



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o (a) aluno (a) **Karina Harumi Komada** RA **106081** esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado **“Micromorfologia Dentinária dos Dentes Verdes de Pacientes Portadores de Hiperbilirrubinemia”** no ano de **2013**.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, com requisito para aprovação na disciplina DS833 – Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, **24** de **Setembro** de **2013**.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Alan Roger da Silva".

(Nome e Assinatura do Orientador)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



KARINA HARUMI KOMADA

"MICROMORFOLOGIA DENTINÁRIA DOS DENTES VERDES DE PACIENTES
PORTADORES DE HIPERBILIRRUBINEMIA."

PIRACICABA
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



KARINA HARUMI KOMADA

MICROMORFOLOGIA DENTINÁRIA DOS DENTES VERDES DE PACIENTES
PORTADORES DE HIPERBILIRRUBINEMIA.

Trabalho de Conclusão do Curso de
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos requisitos
para conclusão do curso de Graduação
em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva

PIRACICABA, 2013

Av. Limeira, 901 Caixa Postal 52 - Piracicaba - SP CEP 13414-903
Tel.: (19) 2106-5200 - Fax: (19) 3421-0144

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Komada, Karina Harumi, 1992-

K835m Micromorfologia dentinária dos dentes verdes de
pacientes portadores de hiperbilirrubinemia / Karina
Harumi Komada. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Alan Roger dos Santos Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Bilirrubina. 2. Esmalte. 3. Dentina. 4. Infância. I.
Santos-Silva, Alan Roger, 1981- II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eduardo Takeshi Komada e Lucia Fumiko Murata Komada (*in memorian*), por terem me dado apoio e incentivo para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus tios, Milton Carlos Yassunori Ota, Sonia Regina Yumiko Murata Ota e Alberto Eiji Murata, pelo incentivo, apoio e dedicação, me ajudando em tudo que foi necessário e por estarem sempre ao meu lado.

À minha irmã, Kelly Lika Komada, e minhas primas, Érika Mie Ota e Giovana Katsuki Murata, por dividirem comigo todas as alegrias e por acreditarem em mim, me dando sempre força para vencer cada obstáculo que me foi concedido.

Aos meus avós, Kenkichi Murata e Suzue Takayama Murata, por estarem sempre de prontidão caso eu precisasse de algo e por transmitir sempre energias positivas.

Ao meu companheiro, Flávio Ken It Onji, por estar ao meu lado em todas as situações, por acreditar na minha capacidade como profissional e pelo forte carinho cultivado diariamente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

Ao meu orientador, Professor Doutor Alan Roger dos Santos Silva, pela orientação dedicada a minha formação profissional e de pesquisa, pelo incentivo, apoio e confiança ao meu trabalho nesses anos de curso. Por todo o tempo necessário para que este trabalho fosse concluído, sempre dialogando e abrindo portas para meu enriquecimento profissional.

Ao Professor Doutor Márcio Ajudarte Lopes, da área de Semiologia, pela contribuição dada para a realização desta pesquisa.

Ao Professor Doutor Fábio de Abreu Alves, Diretor do Departamento de Estomatologia da Fundação Antônio Prudente, A. C. Camargo Câncer Center, São Paulo - SP, por ter cedido, gentilmente, o material biológico para a realização desta pesquisa.

À faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, em nome do Professor Doutor Jacks Jorge Júnior.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (Processo 474697/2012-6, Edital Universal 14/2012) e bolsa PIBIC concedidos para a realização desta pesquisa.

Aos amigos que convivi em Piracicaba, pelo carinho e amizade adquiridos nesses anos, aos quais espero manter um contato frequente.

Aos meus amigos de Atibaia que durante esses anos vivendo em Piracicaba tive a satisfação de manter um contato frequente, os quais sempre estiveram dispostos a conversar e me ajudar para o que eu necessitasse. Pessoas a quem sou muito grata pela amizade e companheirismo.

Ao Biólogo Adriano Luis Martins, pelo treinamento, pela orientação sempre constante e pelo conhecimento compartilhado no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Em especial, ao aluno de doutorado da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Rodrigo Neves Silva, por me ajudar a concluir essa pesquisa, estando sempre disposto a me ajudar, tirar dúvidas quando estas existiam, pelos conselhos

dados e amizade adquirida. Trabalhamos juntamente e conseguimos concluir a pesquisa de forma satisfatória.

