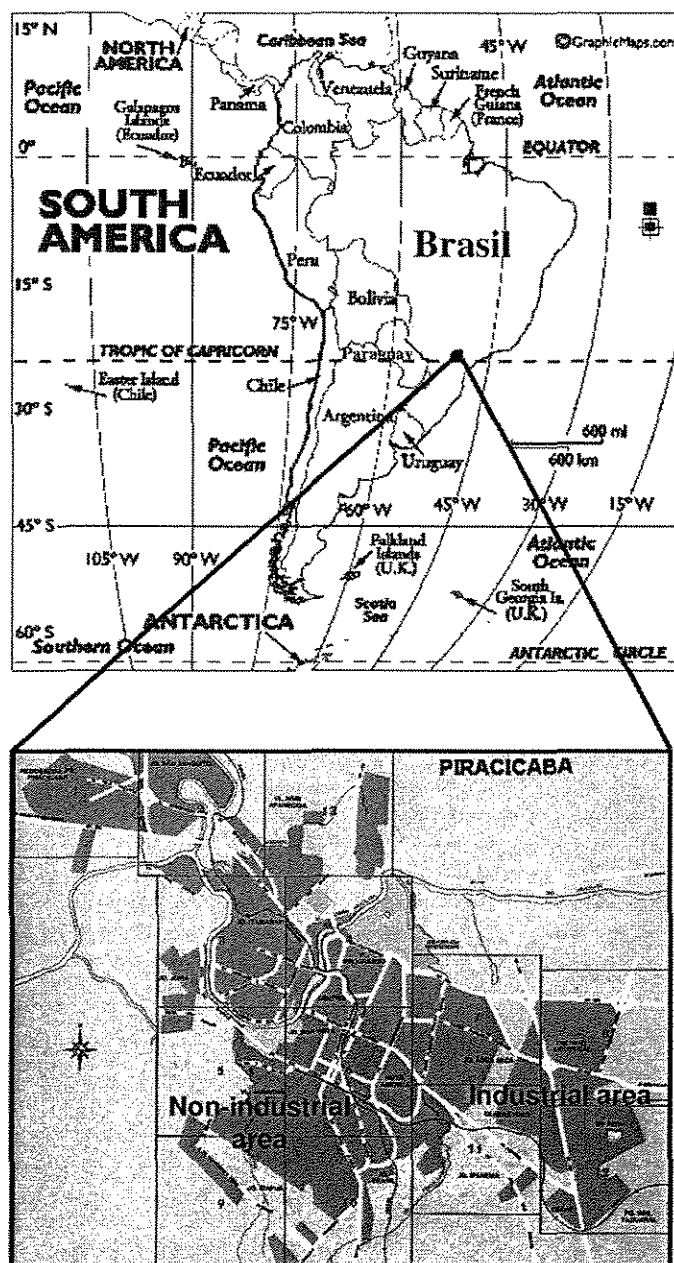


Fig. 1. Map of Piracicaba, State of São Paulo, Brazil. Industrial and non-industrial areas are shown. These two areas are 12.5 km distance from each other.

30 s and dried with an air spray to receive a topical fluoride application.

Biopsy controls were obtained from many of the working surfaces in order to verify the contamination with lead in the working environment during the procedures and to ascertain how much lead would be obtained from surfaces that should ideally not be contaminated, besides testing how much lead would be picked up from the whole procedure. All biopsies were carried out in one of the dental clinics of the Dental School of Piracicaba, to which municipal buses brought the children, accompanied by their teacher.

2.3. Chemical analysis

The chemical analysis of the biopsy samples was not made immediately, and to avoid possible evaporation and loss of sample volume, the samples were dried under vacuum with anhydrous calcium chloride (CaCl_2) for 36 h. During rehydration, a volume of ultrapurified water (210 μl) was added to the tubes and 105 μl were separated for lead (Pb) analysis. The remaining solution was used for inorganic phosphorus (P_i) determination.

Lead analysis was performed at the Laboratory of Analytical Chemistry 'Henrique Bergamin Filho' of the Center for Nuclear Energy in Agriculture, University of Sao Paulo (CENA/USP) by graphite furnace atomic absorption spectrometry on a Perkin Elmer 4100 ZL atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Inc., Shelton, CT, USA) equipped with longitudinal Zeeman effect background correction and standard THGA furnaces (Perkin Elmer part no. B050-4033). Integrated absorbance measurements were made at the 283.3-nm line with a slit width of 0.7 nm. Sample aliquots (12 μl) were delivered via an AS-71 autosampler. Prior to analysis, samples were brought to a final volume of 490 μl with the following solution: 0.2% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (w/v), 0.5% Triton X-100 (v/v) and 0.2% HNO_3 . Volumetric flasks and glassware used in the procedure were soaked overnight in 10% nitric acid (reagent grade) and rinsed with ultrapure water before use.

Inorganic phosphorus was determined basically according to the method described by Fiske and Subbarow (1925). The analyses were carried out

in duplicate at the Laboratory of Oral Biochemistry of the Dental School of Piracicaba, State University of Campinas (FOP/UNICAMP). A spectrophotometer (Beckman DU-70) calibrated with standards containing various standard concentrations of P_i (from 0.58 to 9.30 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was used.

The inorganic phosphorus content of the etch solution was used to estimate the amount of etched enamel (g) and the etched depth, assuming that P_i concentration in enamel is 17.4% and enamel density is 2.95 g cm^{-3} (Weidmann et al., 1967; Koo and Cury, 1998). Lead concentration was expressed in relation to the amount of etched enamel ($\mu\text{gPb g}^{-1}$). The etched depths were an important parameter in this study because there is a gradient of Pb concentration from the surface to the inner enamel (Purchase and Fergusson, 1986). Thus, only samples whose biopsy depths are similar can be compared when a comparison in Pb content is intended.

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SAS software (Statistical Analysis System, Carry, NC, Version 8.0., 1999). Tables and graphs were prepared using Excel or GraphPad Prism (Version 3.0). All data were analyzed for distribution in order to compare differences between groups in a more appropriate manner. Since lead content distribution did not follow a Gaussian curve, the Mann–Whitney U test was used to compare the results of lead content in superficial enamel. Since lead content in superficial enamel is reported to be higher in the first micrometers, we analyzed the depth of the biopsies in both groups of children. Pearson's correlation was calculated to determine whether there was a correlation between biopsy depth and lead content. Data on lead levels were also analyzed according to biopsy depth by the Kruskal–Wallis test after dividing the samples into four groups according to biopsy depth (quartiles were used to divide samples into groups) as follows: group 1, 0–3.2 μm ; group 2, 3.2–3.9 μm ; group 3, 3.9–5.2 μm ; group 4, all biopsies deeper than 5.2 μm . After assigning the samples to these four 'depth' groups, lead content was analyzed in the enamel of each sample and the

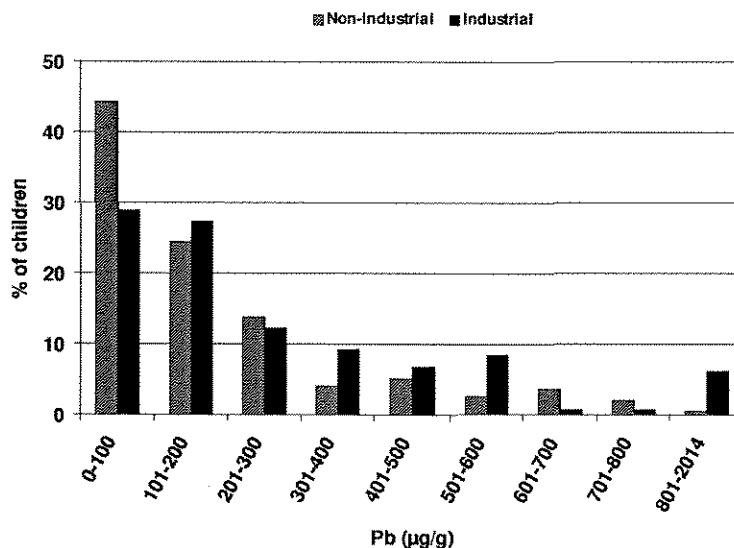


Fig. 2. Distribution of children according to lead content levels in enamel surface biopsies. Piracicaba, 2001.

number (percentage) of children from each group within each biopsy depth category was compared. Logarithmic transformation of lead content vs. the biopsy etch depth was used to express results as scatter plots showing the linear regression line and correlation coefficients that characterized each group.

3. Results

The average age of the children in this study was 4.6 years (the children participating in this study were either 4 or 5 years old at the time of the procedure). The biopsy procedure was done in all children from one kindergarten on the same morning after the teacher had collected consent forms and questionnaires. Ninety-two children did not bring the consent form and/or questionnaire (corresponding to 21.8% of the children that attended the selected preschools). None of the children showed any discomfort or problem during or after the procedure. There was no need to repeat the procedure in any child because of technical or operative failure. Eleven minutes and 12 seconds was the average time a child remained in the

dentist chair for the whole procedure, including cleaning, biopsy and fluoride application. Results from biopsies done on plastic working surfaces always yield lead and phosphorus signals within the ppb level.

Distribution of the children according to lead content levels in enamel surface biopsies and group is given in Fig. 2. Most children in both groups had lead levels below 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ of enamel (68.6% of non-industrial area children and 56.1% of industrial area children). While 44.2% of the non-industrial area children had lead levels below 100 $\mu\text{g g}^{-1}$, only 28.8% of the industrial area children had lead levels below 100 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Since lead concentrations showed a wide range (Table 1) and did not follow a Gaussian curve, non-parametric statistics was used. Median and quartile values are shown in Table 1 for comparison of lead levels between children from the two regions. The differences between groups are indicated by the level of significance as calculated by the Mann–Whitney U test. The differences in lead levels of the surface enamel between children from the two regions of Piracicaba were highly significant ($P < 0.0001$). Mean and standard deviation

Table 1

Comparison of lead content ($\mu\text{g g}^{-1}$) in enamel surface of children's teeth to residence areas (Piracicaba, 2001)

Areas	n (329)	Mean (S.D.)	Median (1st Q; 3rd Q)	Min–max
Non-industrial	197	183.1 (190.6)	118.0*** (43.5; 250.0)	0–965
Industrial	132	275.5 (326.7)	169.0*** (74.5; 371.0)	0–2014

1st Q, first quartile; 3rd Q, third quartile; min–max, minimum and maximum values.

*** P value < 0.0001 by Mann–Whitney U test for comparison of medians of the two groups.

for each group are shown for comparison with other studies.

When biopsy depth results were analyzed, again they were found not to follow a Gaussian distribution. Table 2 lists the data on lead content in superficial enamel according to category of biopsy depth created on the basis of the quartile distribution of biopsy depths. Differences in lead content were statistically significant between the children that lived in the industrial and in the non-industrial area only in the deeper biopsies, as assessed by the two-tailed Kruskal–Wallis test. This means that differences in lead content were significant in biopsies corresponding to the third quartile (between 3.9 and 5.2 μm , $P=0.013$) and the fourth quartile (from 5.2 to 8.9 μm , $P=0.0018$). Percentages of children from each group distributed by biopsy depth (Table 2, third and fourth columns) revealed no differences in distribution of children in the different biopsy depth categories. Mean biopsy depth ($\pm$ S.D.) values were 4.4 ± 1.6

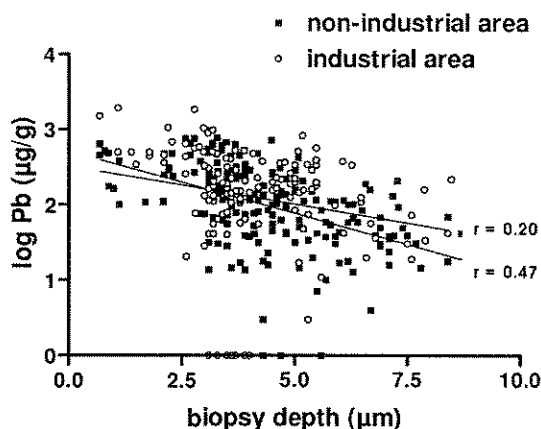


Fig. 3. Log 10 of Pb content vs. etch depths of enamel biopsies: (■) non-industrial cohort and (○) industrial cohort.