As demais pessoas e profissionais que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A pigmentação dental intrínseca verde pode ser causada por diversas doenças, sobretudo, doenças hepáticas da infância que geram hiperbilirrubinemia. Existe evidência clínica de hipoplasia de esmalte e da susceptibilidade aumentada à cárie em pacientes diagnosticados com hiperbilirrubinemia na infância. Esta pesquisa testou a hipótese de que a hiperbilirrubinemia é capaz de gerar alterações na microestrutura da dentina. Para isto, investigou o perfil clínico de 8 pacientes com histórico de hiperbilirrubinemia que desenvolveram pigmentação dental verde. Foi realizada uma análise macroscópica e radiográfica em 22 dentes provenientes desta amostra de pacientes. Posteriormente, a micromorfologia da dentina foi avaliada em dentes por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Realizou-se a análise da densidade média e do diâmetro médio dos túbulos dentinários por meio da MEV. A média de idade dos pacientes foi de 10 anos, sem predileção por gênero. Dentre as doenças que afetaram os pacientes da amostra, 4 (50%) foram atresia das vias biliares, 1 (12,5%) cirrose biliar primária, 1 (12,5%) hipoplasia das vias biliares intra-hepáticas, 1 (12,5%) colestase familiar e 1 (12,5%) cirrose hepática. A pigmentação verde afetou os 22 (100%) espécimes, enquanto a análise radiográfica identificou alargamento da câmara pulpar e do canal radicular em 14 (63,63%) espécimes. Foram identificadas alterações dos componentes micromorfológicos da dentina, incluindo a diminuição da densidade média dos túbulos dentinários ($p < 0,01$). Em conclusão, a hiperbilirrubina foi capaz de gerar pigmentação dental verde em dentina, alargamento da câmara pulpar/canais radiculares, alterações na micromorfologia da dentina humana e na densidade dos túbulos dentinários.

Palavras-chave: hiperbilirrubinemia, esmalte, dentina, infância.

ABSTRACT

Dental intrinsic green pigmentation can be caused by several diseases especially liver diseases of childhood, which generate hyperbilirubinemia. There is clinical evidence of enamel hypoplasia and increased susceptibility to caries in patients diagnosed with childhood hyperbilirubinemia. This research tested the hypothesis that hyperbilirubinemia is able to generate changes in the microstructure of the dentin. For this, investigated the clinical profile of 8 patients with previous history of hyperbilirubinemia who developed green dental pigmentation. Was performed a macroscopic and radiographic analysis of 22 teeth obtained from this patient's sample. Posteriorly, the micromorphology of dentin was evaluated in teeth by scanning electron microscopy (SEM). The analysis of the mean density and diameter of the dentinal tubules were analyzed by SEM. The mean age of patients was 10 years, without gender predilection. Among the diseases that affected the patients enrolled in this sample, 4 (50%) were biliary atresia, 1 (12.5%) primary biliary cirrhosis, 1 (12.5%) hypoplasia of intrahepatic biliary tract, 1 (12.5%) familial cholestasis and 1 (12.5%) liver cirrhosis. The green pigmentation affected 22 (100%) specimens whereas radiographic analysis identified 14 (63.63%) specimens with enlarged pulp chamber and root canal. Changes were identified in micromorphologic components of dentin, including the decrease in average density of the dentinal tubules ($p < 0,01$). In conclusion, hyperbilirubinemia was able to produce green tooth pigmentation in dentin, enlargement of pulp chamber/root canals, changes in the micromorphology of the human dentin and in the dentin tubules density.