μm (non-industrial region) and 4.1 ± 1.5 μm (industrial region).

The correlation between biopsy depth and lead content was moderate in both groups. Pearson's test revealed a negative correlation coefficient of 0.47 in the non-industrial group, while a negative correlation of 0.20 was obtained for the industrial group. The relationship between biopsy depth and lead content was further explored using a linear regression equation. In Fig. 3, log 10 of lead values is plotted against the biopsy depth results, and an even distribution of values can be observed when the two groups are compared. The regression lines revealed negative correlations in both groups, even though the non-industrial group ($r=0.47$) had a higher negative correlation.

Table 2

Comparison of lead content ($\mu\text{g g}^{-1}$) in enamel surface samples according to biopsy depth and group of children (Piracicaba, 2001)

Q (%)	BD (μm)	% children		Median		P value
		Non-industrial	Industrial	Non-industrial	Industrial	
0–25	<3.2	23.35	28.03	286.19	457.26	0.1616
25–50	3.2–3.9	22.84	28.03	180.61	137.60	0.1835
50–75	3.9–5.2	27.41	21.21	102.10 ^a	193.08 ^a	0.0138
75–100	>5.2	26.39	22.72	42.04 ^b	118.90 ^b	0.0018

Q, quartiles; BD, biopsy depth; P values as calculated by two-tailed Kruskal–Wallis.

^a Medians differ between regions ($P=0.0138$).

^b Medians differ between regions ($P=0.0018$).

Table 3 shows the major findings from other studies on lead levels in enamel surface. None of these studies used an *in vivo* biopsy method for deciduous teeth. Results from the questionnaire are still being analyzed.

4. Discussion and conclusion

The aim of this study was to use an *in vivo* acid etch enamel biopsy to assess the enamel surface lead content of children from two distinct areas of the city: one close to industries, and the other far from industries. The results showed that the enamel surface lead levels in these two groups of children from Piracicaba are within the ranges already described by others (Table 3), even though only superficial enamel from permanent teeth had been used for *in vivo* biopsies before. The wide variability of lead levels in surface enamel was expected and was related in part to biopsy depth variability. Lead accumulates in the superficial enamel (Brudevold and Steadman, 1956; Brudevold et al., 1975; Cleymaet et al., 1991a,b,c,d; Purchase and Fergusson, 1986; Fergusson and Purchase, 1987). Thus, shallow biopsies are expected to have more lead. Apart from this fact, the results still show important information, especially after controlling for depth (Table 2). They indicate that lead levels are different in the two groups of children and several children show high lead content in enamel, even in deeper biopsies. This comparison and conclusion was only possible because a similar percentage of children from each group was found in each category of biopsy depth (Table 2). When biopsy depths vary between two populations, they cannot be compared, except when appropriate regression models are used (Cleymaet et al., 1991d).

Our finding that deeper biopsies gave more consistent results is in agreement with Cleymaet et al. (1991a), who used two successive biopsies and concluded that the second biopsy provided more reliable lead estimates. They also concluded that the mean lead concentration of the first enamel biopsy layer was five times higher than that of the second biopsy layer and that there was a strong relationship between the two biopsies. Our findings, as well as the findings of previous studies

using enamel biopsies, clearly show that results can only be analyzed after controlling for biopsy depth, a fact that also implies that determination of the amount of enamel removed (usually based on Ca or P removed) is fundamental. In addition, variation in biopsy depth is difficult to control even when most factors are controlled for and the same investigator does the biopsies. Differences in ambient temperature, evaporation of the acid etching solution and acid resistance of the teeth are factors that might affect biopsy depth (Cleymaet et al., 1991d).

Lead content in superficial enamel has long been regarded to be too inconsistent to give useful results (Brudevold et al., 1977; Fergusson and Purchase, 1987), even though some investigators have shown that surface concentrations of lead clearly correlate with the corresponding whole enamel content (Anttila, 1987). The inconsistencies in superficial enamel lead content might be due to the fact that data collected in the past were not carefully controlled for biopsy depth (assuming that methodological problems with sampling and P and Ca determinations were minor). Besides, not enough epidemiological studies have been done to date on enamel surface lead content and, secondly, we do not know how lead accumulates in enamel. One of the major controversies about enamel surface lead levels that needs to be resolved is whether lead is incorporated posteruptively. On the basis of enamel surface acid etch biopsies done in two different age groups of children, it has been suggested that posteruptive uptake of enamel might take place in contaminated areas, whereas in areas of low exposure to lead this posteruptive uptake would not happen (Cleymaet et al., 1991a). Lead does induce certain changes in dental tissues as shown by *in vitro* and animal studies (Gerlach et al., 2000a,b, 2002), but there is no information on the kinetics of lead deposition into enamel.

A few additional considerations about the lower levels of lead found in our samples are appropriate. First, our biopsies were generally deeper than biopsies reported previously. Second, deciduous tooth enamel in most studies has been reported to have less lead than permanent tooth enamel (Purchase and Fergusson, 1986). Third, as stated by

Table 3
Comparative studies on enamel surface lead levels

Place	Area	Deciduous (D) or permanent (P)	Mean lead $\mu\text{g g}^{-1}$ (S.D.) or (S.D.%)	n	Age	Method	References
Cambridge (USA)	Urban	P	1790 (960)	35	9–15	AEB	Brudevold <i>et al.</i> (1975)
Cambridge (USA)	Urban	P	1800 (1160) 1670 (1160)	121 143	9–10 11–12	AEB	Brudevold <i>et al.</i> (1977)
Moretusburg (Belgium)	Polluted	P	2480 (63.0%) 3475 (75.5%)	14 13	7 11	AEB	Cleymaet <i>et al.</i> (1991b)
Stuivenberg (Belgium)	Non-polluted		995 (54.5%) 1340 (54.0%)	17 27	7 11		
Schelle (Belgium)	Urban	P	1125.5 (671.8)	67	7–11	AEB	Cleymaet <i>et al.</i> (1991a)
Belgium	Urban/Industrialized	P	1236 (68.7%)	252	6–12	AEB	Cleymaet <i>et al.</i> (1991d)
Kenya	Rural		145 (46.5%)	60			
Askola (Finland)	Rural	D	232 (141)	77	Exfoliated	PIXE	Anttila (1987)
Oulu (Finland)	Urban		167 (139)				
New Zealand	Urban/rural	P	1100	13	Extracted	AEB	Purchase and Fergusson (1986)
Piracicaba (Brazil)	Urban/Non industrial Urban/Industrial	D	183 (191) 275 (327)	329	4–5	AEB	Present study

AEB, acid etch biopsy; PIXE, particle-induced X-ray emission.

Fergusson and Purchase (1987), a somewhat poorly defined fall in lead levels over the past 20 years may indicate improved sampling and analytical methods.

As can be observed from the data in Table 3, our results are in good agreement with most of the data obtained for superficial enamel so far. A further explanation for the fact that the lead content in this study showed somewhat lower values than that reported in earlier studies might be related to exposure to lower environmental levels of lead in Piracicaba. The fact that the industrial region has a battery factory is a source of concern, but many public health measures to reduce environmental lead contamination have been applied for several years in Brazil. For instance, lead was banned from paint and gasoline in the seventies (Freitas, 2002). Taken together, these measures might explain the general lower lead levels found in the majority of the superficial enamel biopsies of the children studied. Nonetheless, children from both groups showed lead levels in their deciduous incisor teeth, which were much higher than any natural background level. The children showing higher lead levels, especially from deeper biopsies, need to be further investigated. Contamination in these cases probably results from other sources of exposure, including uncontrolled industrial emissions, occupational take-home exposures and other focal sources of exposure such as battery recycling and lead-glazed ceramics.

We may conclude that the enamel biopsy method used in this study is feasible for enamel surface lead content screenings, and the data obtained were shown to be useful for comparison between groups of children from different environmental backgrounds. Furthermore, analysis of the data also showed that biopsies deeper than 3.9 μm gave more reliable results for comparisons between groups. This study provides further evidence that deeper biopsies give more consistent results of lead analysis.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Débora Dias da Silva for essential aid during the biopsy procedure, Mariza de Jesus Carlos Soares, Laboratory of Oral

Biochemistry (FOP-UNICAMP), for help with the phosphorus determinations and Iolanda Rufini, Laboratory of Analytical Chemistry (CENA-USP), for the lead determinations. This study was supported by FAPESP (grants 99/12891-8 and 00/07353-6).

References

- Anttila A. Trace-element content in the enamel surface and in whole enamel of deciduous incisors by proton-induced X-ray emission of children from rural and urban Finnish areas. *Arch Oral Biol* 1987;32:713–717.
- Bloch P, Shapiro IM, Soule L, Close A, Revich B. Assessment of lead exposure of children from K-XRF measurements of shed teeth. *Appl Radiat Isot* 1998;49:703–705.
- Brudevold F, Aasenden R, Srinivasian BN, Bakhos Y. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. *J Dent Res* 1977;56:1165–1171.
- Brudevold F, Reda A, Aasenden R, Bakhos Y. Determination of trace elements in surface enamel of human teeth by a new biopsy procedure. *Arch Oral Biol* 1975;20:667–673.
- Brudevold F, Steadman LT. The distribution of lead in human enamel. *J Dent Res* 1956;35:430–437.
- Budd P, Montgomery J, Cox A, Krause P, Barreiro B, Thomas RG. The distribution of lead within ancient and modern human teeth: implications for long-term and historical exposure monitoring. *Sci Total Environ* 1998;220:121–136.
- Budd P, Montgomery J, Evans J, Barreiro B. Human tooth enamel as a record of the comparative lead exposure of prehistoric and modern people. *Sci Total Environ* 2000;263:1–10.
- Cleymaet R, Bottenberg P, Retief DH, Slop D, Michotte Y, Coomans D. In vivo use of a dual acid etch biopsy for the evaluation of lead profiles in human surface enamel. *Caries Res* 1991;25:256–263.
- Cleymaet R, Bottenberg P, Slop D, Clara R, Coomans D. Study of lead and cadmium content of surface enamel of schoolchildren from an industrial area in Belgium. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:107–111.
- Cleymaet R, Quartier E, Slop D, Retief DH, Smeyers-Verbeke J, Coomans D. Model for assessment of lead content in human surface enamel. *J Toxicol Environ Health* 1991;32:111–127.
- Cleymaet R, Retief DH, Quartier E, Slop D, Coomans D, Michotte Y. A comparative study of the lead and cadmium content of surface enamel of Belgian and Kenyan children. *Sci Total Environ* 1991;104:175–189.
- Fergusson JE, Purchase NG. The analysis and levels of lead in human teeth: a review. *Environ Pollut* 1987;46:11–44.
- Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375–400.
- Freitas CU. Estratégias de abordagem para exposição ambiental ao chumbo no estado de São Paulo. São Paulo: Centro de

3.2. CAPÍTULO 2

“Concentração de chumbo, defeitos de esmalte e cárie em dentes decíduos”**

“Lead level, enamel defects and dental caries in deciduous teeth, Piracicaba, SP,
Brazil”

Viviane Elisângela Gomes^a

Ronaldo S. Wada^b

Jaime Aparecido Cury^c

Maria da Luz Rosário de Sousa^b

*Departamento de Odontologia Social e Ciências Fisiológicas da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de
Campinas. Piracicaba, SP, Brasil.*

^a *Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de Cariologia da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas.*

^b *Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba, SP. Brasil.*

^c *Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba, SP. Brasil.*

**Manuscrito aceito para publicação no periódico Revista de Saúde Pública vol. 38, n.5,
2004 (Anexo 3).*

Resumo

Objetivo. Verificar a relação da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos com a presença de defeitos de esmalte, bem como sua relação com cárie dental em pré-escolares de duas regiões, uma próxima de indústrias e outra em área não industrial.

Metodologia. A amostra foi de 329 crianças de pré-escolas municipais de uma área próxima de indústrias (n=132) e outra não industrial (n=197) da cidade de Piracicaba-SP. Nesta amostra foi analisado o chumbo através de biópsia de esmalte. Foram realizados exames clínicos bucais para verificar a prevalência de defeitos de esmalte através do índice DDE (Developmental Defects of Enamel Index) (Fédération Dentaire Internationale - FDI) e a prevalência de cárie pelo número de superfícies cariadas, perdidas e obturadas (ceos) (World Health Organization - WHO), em ambas regiões.

Resultados. Houve maior proporção de crianças com cárie entre aquelas com maiores concentrações de chumbo nos dentes decíduos na região não industrializada ($p=0,02$). Isto não foi observado na região industrializada ($p=0,89$). Houve risco relativo (RR) aumentado de cárie nas crianças da região não industrializada, o que não foi verificado nas crianças da região industrial. Não foi observada relação entre a presença de chumbo e os defeitos de esmalte.

Conclusão. Esse trabalho não encontrou dados que evidenciam a relação entre concentração de chumbo no esmalte e defeitos de esmalte em nenhuma das regiões pesquisadas e encontrou relação entre chumbo e cárie na região não industrial, ressaltando a necessidade de mais estudos destas relações.

Descritores

Chumbo, esmalte dentário, hipoplasia, opacidade, cárie dentária, crianças, epidemiologia.

Abstract

Objective. To verify the relationship among enamel lead level, enamel defects and dental caries in deciduous teeth of preschool children from two areas, one near industries and other far from them.

Methodology. The sample was 329 children, coming from pre-schools of an industrialized area (n=132) and other not industrialized (n=197) from Piracicaba-SP. In this sample lead level was obtained through enamel biopsy. Buccal clinical exams were managed for verification of the prevalence of enamel defects (Developmental Defects of Enamel Index) (Fédération Dentaire Internationale - FDI) and dental caries prevalence through the number of decayed, missing or filled surface on primary teeth (dmfs) (World Health Organization - WHO) in both areas.

Results. The results showed the higher proportion of children with caries among those with higher lead levels in deciduous teeth from non-industrial area ($p=0.02$); however, this was not observed in the children from industrial area ($p=0.89$). There was elevated relative risk (RR) of dental caries in the children from non-industrial area, however the same was not verified in the children from industrial area. There was not a relationship between lead level and enamel defects.

Conclusion. This study did not find data that could evidence the relationship between enamel lead level and enamel defects in both areas enrolled. Besides, there was relationship between enamel lead level and dental caries in the non-industrial area, suggesting that more studies should be performed in order to better assess such relationships .

Key words

Lead, dental enamel, hypoplasia, opacity, dental caries, children, epidemiology

INTRODUÇÃO

O chumbo vem sendo considerado como um dos maiores poluentes ambientais com efeitos deletérios à saúde ²³ e seu acúmulo no organismo humano ocorre principalmente em tecidos mineralizados, incluindo os dentes ⁹. A incorporação no esmalte dos dentes decíduos ocorre durante o período da amelogênese, iniciando-se durante a vida intra-uterina ²⁰, assim o esmalte dentário tem sido considerado um indicador biológico da exposição passada ao chumbo ¹⁰.

Estudos *in vitro* têm mostrado que a presença de chumbo durante a amelogênese pode causar alterações na ultraestrutura do esmalte ¹¹, visto que os ameloblastos são células extremamente sensíveis às alterações ambientais. Estas alterações por sua vez, poderiam estar associadas a modificações no comportamento físico-químico do esmalte ²², tornando-o mais suscetível à desmineralização.

Estudos epidemiológicos indicaram associação entre a presença de chumbo no tecido dentário e alterações clínicas no esmalte ^{1, 12}, embora estes trabalhos não tenham sido suficientes para instituir uma clara relação entre a presença do chumbo e os defeitos de esmalte e foram realizados apenas em dentes permanentes.

Em acréscimo, a relação, mesmo que indireta, entre a presença de chumbo no tecido dentário e o aumento na prevalência de cárie, foi relatada por alguns pesquisadores ^{2, 12, 24}, podendo indicar um possível risco aumentado de cárie. Sabendo-se que a dentição decídua pode ser um preditor de risco para a dentição permanente ⁵, identificar alterações nesta dentição torna-se relevante em saúde pública.

Dentro deste contexto e devido às divergências na literatura internacional e a escassez de dados sobre este assunto em comunidades brasileiras, buscou-se nesta pesquisa epidemiológica, informações quanto à relação entre a presença de chumbo no esmalte, a prevalência de defeitos de esmalte e de cárie em dentes decíduos em pré-escolares de 4 e 5 anos.

MÉTODOS

Delineamento do estudo

Os resultados da presente pesquisa partem de um estudo de coorte retrospectivo em que a amostra foi selecionada a partir de dois grupos: um de expostos e outro de não expostos ao chumbo ¹⁴.

O delineamento foi monocego, sendo o agendamento das crianças realizado por outra pesquisadora, evitando-se assim, que a examinadora tivesse informações prévias sobre as crianças.

Aspectos éticos

Houve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), sob protocolo nº 29/99, segundo a Resolução 196/96 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Anexo 4).

Amostra populacional

A seleção da amostra foi realizada após a determinação das regiões da cidade de Piracicaba a serem estudadas. Foram consultados, inicialmente, órgãos como a Secretaria do Meio Ambiente da Prefeitura Municipal de Piracicaba, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) e o Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), para obtenção de informações sobre a poluição por chumbo nesta cidade. Estes órgãos relataram a existência de uma fábrica de baterias para automóveis no Distrito Industrial, localizado na região Dois Córregos (industrial). Assim, foi realizada uma busca com auxílio de um mapa da cidade para localização das pré-escolas nesta região (industrial) e em outra região (Campestre) que não possuía indústrias (não industrial).

O cálculo da amostra foi realizado a partir do conhecimento prévio da prevalência de defeitos de esmalte nos pré-escolares da cidade de Piracicaba incluindo as regiões industrial e não industrial ¹⁸.

O Setor de Saúde do Escolar da Prefeitura do Município de Piracicaba forneceu as listagens das crianças matriculadas nas 10 pré-escolas das regiões selecionadas para o estudo, perfazendo um total de 421 crianças, sendo 209 da região industrial e 212 da região não industrial.

Devido às perdas, a amostra foi composta de 329 pré-escolares de ambos os sexos, de 4 e 5 anos de idade. Utilizou-se a Matriz de Frias adaptada da Universidade de São Paulo/Faculdade de Saúde Pública ¹⁷ para o cálculo da idade. Finalizando em 197 crianças de 6 pré-escolas da região não industrial e 132 crianças de 4 pré-escolas da região industrial.

O atendimento dos participantes do estudo foi realizado no Laboratório Clínico de Cariologia do Departamento de Odontologia Social, localizado no Prédio Central da FOP/UNICAMP, situado na cidade de Piracicaba, que dispõe de 2 consultórios odontológicos completos.

Biópsia de esmalte in vivo

Foram realizadas algumas modificações na técnica da biópsia original ³, por se tratarem de dentes decíduos, ou seja, partindo da diminuição da área da perfuração da fita adesiva que isola a superfície dentária de 20,1 mm² para uma de 2,0 mm² ¹⁴; de um volume de solução ácida de 10 µl para 5 µl e de um tempo de exposição do ácido de 35 segundos para 20 segundos, a fim de adequá-la à presente amostra, sendo que estas modificações foram feitas após a realização do estudo piloto ¹³.

Assim, os dentes foram submetidos à profilaxia profissional com escova de Robinson, taça de borracha e pedra pomes, lavados, secos com ar e gaze e isolados relativamente com roletes de algodão. Estes procedimentos foram realizados pela auxiliar para que a pesquisadora não tocasse em nenhuma superfície metálica antes da realização da biópsia.

Uma fita adesiva (fita mágica, 810 Scotch ® - 3M) com uma perfuração central de 1,6 mm de diâmetro ($\pm 0,03$), foi firmemente aderida à superfície vestibular em um dos incisivos centrais superiores decíduos de cada participante do estudo, demarcando a área de biópsia. Nesta área de esmalte

exposto, foram depositados 5 µl de HCl 1,6 Molar, preparado em glicerol a 70% (v/v). A gota de ácido foi agitada durante 20 segundos, utilizando-se a ponta da ponteira, sendo aspirada e transferida para um tubo de coleta (Axygen Scientific, Inc., Union City, USA) contendo 200 µl de água ultrapurificada tipo MILLI-Q. Para recuperar o residual de ácido e esmalte dissolvido, 5 µl de água ultrapurificada tipo MILLI-Q foram colocados no esmalte, agitados por 10 segundos, aspirados e reunidos à solução de biópsia no tubo de coleta. As concentrações de chumbo (Pb) e de fósforo (P) foram determinadas nesta solução. Finalizada a biópsia, a fita foi removida e o dente lavado com água durante 30 segundos, seco com jatos de ar e isolado novamente para receber aplicação de fluoreto em gel (Anexo 5).

Foram realizadas biópsias controles na superfície da bancada ou sobre as tampas dos suportes para ponteira, para verificar a contaminação pelo chumbo no ambiente de trabalho durante os procedimentos. Todo o material utilizado, bancada onde os instrumentais e pipetas ficavam dispostos eram limpos com uma solução de ácido nítrico (HNO₃) a 10%, a fim de remover possíveis contaminações prévias pelo chumbo. Os tubos de coleta também foram previamente lavados com ácido nítrico a 10%, ou seja, deixou-se na solução durante 24 h e em seguida foram enxaguados 20 vezes com água ultrapurificada tipo MILLI-Q, sendo secos em uma capela descontaminada de metais.

Exames clínicos de defeitos de esmalte e cárie

Os exames foram conduzidos sob luz artificial, secagem da superfície com ar e gaze, espelho clínico e sonda tipo *"ball point"* CPI (Community Periodontal Index) recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A prevalência de cárie foi descrita pelo índice ceos, que consiste na soma das superfícies cariadas, perdidas e obturadas dos dentes decíduos, segundo os critérios da OMS ²⁷ e a prevalência de defeitos de esmalte pelo índice de defeitos no esmalte dentário (Índice DDE), o qual descreve os diferentes tipos de defeitos de esmalte desde opacidades a hipoplasias ⁷. Os exames foram

conduzidos por uma única examinadora calibrada, sendo o erro intra-examinador calculado durante o treinamento. Cerca de 10% do total da amostra foram selecionados ao acaso para reexame, calculando-se o erro intra-examinador durante a coleta de dados.