Keywords: hyperbilirubinemia, enamel, dentin, childhood.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	2
3	PROPOSIÇÃO	11
4	MATERIAIS E MÉTODOS	12
5	RESULTADOS	19
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÕES	36
8	REFERÊNCIAS*	37
9	ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

A hiperbilirrubinemia é caracterizada por elevados níveis séricos de bilirrubina, um produto da degradação da hemoglobina (Sommer *et al.*, 2010). Diversas doenças da infância podem gerar hiperbilirrubinemia, fazendo com que a bilirrubina se acumule em tecidos como ossos, dentes, pele e mucosas, alterando sua cor natural para intensidades variáveis da cor verde. A pigmentação verde de dentes é considerada importante indicativo de hiperbilirrubinemia; outras manifestações bucais da hiperbilirrubinemia na infância são a hipoplasia do esmalte, maior suscetibilidade à cárie e falha do desenvolvimento dos dentes (Hartley *et al.*, 2009; Sommer *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2011). Diante disto, esta pesquisa objetivou descrever as características clínicas de um grupo de pacientes que apresentaram hiperbilirrubinemia na infância, analisar as características macroscópicas e a micromorfologia da dentina dos dentes destes pacientes que apresentaram pigmentação verde. Foram analisadas a densidade e o diâmetro dos túbulos dentinários, comparando os resultados com grupo controle. Esta amostra foi investigada para testar a hipótese da existência de alterações na micromorfologia da dentina de “dentes verdes”. A expectativa é que o conhecimento gerado por esta pesquisa possa contribuir para o tratamento odontológico de pacientes que desenvolveram “dentes verdes” em decorrência de doenças hepáticas crônicas e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida desta população. É possível que o aprimoramento do conhecimento a respeito da micromorfologia da dentina dos dentes verdes auxilie no estabelecimento de protocolos específicos para o manejo odontológico destes pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALTERAÇÕES DE COR E PIGMENTAÇÃO DENTAL

A aparência dos dentes depende das propriedades de absorção ou de reflexão de luz, sendo influenciada por todas as estruturas que compõem o dente. Qualquer alteração nestas estruturas durante a odontogênese (que geralmente ocorre dos 3 meses de vida intrauterina aos 20 anos de idade) pode causar mudança nas propriedades de transmissão de luz e, portanto, refletir em alteração da cor dentária (Watts & Addy, 2001; Sulieman, 2005).

A pigmentação dentária é a alteração da coloração natural dos dentes e, conforme a localização e origem, essa pigmentação é classificada como intrínseca ou extrínseca. Na pigmentação extrínseca, os cromógenos externos aderem-se à superfície do dente (esmalte) ou formam uma película que altera a cor do dente, enquanto que na pigmentação intrínseca os cromógenos estão aderidos às estruturas internas dos dentes, geralmente na dentina, e muitas vezes estes pigmentos são de origem endógena (Sulieman, 2005).

Várias doenças metabólicas, fatores sistêmicos, medicamentos e fatores locais são conhecidos por afetar a cor dos dentes em desenvolvimento, entre elas, a alcaptonúria, porfiria eritropoiética congênita, hiperbilirrubinemia congênita ou neonatal, amelogênese imperfeita, dentinogênese imperfeita, pigmentação por tetraciclina, fluorose, hipoplasia do esmalte, hemorragia pulpar, reabsorção radicular e o envelhecimento, entre outras (Watts & Addy, 2001).

A cor da pigmentação dental de origem intrínseca varia conforme a causa. Na alcaptonúria, por exemplo, a pigmentação é marrom e na porfiria eritropoiética congênita é vermelha/roxo-amarronzada. Enquanto que na hiperbilirrubinemia a pigmentação tem cor verde. A alteração de cor dental de origem intrínseca pode ainda ser amarela ou amarelo-amarronzada na hipoplasia do esmalte e, na dentinogênese imperfeita, é de cor âmbar; ao passo que os dentes afetados pelo uso de tetraciclina tendem a apresentar pigmentação amarela ou marrom-acinzentada. Quando existe necrose pulpar ou reabsorção radicular após trauma dental, frequentemente, a alteração de cor apresentada é rosa (Sulieman, 2005).

Durante a hiperbilirrubinemia, a bilirrubina pode ser depositada em todos os tecidos humanos e gerar pigmentação clinicamente detectável verde ou amarela na pele e na conjuntiva ocular dos pacientes acometidos, este fenômeno é conhecido como icterícia e geralmente é o primeiro sinal que leva ao diagnóstico da hiperbilirrubinemia. A bilirrubina costuma se acumular na pele e na mucosa apenas temporariamente, devido à rápida renovação celular destes tecidos moles que eliminam a pigmentação verde. Entretanto, a deposição da bilirrubina em tecidos mineralizados (principalmente nos ossos e dentes), que ocorre durante a formação dos tecidos (osteogênese e odontogênese), mantém-se incorporada à sua estrutura permanentemente (Shibata *et al.*, 1996; Sommer *et al.*, 2010, Fernandes *et al.*, 2011).

A pigmentação verde causada pela hiperbilirrubinemia é considerada rara e a maioria dos casos publicados está relacionada com a dentição decídua (Guimarães & Silva, 2003; Alto *et al.*, 2004; Guadagni *et al.*, 2005; Ten & Houwen, 2007). Porém, existe uma pequena quantidade de publicações que relatam pigmentação verde na dentição permanente e sua presença é um indicativo de hiperbilirrubinemia congênita ou neonatal (Stewart, 1967; Morisaki *et al.*, 1990; Zaia *et al.*, 1993). São necessárias investigações adicionais que esclareçam a natureza exata da pigmentação dental verde associada à hiperbilirrubinemia, pois existem trabalhos que sugerem que esta pigmentação seria oriunda do acúmulo de bilirrubina nos dentes, enquanto outros sugerem que é a biliverdina o pigmento responsável por pigmentar os dentes destes pacientes (Shibata *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1999).

2.2 HIPERBILIRRUBINEMIA E DOENÇAS HEPÁTICAS CONGÊNITAS OU NEONATAIS

A hiperbilirrubinemia é caracterizada pela elevação dos níveis séricos de bilirrubina, um produto da degradação da hemoglobina (Sommer *et al.*, 2010; Brasil, 2011).

Dentre as diversas doenças hepáticas crônicas da infância que podem gerar hiperbilirrubinemia e pigmentação verde em tecidos moles e duros da boca, destaca-se a atresia das vias biliar (AVB) que é uma doença obliterante destrutiva de ductos

biliares de recém-nascidos que afeta diferentes partes dos ductos biliares intra e extra-hepáticos. Ela é uma das principais doenças que pode estar associada com a pigmentação verde nas dentições decídua e permanente (Belanger *et al.*, 1982; Hartley *et al.*, 2009).

A hipoplasia das vias biliares intra-hepáticas (HVBIH) é uma alteração completa da anatomia dos ductos biliares intra-hepáticos, podendo causar anormalidade da secreção biliar. O diagnóstico da HVBIH deve ser sempre considerado em crianças que apresentam quadro clínico de colestase crônica (Alagille, 1985; Tommaso *et al.*, 2004). Geralmente, a HVBIH gera uma colestase crônica, pouco fibrinogênica, que mesmo depois de vários anos de evolução não é suficiente para causar cirrose ou hipertensão portal secundária. (Hadchouel *et al.*, 1978; Alagille, 1985).

As colestases familiares (CF) constituem um grupo heterogêneo de doenças crônicas que se manifestam, na grande maioria das vezes, no período neonatal e que têm características clínicas semelhantes. Fazem parte da família das CF a síndrome de Alagille, a colestase intra-hepática familiar progressiva tipos 1, 2 e 3, os erros inatos da síntese dos sais biliares, a deficiência de 3 β -hidroxi-c27-esteroide oxirredutase e a deficiência de D4-3-oxosteroide 5 β -redutase (Balistreri *et al.*, 2005; Sociedade Brasileira de hepatologia - SBH, 2010).

A cirrose biliar primária (CBP) é uma doença hepática colestática crônica de origem não definida, caracterizada por destruição inflamatória dos ductos biliares e fibrose, que pode progredir para cirrose e, subsequentemente, para insuficiência hepática (Bogdanos *et al.*, 2003; Smyk *et al.*, 2011). Essa doença possui uma origem possivelmente auto-imune com base na presença de anticorpos anti-mitocondriais (AMAs) no soro e células T auto-reativas. Agentes infecciosos têm sido propostos como agentes desencadeadores em indivíduos susceptíveis (Haydon & Neuberger, 2000; Bogdanos *et al.*, 2003; Ishibashi *et al.*, 2003).