Determinação de chumbo

Para evitar uma possível evaporação e perda do volume das amostras, optou-se por desidratá-las, assim estas foram colocadas em um dessecador com cloreto de cálcio anidro (CaCl_2) durante 36 horas. Este procedimento foi previamente testado para verificar se não ocorreriam alterações das mesmas. No momento das dosagens de chumbo e de fósforo, as amostras foram hidratadas novamente com 210 μl de água ultrapurificada tipo MILLI-Q, agitadas e divididas em duas partes, sendo uma utilizada para a dosagem do chumbo e outra para dosagem de fósforo.

A determinação de chumbo foi realizada em um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) (Perkin-Elmer mod. 4100 ZL); o aparelho foi calibrado com soluções padrão contendo de 0 a 100 ppb de chumbo. A amostra foi misturada a 490 μl da seguinte solução: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ a 0,2% (w/v), Triton X-100 a 0,5% (v/v) e HNO_3 a 0,2%. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Química Analítica "Henrique Bergamin Filho" do CENA/USP.

A análise da concentração de fósforo foi realizada a fim de determinar a quantidade de esmalte retirado da superfície dental e a profundidade da biópsia, para que pudesse ser calculada a quantidade de chumbo em μg por g de esmalte removido (ppm). O fósforo foi dosado pelo método colorimétrico de Fiske & Subbarow⁸. Assim, foram pipetados 105 μl de amostra, 295 μl de água ultrapurificada tipo MILLI-Q, 83 μl de ácido molibdico. Agitou-se a mistura e após 10 minutos adicionou-se 33 μl de redutor, agitou-se novamente e, após 20 minutos, a intensidade de cor foi medida em um espectrofotômetro (Beckman DU-70) num comprimento de onda de 660 nm. O aparelho foi calibrado com amostras que apresentavam concentrações conhecidas de fósforo, estas foram

iguais a: 0,58 µg/ml, 1,16 µg/ml, 2,32 µg/ml, 4,65 µg/ml e 9,30 µg/ml. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Oral da FOP/UNICAMP.

Considerando que o esmalte humano contém 17 % de P^{15, 25}, em peso, foi possível determinar a massa de esmalte removida em g. Para a determinação da espessura da camada de esmalte removido, ou seja, a profundidade da biópsia em µm, a massa de esmalte foi dividida pela densidade do esmalte (2,95 g/cm³)^{15, 25} e multiplicada pela área da biópsia (2,0 mm²). Este cálculo foi deduzido a partir da fórmula do volume do cilindro (figura geométrica que se assemelha à camada do esmalte removido) na qual a profundidade equivale à altura do cilindro. A concentração de chumbo foi expressa em relação a quantidade de esmalte removido (µg Pb/g).

Questionário

Informações sobre o nível sócio-econômico foram coletadas através da aplicação de um questionário às mães ou responsáveis das crianças, pelas agentes de saúde das pré-escolas, contendo informações relacionadas à renda familiar e grau de instrução das mães.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o emprego dos softwares estatísticos SAS (Statistical Analysis System)²¹ e EPI-Info, versão 5.0⁶. Utilizaram-se estudos de correlação de Pearson, teste de Qui-quadrado e por tratar-se de um estudo de coorte, foi calculado o risco relativo (RR) ao nível de significância de 5%, considerando cada região separadamente. Os dados de ppm de Pb apresentados na Figura 1 foram transformados em logaritmo na base 10 para melhor visualização.

RESULTADOS

Durante o treinamento, para a cárie a porcentagem de concordância intra-examinador foi de 97,6% e o Kappa de 0,8; e para os defeitos de esmalte

(DDE) a porcentagem de concordância foi 97,7%; portanto, dentro dos parâmetros de confiabilidade^{4, 7, 26}.

Na coleta de dados, a porcentagem de concordância do erro intra-examinador foi de 99% e o Kappa foi de 0,9 para a cárie, sendo de 90% de concordância para os defeitos, também acima dos níveis aceitáveis para confiabilidade dos dados^{4, 7, 26}.

A perda amostral foi de 36,8% na região industrial e 7,1% na não industrial.

O valor médio ($\pm$ desvio padrão [dp]) de fósforo encontrado nas amostras de biópsia de esmalte no grupo dos expostos (região industrial) foi de 4,1 ($\pm$ 1,5) μ g/ml e de 4,4 ($\pm$ 1,6) μ g/ml no grupo de não expostos (região não industrial). A média da massa de esmalte removido ($\pm$ dp) foi de 0,24 ($\pm$ 0,095) μ g e 0,25 ($\pm$ 0,097) μ g, respectivamente, sendo que não houve diferença estatística da profundidade das biópsias ($\pm$ dp) entre os grupos das diferentes regiões ($p>0,05$), sendo de 4,1 ($\pm$ 1,5) μ m no grupo dos expostos e de 4,4 ($\pm$ 1,6) μ m nos não expostos.

Encontrou-se correlação negativa entre concentração de chumbo e total de defeitos de esmalte ($r=-0,1497$ e $p=0,0357$) na região não industrial, não sendo observada na região industrial ($p>0,05$). Quando o total de defeitos foi analisado separadamente, não houve correlação ($p>0,05$) entre concentração de chumbo e hipoplasia, concentração de chumbo e opacidade demarcada e concentração de chumbo e opacidade difusa tanto na região industrial como na região não industrial.

Os resultados da relação entre concentração de chumbo e defeitos de esmalte nas regiões industrial e não industrial estão expressos na tabela 1.

Tabela 1

Segundo a tabela 1, não houve associação entre apresentar maior concentração de chumbo (acima da média e mediana) e a presença de defeitos de esmalte em nenhuma das regiões ($p>0,05$).

O risco relativo (RR) entre concentração de chumbo (140 e 220 ppm) e defeitos de esmalte foi de 1,01 ($0,87 < RR < 1,16$) e 1,03 ($0,89 < RR < 1,19$), respectivamente, para a região industrial, e 1,03 ($0,91 < RR < 1,16$) e 0,99 ($0,86 < RR < 1,14$), respectivamente, para a região não industrial, não evidenciando uma relação de risco ($p > 0,05$).

A distribuição dos defeitos de esmalte segundo a concentração de chumbo encontrada no esmalte dos dentes decíduos nas crianças das regiões industrial e não industrial está representada na Figura 1. Não houve correlação entre concentração de chumbo e cárie em ambas as regiões ($p > 0,05$).

Figura 1

A relação entre concentração de chumbo e cárie das amostras das regiões industrial e não industrial encontra-se na tabela 2.

Tabela 2

Houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção de indivíduos com presença de cárie e concentrações de chumbo maiores que 140 e 220 ppm daqueles com presença de cárie e concentrações de chumbo menores ou iguais a 140 e 220 ppm apenas na região não industrial ($p = 0,0223$ e $p = 0,0141$, respectivamente).

Houve risco aumentado de cárie nas crianças da região não industrial com dosagens de chumbo acima da mediana e média, com risco de 1,40 ($1,05 < RR < 1,88$) e 1,46 ($1,10 < RR < 1,93$), respectivamente; o que não foi verificado nas crianças da região industrial, 0,98 ($0,67 < RR < 1,43$) e 0,89 ($0,60 < RR < 1,32$), respectivamente.

Houve diferença estatisticamente significativa da renda familiar ($p < 0,0001$) e o grau de instrução ($p < 0,0001$) entre os grupos da área industrial e não industrial, sendo maiores na área industrial.

DISCUSSÃO

Considerando que não existem valores de referência definidos na literatura para concentrações de chumbo no esmalte dentário, que reflitam um

quadro de intoxicação por chumbo ou ainda que se relacione com defeitos de esmalte e cárie, selecionou-se duas concentrações de chumbo nos dentes decíduos (mediana e média) as quais ainda podem não ser as ideais e assim, os resultados devem ser avaliados sob este enfoque. Os trabalhos da literatura nacional estabeleceram valores de referência apenas para sangue e relataram a importância da verificação do chumbo como exame de rotina ¹⁹, porém o sangue indica exposição recente pelo chumbo, diferente do esmalte dentário, que indica exposição passada.

Outra limitação diz respeito a não homogeneidade dos grupos de expostos e não expostos ao chumbo. Apesar da literatura apresentar a caracterização do nível sócio-econômico a partir da rede de ensino ¹⁶, verificou-se posteriormente que na região industrial, tanto o nível de escolaridade da mãe como a renda familiar foram superiores aos do grupo não exposto, podendo ter atuado como fatores de confusão, exercendo assim, um papel talvez mais importante que a contaminação ambiental por chumbo da região industrial. Outra questão que pode ter interferido foi a maior perda amostral neste grupo. Assim, os resultados destas relações entre chumbo e cárie devem ser analisados com cautela, bem como as relações entre chumbo e defeitos de esmalte.

Nesse estudo não se verificou relação entre nenhuma das concentrações de chumbo analisadas e defeitos de esmalte nos dentes decíduos, sendo que os resultados das correlações e risco relativo entre concentração de Pb e defeitos de esmalte, quando existiram, foram fracos.

Considerando a região não industrial, cuja correlação foi negativa, esta relação deve ser melhor investigada, já que este resultado diverge de alguns relatos da literatura ^{1, 12}, mesmo porque neste estudo variáveis de confundimento, que não foram controladas, podem estar interferindo nos resultados, apesar de ter-se partido de dois grupos teoricamente homogêneos entre si, ou seja, pré-escolares do ensino público.

Entretanto, os estudos da literatura também não apresentam resultados conclusivos, relatando a relação entre chumbo nos tecidos dentários e defeitos de esmalte de forma indireta. Ao analisar-se a Figura 1, verificou-se que existiam mais casos de crianças com defeitos de esmalte mesmo na ausência de concentração de chumbo na região industrial, indicando que outros fatores devem estar contribuindo para a presença destes defeitos. Além do mais, a visualização das regiões industrial e não industrial na Figura 1, permite verificar que onde houve maior concentração de chumbo houve maior número de defeitos de esmalte na região industrial do que na não industrial e assim, torna-se necessária a condução de novos trabalhos que investiguem exposição ao chumbo e sua relação com defeitos de esmalte.

Quanto à relação entre chumbo e cárie na região não industrial observou-se uma maior proporção de indivíduos com presença de cárie nas concentrações de chumbo maiores que a média e mediana, existindo assim o risco relativo de ter cárie na presença de chumbo nesta região.

Os dados do presente estudo, sobre a relação entre chumbo e cárie, foram concordantes com os achados de Brudevold *et al.*, Gil *et al.* e Watson *et al.*^{2, 12, 24}.

Esse trabalho não encontrou dados que evidenciam a relação entre concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos e defeitos de esmalte em nenhuma das regiões pesquisadas, entretanto, encontrou relação entre chumbo e cárie na região não industrial, ressaltando a necessidade de mais estudos destas relações considerando a importância dos fatores sócio-econômicos para a doença cárie.

AGRADECIMENTOS

À doutoranda Débora Dias da Silva do PPG-Odontologia, área Cariologia da FOP/UNICAMP, pela fundamental colaboração durante a realização das biópsias de esmalte e exames clínicos.

Às crianças e seus responsáveis por autorizarem sua participação na pesquisa.

À Professora Dra. Raquel F. Gerlach pela preciosa contribuição na orientação deste trabalho. Ao Professor Francisco José Krug, responsável pelo Laboratório de Química Analítica do CENA/USP pela orientação e à técnica Iolanda A. Ruffini pela realização das dosagens de chumbo. À técnica Mariza de Jesus Carlos Soares do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP/UNICAMP pelo auxílio nas dosagens de fósforo. A Dra. Sueli A. Araújo, por possibilitar a realização deste estudo, junto ao Setor de Saúde do Escolar da Secretaria de Educação da Prefeitura Municipal de Piracicaba. À FAPESP, pela concessão dos recursos financeiros para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Brook AH, Fearne JM, Smith JM. Environmental causes of enamel defects. In: Symposium on Dental Enamel, 1996, Ciba Foundation. *Proceedings*. New York: John Wiley & Sons, 1997. Ciba Foundation Symposium, v.205.
2. Brudevold F, Aasenden R, Srinivasian BN, Bakhos Y. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. *J Dent Res* 1977;56:1165-1171.
3. Brudevold F, Reda A, Aasenden R, Bakhos Y. Determination of trace elements in surface enamel of human teeth by a new biopsy procedure. *Arch Oral Biol* 1975;20:667-673.
4. Bulman JS, Osborn JF. Measuring diagnostic consistency. *Br Dent J* 1989;166:377-381.
5. Creedon MI, O'Mullane DN. Factors affecting caries levels amongst 5-year old children in country Kerry, Ireland. *Community Dent Health* 2001;18:72-8.
6. Dean AG, Dean JA, Burton AH, Dicker RC. *Epi Info, Version 5: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on micro-computers*. [computer program]. Atlanta: Centers for Disease Control; 1990.
7. Fédération Dentaire Internationale. Comissão on Oral Health, Research and Epidemiology. A review of the developmental defects of enamel index (DDE Index). *Int Dent J* 1992;42:411-426.
8. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.
9. Freitas CU. Estratégias de abordagem para exposição ambiental ao chumbo no Estado de São Paulo. 2002: disponível em URL: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/chumbo.htm>

10. Gerlach RF, Sousa MLR, Cury JA. Esmalte dentário com defeitos: de marcador biológico a implicações clínicas. *Rev Odonto Ciência* 2000;15:87-102.
11. Gerlach RF, Souza AP, Cury JA, Line SRP. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. *Eur J Oral Sci* 2000;108:327-334.
12. Gil F, Facio A, Villanueva E, Pérez ML, Tojo R, Gil A. The association of tooth content with dental health factors. *Sci Total Environ* 1996;192:183-191.
13. Gomes VE, Gerlach RF, Sousa MLR, Krug FJ. Concentração de chumbo em dentes decíduos de pré-escolares de Piracicaba, SP, Brasil – Estudo Piloto. *Rev Odonto Ciência* 2003;18:3-7.
14. Gomes VE, Sousa MLR, Barbosa FJr., Krug FJ, Saraiva MCP, Cury JA, Gerlach RF. *In vivo* studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ* 2004;320:25-35.
15. Koo RH, Cury JA. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. *Am J Dent* 1998;11:173-6.
16. Maltz M, Silva BB. Relação entre cárie, gengivite e fluorose e nível socioeconômico em escolares. *Rev Saúde Pública* 2001;35:170-6.
17. Narvai PC, Castellanos RA. *Levantamento das condições de saúde bucal – Estado de São Paulo, 1998 : caderno de instruções*. São Paulo: Universidade de São Paulo - Faculdade de Saúde Pública - Núcleo de Estudos e Pesquisas de Sistemas de Saúde; 1998.
18. Oliveira, AGR. Levantamentos epidemiológicos em saúde bucal: análise metodológica proposta pela Organização Mundial da Saúde. *Rev Bras Epidemiol* 1998;1:180-4.

19. Paoliello MMB, Gutierrez PR, Turini CA, Matsuo T, Mezzaroba L, Barbosa DS et al. Valores de referência para plumbemia em uma população urbana do Sul do Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 2001;9:315-19.
20. Rabinowitz MB. Relating tooth and blood lead levels in children. *Bull Environ Contam Toxicol* 1995;55:853-57.
21. SAS Institute Inc., *SAS OnlineDoc®*, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.
22. Simons TJ. Cellular interactions between lead and calcium. *Br Med Bull* 1986;42:431-34.
23. Tvinnereim HM, Eide R, Riise T, Wesenberg GR, Fosse G, Steinnes E. Lead in primary teeth from Norway: changes in lead levels from the 1970s to the 1990s. *Sci Total Environ*. 1997; 207(2/3):165-177.
24. Watson GE, Davis BA, Raubertas RF, Pearson SK, Bowen WH. Influence of maternal lead ingestion on caries in rat pups. *Nature Med* 1997;3:1024-25.
25. Weidmann SM, Weatherell JA, Hamm SM. Variations of enamel density in sections of human teeth. *Arch Oral Biol* 1967;12:85-97
26. World Health Organization. *Oral Health Surveys - Basic methods*. 3rd ed. Geneva: WHO; 1987.
27. World Health Organization. *Oral health surveys: basic methods*. 4th ed. Geneva: WHO; 1997.

Tabela 1. Concentração de chumbo no esmalte de acordo com a região em dentes decíduos de pré-escolares e presença ou ausência de defeitos de esmalte. Piracicaba, 2001.

Concentrações de Pb (µg/g)	Região			
	Industrial (n=132)		Não industrial (n=197)	
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
> 140*	68 (51,6%) ^a	12 (9,0%)	71 (36,0%) ^a	13 (6,6%)
≤ 140	44 (33,4%) ^a	8 (6,0%)	93 (47,2%) ^a	20 (10,2%)
Total	112	20	164	33
> 220**	45 (34,0%) ^a	7 (5,3%)	47 (23,9%) ^a	10 (5,0%)
≤ 220	67 (50,8%) ^a	13 (9,9%)	117 (59,4%) ^a	23 (11,7%)
Total	112	20	164	33

Valores seguidos por letras distintas, na coluna, indicaram diferença estatisticamente significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).

* valor da mediana das concentrações de Pb

** valor da média das concentrações de Pb

Tabela 2. Concentração de chumbo no esmalte de acordo com a região em dentes decíduos de pré-escolares e presença ou ausência de cárie. Piracicaba, 2001.

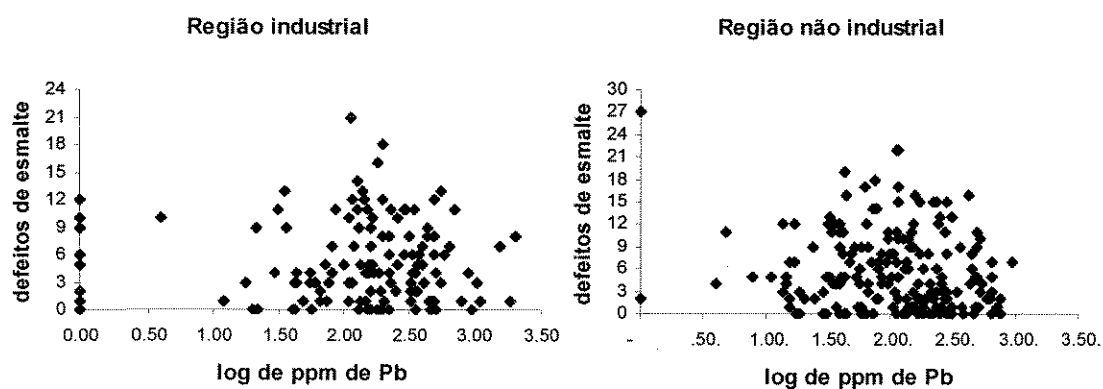
Concentrações de Pb (µg/g)	Região			
	Industrial (n=132)		Não industrial (n=197)	
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
> 140*	36 (27,3%) ^a	44 (33,4%)	48 (24,4%) ^a	36 (18,3%)
≤ 140	24 (18,1%) ^a	28 (21,2%)	46 (23,3%) ^b	67 (34,0%)
Total	60	72	94	103
> 220**	22 (16,7%) ^a	30 (22,8%)	35 (17,8%) ^a	22 (11,2%)
≤ 220	38 (28,7%) ^a	42 (31,8%)	59 (29,9%) ^b	81 (41,1%)
Total	60	72	94	103

Valores seguidos por letras distintas, na coluna, indicaram diferença estatisticamente significativa pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).

* valor da mediana das concentrações de Pb

** valor da média das concentrações de Pb

Figura 1. Distribuição dos defeitos de esmalte dentário de acordo com a concentração de chumbo no esmalte de cada criança da região industrial e não industrial. Piracicaba, 2001.



3.3. CAPÍTULO 3

Relationship between developmental defects of enamel and dental caries in preschool children from Piracicaba, SP, Brazil

Viviane Elisângela Gomes

Débora Dias da Silva

Rosana Helena Schlittler Hoffmann

Ronaldo Seichi Wada

Maria da Luz Rosário de Sousa**

Faculty of Dentistry of Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil.

***Corresponding author. Address: Faculty of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas (FOP/UNICAMP), Department of Community Dentistry, Avenida Limeira, 901, CEP 13414-900, Piracicaba, SP, Brazil. Tel. +55-19-3412-5364; fax: +55-19-3412-5318.*

Abstract

Assessing the relationship between developmental defects of enamel and prevalence of dental caries in deciduous teeth. The population was composed of 2,846 preschool children from Piracicaba, in São Paulo state, Brazil. Clinical examinations to record developmental defects of enamel (presence of hypoplasia and demarcated opacity) and for dental caries (dmft index) were carried out using WHO diagnostic criteria. Developmental defects of enamel and caries lesions were diagnosed without drying or cleaning the teeth prior to examination. Chi-square test was employed with 5% of significance and also relative risk (RR) was calculated with confidence intervals (95% CI). The relationship between hypoplasia and dental caries was statistically significant ($p < 0.0001$), but not between demarcated opacities and dental caries ($p = 0.4110$). Children with hypoplasia had 27.0% more chance to have caries, but those with demarcated opacities do not. This study indicated that the presence of hypoplasia in deciduous teeth could be a factor of dental caries risk, suggesting that this exam should be used in epidemiological surveys.

Introduction

Epidemiological knowledge of enamel defects is important in oral public health, because they are a considerable risk factor in dental caries. It may also contribute to assessing and monitoring environmental or systemic factors, and to detecting possible aetiological factors responsible for their occurrence (Dini *et al.*, 2000; Slayton *et al.*, 2001).

Dental enamel with irregularities and abnormalities has been associated with some aetiological factors including systemic, genetic, local and environmental conditions and also many epidemiologic studies have been conducted to check its prevalence.

Developmental defects of enamel are defined as defects of enamel matrix formation, and the type of defect is dependent on the amelogenesis stage, and the duration and severity of the insult to the ameloblast cells (King & Wei, 1986; Suckling, 1989). They are often classified as hypoplasias and opacities. Hypoplasia has been defined as a quantitative defect caused by disturbances in the formation period of the enamel organic matrix (secretory stage) and can be seen clinically, as a loss of enamel structure. Opacities may be called a qualitative defect, produced by a disturbance in the maturation period (calcification stage), involving an alteration, variable in degree, in the enamel translucency, and the enamel surface also showing normal thickness (FDI, 1982; FDI, 1992; Li *et al.*, 1996).

Several studies related prevalence ranging from 24 to 31.9% for enamel defects in primary dentition (Vignarajah & Williams, 1992; Kanchanakamol *et al.*, 1996). Recent reports showed that the prevalence of hypoplasias in primary dentition varies considerably: 6% (Slayton *et al.*, 2001), 14.1% (Milgrom *et al.*, 2000), 15.5% (Matee *et al.*, 1994), 22.3% (Li *et al.*, 1996), 22.7% (Kanchanakamol *et al.*, 1996). The prevalence of demarcated opacities in primary teeth varies around 1.6% (Li *et al.*, 1995), 9.3% (Kanchanakamol *et al.*, 1996), 27% (Slayton *et al.*, 2001).

Other studies have shown that developmental defects of enamel may indicate an increased risk of caries, and particular attention has been focused on hypoplasias, because they would provide lower resistance to the effects of low pH frequently caused by a highly cariogenic diet (Milgrom *et al.*, 2000). This kind of enamel defect can also make bacterial colonization easier (Matee *et al.*, 1994; Kanchanacamol *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997; Leppäniemi *et al.*, 2001).

As there are few studies that relate enamel defects with dental caries in primary dentition and the same is observed in Brazilian literature, this study aimed to: report the relationship of developmental defects of enamel, like hypoplasias and demarcated opacities, and dental caries prevalence in deciduous teeth.

Material and Methods

Population description

Authorization was obtained from the children's guardians to carry out the examinations, by free consent after they had been given all the due information about what was being done. These terms of consent were sent with respect to all the children enrolled in the public pre-schools of Piracicaba (n=3,375), from lists supplied by the institutions.

This cross-sectional study was a census that included a total of 2,846 preschool children from 4 to 6 years of age, who attended 37 public kindergartens in the city of Piracicaba, SP, Brazil and this sample was stratified by gender (Table 1).

During the period between February and May 1999 the data were collected and intra-examiner variability was ascertained by re-examining about 10.0% of the children.

With regard to diet, the pre-scholars were exposed to the same dietary standard in all the pre-schools.

Clinical examination

For the caries status, the Kappa values ranged from 0.75 to 1,0 and the percent agreement ranged from 73.2% to 100.0%. There was 96.9% and 98.1% agreement for hypoplasia and demarcated opacity, respectively.

The prevalence of developmental defects of enamel was 16.4% in general and the respective prevalences of hypoplasia and demarcated opacities were 9.1 and 7.3% in the entire sample.

The prevalence of demarcated opacity and hypoplasia was stratified according to gender and is shown in Table 1. There was no statistically significant difference between hypoplasia and demarcated opacity and gender ($p>0.005$).

Insert Table 1

The proportion of children with caries was greater among those that presented hypoplasias ($p<0,0001$). However, there was no statistically significant difference between the proportion of children with and without caries and demarcated opacities ($p=0.4110$). These results are shown in Table 2.

Insert Table 2

The relative risk (RR) study among the variables caries, hypoplasia and demarcated opacity confirmed the previous results, that is to say, among the children with hypoplasia there was an increased risk of having caries, 1.27 ($1.15<RR<1.41$). Therefore, among the children that presented only demarcated opacities, no increased risk of caries was seen, 1.06 ($0.93<RR<1.21$).

Discussion

This study enrolled all preschool children present in the kindergarten on examination day; the loss was small (16.9%). The data characterized a Piracicaba

census about enamel defects and dental caries for primary dentition in children ranging from 4 to 6 years old. For this view, there were no possibilities of sample errors and also the data certainly are representative. In addition, the employment of the d component of dmft index was a great advantage in this study, because it eliminated the possibility of confounding factors associated with different clinical diagnosis, which can occur when the m and f components are considered for the index calculation.

Therefore, the prevalence of hypoplasia was 9.1%; this data was shown to be close to that of some other studies: 6% in Iowa (Slayton *et al.*, 2001), 14.1% in Island of Saipan (Milgrom *et al.*, 2000), 15.5% in Tanzania (Matee *et al.*, 1994) and less than some others: 22.3% in China (Li *et al.*, 1996), 22.7% in Thailand (Kanchanakamol *et al.*, 1996). In addition, the prevalence of demarcated opacities (7.3%) was higher than Li *et al.* (1995) reported in China (1.6%), closer to that Kanchanakamol *et al.* (1996) reported in Thailand (9.3%) and lower than that Slayton *et al.* (2001) reported in Iowa (27%). However, it is difficult to compare the results because the prevalence of developmental defects of enamel rates varies considerably depending on the population studied, the teeth examined, the criteria used to diagnose enamel defects, such as whether demarcated opacities were included in the diagnosis (Seow, 1991). Factors like racial, ethnical, nutritional or socio-economical status and birth weight may also be related. Moreover, in this study the fact that the childrens' teeth were not brushed before the exam, and that it was done under natural lighting, could have produced underestimated data. Therefore these results should be compared carefully.

Some authors believe that enamel defects are an important indicator of caries risk (Seow, 1998) because the enamel ultra-structure probably was abnormal and more susceptible to demineralization by organics acids (Suckling *et al.*, 1987). However, the studies showed the importance of describing demarcated opacities and hypoplasia separately and then to compare each of them with dental caries (Kanchanakamol *et al.*, 1996). This study has confirmed this mean, because

hypoplasia showed a relationship to dental caries ($p < 0.0001$) and no relationship between demarcated opacities and dental caries was observed ($p = 0.4110$).

The majority of the studies agree that hypoplasias are related to dental caries (Matee *et al.*, 1994; Kanchanacamol *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997; Milgrom *et al.*, 2000; Leppäniemi *et al.*, 2001), however, it is clear that further studies should be developed to find the cause of the enamel alteration, considering the fact that the enamel is a biological indicator of the past history of some of the factors being exposed, not only related to caries risk but to other diseases as well.

Therefore, the relevance of including enamel defects in epidemiological surveys was demonstrated and, according WHO recommendations, it should be given more attention.

Conclusion

This study indicated that the presence of hypoplasia in deciduous teeth could be a factor of dental caries risk, making clear the importance of including the developmental enamel defects indicator in epidemiological surveys.

Acknowledgement:

The children and their parents or guardians are thanked for agreeing to allow the epidemiological exams to be made. Thanks also to the dentist teams, examiners and writers, for collecting the epidemiological data and special thanks to Dr. Cristina M. Lisboa and Sueli A. Araújo for agreeing to allow the research to be conducted.

References

- Dean AG, Dean JA, Burton AH, Dicker RC. ***Epi Info, Version 5: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on micro-computers***. [computer program]. Atlanta: Centers for Disease Control; 1990.
- Dini EL, Holt RD, Bedi R. Prevalence of caries and developmental defects of enamel in 9-10 year old children living in areas in Brazil with differing water fluoride histories. ***Br Dent J***. 2000;188(3):146-9.
- Fédération Dentaire Internationale. Commission on Oral Health, Research and Epidemiology. A review of the developmental defects of enamel index (DDE Index). ***Int Dent J***. 1992;42(6):411-26.
- Fédération Dentaire Internationale. Commission on Oral Health, Research and Epidemiology. An epidemiological index of development defects of dental enamel (DDE Index). ***Int Dent J***. 1982;32(2):159-67.
- Kanchanakamol U, Tuongratanaphan S, Tuongratanaphan S, Lertpoonvilakul W, Chittaisong C, Pattanaporn K, Navia JM, Davies GN. Prevalence of developmental enamel defects and dental caries in rural pre-school Thai children. ***Community Dent Health***. 1996;13(4):204-7.
- King NM, Wei SH. Developmental defects of enamel: a study of 12 year olds in Hong Kong. ***J Am Dent Assoc***. 1986;112(6):835-9.
- Lai PY, Seow WK, Tudehope DI, Rogers Y. Enamel hypoplasia and dental caries in very-low birthweight children: a case-controlled, longitudinal study. ***Pediatr Dent***. 1997;19(1):42-9.
- Leppäniemi A, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Nonfluoride hypomineralizations in the permanent first molars and their impact on the treatment need. ***Caries Res***. 2001;35(1):36-40.
- Li Y, Navia JM, Bian J.Y. Prevalence and distribution of developmental enamel defects in primary dentition of Chinese children 3-5 years old. ***Community Dent Oral Epidemiol***. 1995;23:72-9.

- Li Y, Navia JM, Bian JY. Caries experience in deciduous dentition of rural Chinese children 3-5 years old in relation to the presence or absence of enamel hypoplasia. **Caries Res.** 1996;30(1):8-15.
- Matee M, van't Hof M, Maselle S, Mikx F, van Palenstein Helderman W. Nursing caries, linear hypoplasia, and nursing and weaning habits in Tanzanian infants. **Community Dent Oral Epidemiol.** 1994;22(5):289-93.
- Milgrom P, Riedy CA, Weinstein P, Tanner AC, Manibusan L, Bruss J. Dental caries and its relationship to bacterial infection hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6 to 36 month-old children. **Community Dent Oral Epidemiol.** 2000;28(4):295-306.
- Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol.** 1998;26(Suppl 1):8-27.
- Seow WK. Enamel hypoplasia in the primary dentition: a review. **ASDC J Dent Child.** 1991;58(6):441-52.
- Slayton R.L, Warren JJ, Kanellis MJ, Levy SM, Islam M. Prevalence of enamel hypoplasia and isolated opacities in the primary dentition. **Pediatr Dent.** 2001;23(1):32-6.
- Suckling GW, Herbison GP, Brown RH. Etiological factors influencing the prevalence of developmental defects of dental enamel in nine-year-old New Zealand children participating in a health and development study. **J Dent Res.** 1987;66(9):1466-9.
- Vignarajah S, Williams GA. Prevalence of dental caries and enamel defects in the primary dentition of Antiguan pre-school children aged 3-4 years including an assessment of their habits. **Community Dent Health.** 1992;9(4):349-60.
- World Health Organization. **Oral health surveys** : basic methods. 4th ed. Geneva, 1997. 66p.

Table 1. Prevalence of enamel defects by gender in preschool children. Piracicaba, 1999.

Prevalence of enamel defects								
Gender		Opacities		Hypoplasia		Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%
Male	1507	53.0	114	7.6	144	9.5	258	17.1
Female	1339	47.0	94	7.0	115	8.6	209	15.6
Total	2846	100.0	208	7.3	259	9.1	467	16.4

Table 2. Relation to dental caries (d), hypoplasias and demarcated opacities in deciduous teeth of preschool children . Piracicaba, 1999.

Dental caries	Hypoplasias		Demarcated Opacities		Total
	Absence	Presence	Absence	Presence	
Absence	1321 ^a	98 ^a	1321 ^a	98 ^a	1419
Presence	1266 ^a	161 ^b	1317 ^a	110 ^a	1427
Total	2587	259	2638	208	2846

Values followed by distinct letters, in vertical direction, show difference statistically significative by Chi-square test ($p < 0.05$).

4. DISCUSSÃO GERAL

Esta tese teve como proposição investigar sobre a presença do chumbo (Pb) no esmalte dentário, através de uma técnica, *in vivo*, de biópsia de esmalte, de crianças expostas a fontes ambientais diferenciadas pela presença de indústrias, bem como a relação entre estas concentrações de chumbo, defeitos de esmalte e cárie nestas crianças e ainda, verificar a relação entre defeitos de esmalte e cárie na população de pré-escolares de Piracicaba.

No capítulo 1, verificou-se que a concentração de chumbo na superfície do esmalte dentário das crianças que residiam na região industrial foi mais alta que aquela encontrada nas crianças da região não industrial, corroborando os resultados de outros estudos (Anttila, 1987; Brudevold *et al.* 1975, 1977; Cleymaet *et al.*, 1991 a b c; Purchase & Fergusson, 1986), entretanto a técnica, *in vivo*, de biópsia de esmalte nunca havia sido realizada em dentes decíduos até o presente. Os estudos relatados anteriormente envolveram crianças maiores (Brudevold *et al.* 1975, 1977; Cleymaet *et al.*, 1991 a b c) ou utilizaram outras técnicas para a determinação do chumbo em dentes decíduos (Anttila, 1987).

É importante ressaltar que a apresentação dos resultados de concentração de chumbo na superfície do esmalte relacionada com a profundidade da biópsia de esmalte foi extremamente relevante neste estudo, pois encontrou-se que algumas crianças com altos níveis de Pb pertenciam aos grupos com biópsias de esmalte mais profundas. Estas crianças merecem ser melhor investigadas, uma vez que, segundo os resultados a maioria das crianças estudadas apresentaram níveis de chumbo na superfície do esmalte menores que os relatados na literatura internacional, isto pode estar relacionado ao fato de Piracicaba não ser uma cidade com altos níveis de poluição. Entretanto, as mães das crianças que apresentaram altos níveis de Pb poderiam ter sido expostas, no período gestacional, a outras fontes de Pb tais como: emissões industriais não controladas, exposição ocupacional e hábitos dos familiares.

No capítulo 2, deve ser considerado que não existem valores de referência definidos na literatura para tolerância biológica ao chumbo no esmalte dentário, para os quais houvesse um quadro de intoxicação definido ou ainda que se relacionassem com defeitos de esmalte e cárie. Desta forma, foram selecionadas duas concentrações de chumbo nos dentes decíduos (mediana e média) as quais ainda podem não ser as ideais e assim, os resultados devem ser avaliados sob este enfoque. Os trabalhos da literatura nacional estabeleceram valores de referência apenas para sangue e relataram a importância da verificação do chumbo como exame de rotina (Paoliello *et al.*, 2001), porém o sangue indica exposição recente pelo chumbo, diferente do esmalte dentário, que indica exposição pregressa.

Em acréscimo, a não homogeneidade dos grupos de expostos e não expostos ao chumbo é um fato que deve ser ressaltado. Apesar da literatura apresentar a caracterização do nível sócio-econômico a partir da rede de ensino (Maltz e Silva, 2001), verificou-se posteriormente que na região industrial, tanto o nível de escolaridade da mãe como a renda familiar foram superiores aos do grupo não exposto, podendo ter atuado como fatores de confusão, exercendo assim, um papel talvez mais importante que a exposição ambiental ao chumbo na região industrial. Outra questão que pode ter interferido foi a maior perda amostral neste grupo. Assim, a ausência de relação entre a presença de chumbo e cárie nas crianças do grupo exposto deve ser analisada com cautela, bem como a ausência de relações entre chumbo e defeitos de esmalte em ambos os grupos.

O capítulo 3 consistiu em um censo da população de pré-escolares de Piracicaba relacionando prevalência de defeitos de esmalte e cárie na dentição decídua. A prevalência dos defeitos de esmalte mostrou-se próxima daqueles relatados pela literatura internacional, tanto para hipoplasia que foi de 9,1% no presente (Slayton *et al.*, 2001; Milgrom *et al.*, 2000; Matee *et al.*, 1994) como para opacidades demarcadas que foi de 7,3% neste estudo (Kanchanakamol *et al.*, 1996). Entretanto, é difícil comparar os resultados porque a prevalência de defeitos de esmalte pode variar, consideravelmente, dependendo da população

estudada, dentes examinados e critérios de diagnóstico para defeitos de esmalte, principalmente quando opacidades demarcadas são incluídas no diagnóstico (Seow, 1991). Fatores como raça, etnia, nutrição, nível sócio-econômico e peso ao nascer podem também estar relacionados. Assim, neste estudo, o fato das crianças não terem escovado seus dentes antes do exame e este ter sido feito sob luz natural (WHO, 1997), pode ter subestimado os resultados.

Alguns autores acreditam que os defeitos de esmalte são um importante indicador do risco de cárie (Seow, 1998), uma vez que, a ultraestrutura do esmalte com defeitos pode ter alterações que o torna mais susceptível à desmineralização por ácidos orgânicos (Suckling *et al.*, 1987). Entretanto, outros autores relataram a importância da descrição das opacidades demarcadas e hipoplasias, separadamente, bem como sua relação com a cárie dentária (Kanchanacamol *et al.*, 1996). O presente estudo confirma este relato, uma vez que a presença de hipoplasias mostrou relação com a cárie dentária e esta relação não foi observada entre as opacidades demarcadas e a cárie.

Em síntese, a presente tese compilou achados e relatos literários os quais contribuem para o estudo da doença cárie de forma abrangente. Uma vez que, buscou elucidar através da epidemiologia uma hipótese sustentada por resultados encontrados em estudos *in vitro* e com animais. Assim, vem contribuir com a literatura nacional e internacional, através dos estudos apresentados nos capítulos 1, 2 e 3, com resultados da relação da presença do chumbo na superfície do esmalte, os defeitos de esmalte e cárie em dentes decíduos, discutindo o impacto destes achados para a saúde pública e pontuando novas questões para que mais respostas sejam obtidas no futuro a fim de que a doença cárie seja ainda melhor entendida quanto a sua multifatorialidade.

5. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados encontrados no Capítulo 1, a técnica de biópsia de esmalte *in vivo* mostrou-se uma ferramenta epidemiológica adequada para a determinação do conteúdo de chumbo na superfície do esmalte de dentes decíduos.

O estudo referente ao Capítulo 2, em dentes decíduos, não encontrou dados que evidenciassem a relação entre presença de chumbo na superfície do esmalte e defeitos de esmalte em nenhuma das regiões pesquisadas, entretanto, encontrou relação entre chumbo e cárie na região não industrial, ressaltando a necessidade de mais estudos destas relações considerando a relevância dos fatores sócio-econômicos para a cárie dentária.

Em relação ao Capítulo 3, os resultados indicaram que a presença de hipoplasia pode ser considerada como um fator de risco para a cárie dentária em dentes decíduos, porém opacidades demarcadas não foram fator de risco para a cárie dentária neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Introdução Geral e Discussão Geral)*

Adonaylo VN, Oteiza PI. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*. 1999;135(2/3):77-85.

Alaluusua S, Lukinmaa PL, Koskimies M, Pirinen S, Holtta P, Kallio M, Holttinen T, Salmenpera L. Developmental dental defects associated with long breast feeding. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(5/6):493-97.

Alaluusua S, Lukinmaa PL, Torppa J, Tuomisto J, Vartiainen T. Developing teeth as biomarker of dioxin exposure. *Lancet*. 1999;353(9148):206.

Alaluusua, S. *et al*. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans via mother's milk may cause developmental defects in the child's teeth. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1996;1(3):193-7.

Anttila A. Trace-element content in the enamel surface and whole enamel of deciduous incisors by proton-induced x-ray emission of children from rural and urban finnish areas. *Arch Oral Biol*. 1987;32(10):713-7.

Barry PSI, Mossman DB. Lead concentration in human tissues. *Br J Ind Med*. 1970;27:339-51.

Brook AH, Fearne JM, Smith JM. Environmental causes of enamel defects. *In*: SYMPOSIUM ON DENTAL ENAMEL, 1996, Ciba Foundation. *Proceedings*. New York : John Wiley & Sons, 1997. Ciba Foundation Symposium, v.205.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Brudevold F, Aasenden R, Srinivasian BN, Bakhol Y. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. **J Dent Res.** 1977;56(10):1165-71.

Brudevold F, Reda A, Aasenden R, Bakhol Y. Determination of trace elements in surface enamel of human teeth by a new biopsy procedure. **Arch Oral Biol.** 1975;20(10):667-73.

Brudevold F, Steadman LT. The distribution of lead in human enamel. **J Dent Res.** 1956;35(3):430-7.

Ceccotti HM. **Teses e dissertações; manual de normalização da UNICAMP/FOP.** / Heloisa Maria Cecotti, Danielle Dantas de Sousa. – Piracicaba: UNICAMP/FOP, 2003. 65f. : il.

Cleymaet R, Bottenberg P, Retief DH, Slop D, Michotte Y, Coomans D. In vivo use a dual acid etch biopsy for the evaluation of lead profiles in human surface enamel. **Caries Res.** 1991;25(4):256-63.

Cleymaet R, Bottenberg P, Slop D, Clara R, Coomans D. et al. Study of lead and cadmium content of surface enamel of schoolchildren from an industrial area in Belgium. **Community Dent Oral Epidemiol.** 1991;19(2):107-11.

Cleymaet R, Retief DH, Quartier E, Slop D, Coomans D, Michotte Y. A comparative study of the lead and cadmium content of surface enamel of Belgian and Kenyan children. **Sci Total Environ,** 1991;104(3):175-189.

Davies DJ *et al.* Lead intake and blood lead in two-year-old U.K. urban children. **Sci Total Environ.** 1990;90:13-29.

Eisenmann DR. Amelogenesis. In: ***Oral Histology: development structure and function***. Ed. Ten Cate AR. 5.ed. Mosby-Year Book, 1998.

Ericson JE. Enamel lead biomarker for prenatal exposure assessment. ***Environ Res***. 2001;87:136-140.

Franck U, Herbarth O, Langer O, Stärk HJ, Treide A. Lead levels in deciduous teeth in relation to tooth type and tissue as well as to maternal behavior and selected individual environmental parameters of children. ***Environ Toxicol***. 1999;14:439-54.

Freitas CU. Estratégias de abordagem para exposição ambiental ao chumbo no estado de São Paulo. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica do estado de São Paulo. 2002: Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/chumbo.htm>>.

Gerlach F, Sousa MLR, Cury JA. Esmalte dental com defeitos: de marcador biológico a implicações clínicas. ***Rev Odonto Cienc***. 2000;15(31):87-102.

Gerlach RF, Cury JA, Krug FJ, Line SRP. Effect of lead on dental enamel formation. ***Toxicol***. 2002;175:27-34.

Gerlach RF, Souza AP, Cury JA, Line SRP. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. ***Eur J Oral Sci***. 2000;108(4):327-34.

Gil F, Facio A, Villanueva E, Perez ML, Tojo R, Gil A. The association of tooth lead content with dental health factors. ***Sci Total Environ***. 1996;192(2):183-91.

Gomes VE, Gerlach RF, Sousa MLR, Krug FJ. Concentração de chumbo em dentes decíduos de pré-escolares de Piracicaba, SP, Brasil – Estudo Piloto. **Rev Odonto Cienc.** 2003;18:3-7.

Goyer RA. Lead toxicity: current concerns. **Environ Health Perspect.** 1993;100:177-87.

Gulson BL *et al.* Effect of plumbing systems on lead content of drinking water and contribution to lead body burden. **Sci Total Environ.** 1994;144(1/3):279-84.

Holttä P, Kiviranta H, Leppaniemi A, Vartiainen T, Lukinmaa PL, Alaluusua S. Developmental dental defects in children who reside by a river polluted by dioxins and furans. **Arch Environ Health.** 2001;56(6):522-8.

Hu H, Rabinowitz M, Smith D. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms. **Environ Health Perspect.** 1998;106:1-8.

Jan J, Vrbic V. Polychlorinated biphenyls cause developmental enamel defects in children. **Caries Res.** 2000;34(6):469-73.

Jin A, Kay T, Copes R. The relationship of lead in soil to lead in blood and implications for standard setting. **Sci Total Environ.** 1997;208(1/2):23-40.

Kanchanakamol U, Tuongratanaphan Suwannee, Tuongratanaphan Songvuth, Lertpoonvilaikul W, Chittaisong C, Pattanaporn K, Navia JM, Davies GN. Prevalence of developmental enamel defects and dental caries in rural pre-school Thai children. **Community Dent Health.** 1996;13(4):204-7.

Leite A. Tabagismo e a boca. **Rev Assoc Paul Cir Dent.** 2001;55(1):7-14.

Li Y, Navia JM, Bian JY. Caries experience in deciduous dentition of rural Chinese children 3-5 years old in relation to the presence or absence of enamel hypoplasia. **Caries Res.** 1996;30(1):8-15.

Maltz M, Silva BB. Relação entre cárie, gengivite e fluorose e nível socioeconômico em escolares. **Rev Saúde Pública.** 2001;35:170-6.

Matee M, van't Hof M, Maselle S, Mikx F, van Palenstein Helder W. Nursing caries, linear hypoplasia, and nursing and weaning habits in Tanzanian infants. **Community Dent Oral Epidemiol.** 1994;22(5):289-93.

Matee MI, Mikx FH, Maselle SY, Van Palenstein Helder WH. Rampant caries and linear hypoplasia. **Caries Res.** 1992;26(3):205-8.

Milgron P, Riedy CA, Weinstein P, Tañer ACR, Manibusan L, Bruss J. Dental caries and its relationship to bacterial infection hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6 to 36 month-old children. **Community Dent Oral Epidemiol.** 2000;28(4):295-306.

Montero MJ, Douglass JM, Mathieu GM. Prevalence of dental caries and enamel defects in Connecticut Head Start children. **Pediatr Dent.** 2003;25(3):235-9.

Moss ME, Lanphear BP, Auinger P. Association of dental caries and blood lead levels. **JAMA.** 1999;281(24):2294-98.

Paoliello MMB, Gutierrez PR, Turini CA, Matsuo T, Mezzaroba L, Barbosa DS et al. Valores de referência para plumbemia em uma população urbana do Sul do Brasil. **Rev Panam Salud Publica.** 2001;9:315-19.

Purchase NG, Fergusson JE. Lead in teeth: the influence of tooth type and the sample within a tooth on lead levels. **Sci Total Environ.** 1986;52(3):239-50.

- Rabinowitz MB. Relating tooth and blood lead levels in children. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1995;55(6):853-57.
- Seow WK. Enamel hypoplasia in the primary dentition: a review. *ASDC J Dent Child*. 1991;58(6):441-52.
- Seow WK. Biological mechanisms of early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1998;26(Suppl 1):8-27.
- Shapiro IM, Needleman HL, Tuncay OC. The lead content of human deciduous and permanent teeth. *Environ Res*. 1972;5:467-70.
- Shen X, Rosen JF, Guo D, Wu S. et al. Childhood lead poisoning in China. *Sci Total Environ*. 1996;181(2):101-9.
- Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ*. 2001;65(9):896-905.
- Slayton RL, Warren JJ, Kanellis MJ, Levy SM, Islam M. Prevalence of enamel hypoplasia and isolated opacities in the primary dentition. *Pediatr Dent*. 2001;23(1):32-6.
- Suckling GW, Herbison GP, Brown RH. Etiological factors influencing the prevalence of developmental defects of dental enamel in nine-year-old New Zealand children participating in a health and development study. *J Dent Res*. 1987;66(9):1466-69.
- Suckling GW, Nelson DGA, Patel NJ. Macroscopic and scanning electron microscopic appearance and hardness values of developmental defects in human permanent tooth enamel. *Adv Dent Res*. 1989;3(2):219-33.

Tvinnereim HM, Eide R, Riise T. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations. ***Sci Total Environ***. 2000;255(1/3):21-7.

Tvinnereim HM, Eide R, Riise T, Wesenberg GR, Fosse G, Steinnes E. Lead in primary teeth from Norway: changes in lead levels from the 1970s to the 1990s. ***Sci Total Environ***. 1997; 207(2/3):165-177.

Watson GE, Davis BA, Raubertas RF, Pearson SK, Bowen WH. Influence of maternal lead ingestion on caries in rat pups. ***Nature Med***. 1997;3(9):1024-5.

World Health Organization. ***Oral health surveys : basic methods***. 4th ed. Geneva, 1997. 66p.

ANEXOS

DELIBERAÇÃO CCPG – 001/98

Dispõe a respeito do formato das teses de Mestrado e de Doutorado aprovadas pela UNICAMP

Tendo em vista a possibilidade, segundo parecer PG Nº 1985/96, das teses de Mestrado e Doutorado terem um formato alternativo àquele já bem estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º - Todas as teses de mestrado e de doutorado da UNICAMP terão o seguinte formato padrão:

- I) Capa com formato único, dando visibilidade ao nível (mestrado e doutorado), e à Universidade.
- II) Primeira folha interna dando visibilidade ao nível (mestrado ou doutorado), à Universidade, à Unidade em que foi defendida e à banca examinadora, ressaltando o nome do orientador e co-orientadores. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III) Segunda folha interna onde conste o resumo em português e o Abstract em inglês.
- IV) Introdução Geral.
- V) Capítulo.
- VI) Conclusão geral.
- VII) Referências Bibliográficas.
- VIII) Apêndices (se necessários).

Artigo 2º - A critério do orientador, os Capítulos e os Apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

Parágrafo único – Os veículos de divulgação deverão ser expressamente indicados.

Artigo 3º - A PRPG providenciará o projeto gráfico das capas bem como a impressão de um número de exemplares, da versão final da tese a ser homologada.

Artigo 4º - Fica revogada a resolução CCPG 17/97.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



INTERESSADO: COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
ASSUNTO: DEFESA DE TESE EM FORMATO ALTERNATIVO

A Congregação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em sua 105ª Reunião Ordinária, realizada em 17/12/03, aprovou a exigência mínima para defesa de tese em formato alternativo na FOP, que passará a vigorar para os alunos ingressantes a partir do ano de 2004.

Para Dissertação de Mestrado: um artigo submetido para publicação em revista científica com classificação Qualis B Nacional; e

Para Tese de Doutorado: um artigo submetido para publicação em revista científica com classificação Qualis C Internacional.

Piracicaba, 18 de dezembro de 2003.

Thales Rocha de Mattos Filho
Diretor

Original assinado, está sendo enviado à Coord. de Pós-Graduação

REVISTA DE SAÚDE PÚBLICA

Journal of Public Health

RSP/777

16 de abril de 2004

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Maria da Luz Rosário de Souza
Av. Limeira, 901
13.414-900 – Piracicaba – SP

Manuscrito n° 4203

Prezada Colaboradora

Em nome da Editoria Científica informamos que seu manuscrito, que nos foi encaminhado devidamente reformulado de acordo com as sugestões de nossos pareceristas, registrado sob número 4203 (ex 3927) e intitulado “ **Concentração de chumbo, defeitos de esmalte e cárie em dentes decíduos** ”, foi examinado pela nossa assessoria. Verificou-se que foram atendidas as recomendações dos relatores e o manuscrito está em condições de ser publicado.

PARECERES DOS RELATORES: – Estamos anexando os pareceres dos relatores para seu conhecimento. Um dos relatores menciona a necessidade de corrigir a ref. 26. Quanto à versão para o inglês das tabelas, esclarecemos que não mais adotamos este procedimento há alguns anos. Portanto, desconsidere este pedido.

O manuscrito foi aprovado para publicação no vol. 38, n.5, 2004.

Aproveitamos a oportunidade para informá-lo que a Revista está publicando edições simultâneas dos manuscritos aprovados para a edição regular, escritos em português, na versão em inglês, exclusivamente na Internet (SciELO). Isto depende da opinião do autor sobre o interesse da divulgação do tema para o meio internacional e de sua concordância em arcar com os custos da tradução por tradutores credenciados pela Revista.

Assim, solicitamo-lhe que analise em tese esta proposta e nos informe sua conclusão. Em caso afirmativo, enviaremos nossas instruções.

Agradecendo pela sua valiosa contribuição a esta Revista, apresentamos nossas

Cordiais saudações



Profa. Dra. Maria Teresinha Dias de Andrade
Editora Executiva

Faculdade de Saúde Pública da USP - Av. Dr. Arnaldo, 715 - 01246-904 - São Paulo - SP - Brasil -
Fone/Fax: (011) 3068-0539 - E.mail: revsp@usp.br

16/04/04



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Relação entre a presença de chumbo, defeitos de esmalte e cárie em dentes decíduos", sob o protocolo nº **029/1999**, da Pesquisadora **VIVIANE ELISÂNGELA GOMES**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **Maria da Luz Rosário de Sousa**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 25 de junho de 1999

We certify that the research project with title "Relationship among lead enamel defects, dental caries in deciduous teeth", protocol nº **029/1999**, by Researcher **VIVIANE ELISÂNGELA GOMES**, responsibility by Prof. Dr. **Maria da Luz Rosário de Sousa**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Resarch at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, October 25 1999

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Antonio Bento Aves de Moraes
Prof. Dr. Antonio Bento Aves de Moraes
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP



FIG. 01 - Profilaxia



FIG. 02 - Lavagem

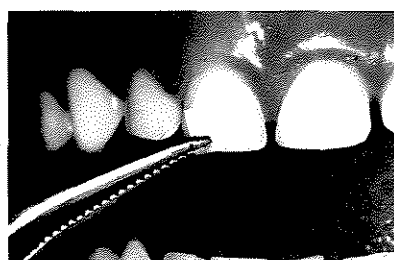


FIG. 03 - Colocação

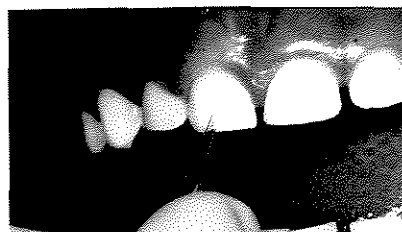


FIG. 04 - Fixação

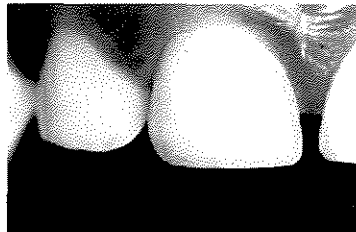


FIG. 05 - Fita posicionada



FIG. 06 - Solução ácida

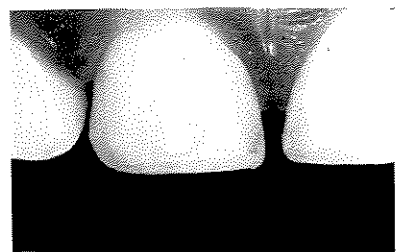


FIG. 07 - Ácido

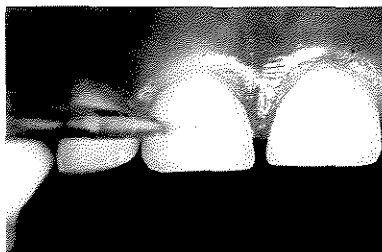


FIG. 08 - Aspiração



FIG. 09 - Água



FIG. 10 - Água

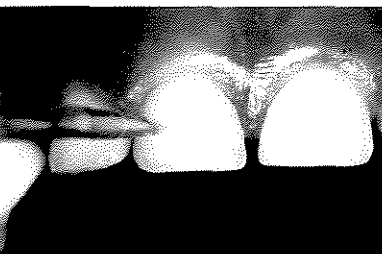


FIG. 11 - Aspiração



FIG. 12 - Remoção



FIG. 13 - Lavagem



FIG. 14 - ATF