A cirrose hepática (CH) é a etapa final de danos crônicos ao fígado que é caracterizada por fibrose hepática progressiva, perda da arquitetura hepática e formação de nódulos regenerativos, sendo relativamente incomum na faixa etária pediátrica. As causas mais comuns da cirrose hepática na infância incluem intoxicações, obstrução biliar, cirrose biliar, hepatite crônica B ou C, hemocromatose,

doença hepática gordurosa não alcoólica e erros inatos do metabolismo (Malekzadeh *et al.*, 2004; Heidelbaugh & Bruderly, 2006; Dehghani *et al.*, 2013). As complicações da cirrose hepática na infância incluem icterícia, ascite, hemorragia digestiva e encefalopatia hepática. Até o momento, o transplante de fígado continua a ser a única opção curativa para os pacientes afetados (Schuppan & Afdhal, 2008; Lefton *et al.*, 2009; Dehghani *et al.*, 2013).

2.3 MICROMORFOLOGIA DA DENTINA E DA JUNÇÃO AMELODENTINÁRIA HUMANA

O dente é uma estrutura altamente mineralizada do corpo humano que é revestido em sua superfície externa por esmalte, notoriamente reconhecido por sua estrutura acelular e resiliente, formada a partir de células epiteliais. O esmalte protege outro componente dental conhecido como dentina, que é caracterizada por ser um tecido conjuntivo denso menos mineralizado e mais resiliente que o esmalte. A dentina possui habilidades de responder a estímulos externos, aumentando sua espessura ao longo de toda vida com o objetivo de proteger a polpa dentária, um tecido conjuntivo frouxo não-mineralizado que é responsável por nutrir a dentina por meio de oxigênio oriundo de sua rica rede microvascular e proteger o dente por meio de sua inervação (Nanci, 2008). O esmalte, que é de origem ectodérmica, está em estreita união com a dentina, de origem mesodérmica, e essa união entre os dois tecidos de diferente origem é realizada pela junção amelodentinária (JAD), estrutura morfológica dental que suscita grande interesse científico no campo da odontologia decorrente de suas propriedades biomecânicas (Lin *et al.*, 1993).

A dentina, que é derivada do mesoderma, é composta por 70% de material inorgânico, 20% de material orgânico, e 10% de líquidos. Por isso, é menos mineralizada do que o esmalte e atua como uma estrutura de suporte para o esmalte (Xu *et al.*, 2009; Ruschel *et al.*, 2011). A dentina é formada pelos odontoblastos que sintetizam e secretam os elementos da matriz orgânica (Katchburian & Arana, 2010).

A dentina primária é aquela camada formada desde o início da odontogênese até o fechamento do ápice radicular, compreendendo a dentina do manto e a dentina circumpulpar. A dentina circumpulpar, por sua vez, constitui a maior parte da

espessura total da dentina. Estruturalmente, a dentina circumpulpar é constituída pela dentina peritubular e pela dentina intertubular (Katchburian & Arana, 2010).

Uma importante característica estrutural da dentina é a presença de seu padrão tubular e de um sistema de anastomose abundante. Estímulos externos podem levar à retração ou morte de odontoblastos que, por sua vez, gera túbulos dentinários vazios, sendo chamada de dentina com tratos mortos (Nanci, 2008; Ruschel *et al.*, 2011). Áreas de dentina pouco mineralizadas são encontradas na dentina de dentes decíduos e permanentes, sendo conhecidas como dentina interglobular (Hals, 1976; Katchburian & Arana, 2010; Ruschel *et al.*, 2011).

A dentina formada em torno da polpa dental em resposta a estímulos externos fisiológicos ou patológicos como cárie ou procedimentos restauradores é chamada de dentina terciária. Histologicamente, a dentina terciária pode apresentar túbulos dentinários em conexão com a dentina adjacente, túbulos dentinários irregulares e dispersos, ou até mesmo não apresentar túbulos dentinários (Klinge, 2001; Nanci, 2008; Ruschel *et al.*, 2011), funcionando como mecanismo de proteção para a polpa. Na dentina próxima à polpa existe uma camada de aspecto granular chamada de camada granulosa de Tomes (Katchburian & Arana, 2010).

A JAD é estabelecida quando o esmalte e a dentina se formam. Ela é uma interface entre esses dois tecidos. Acredita-se que a JAD desempenhe um papel importante na prevenção da propagação de fissuras de esmalte à dentina, inibindo a fratura do dente por trauma. A JAD é formada por três estruturas, as festonações que vão de 25-200 μm com suas convexidades voltadas para a dentina e as concavidades em direção ao esmalte, as microfestações que vão de 2-5 μm e são partes da festonação e as estruturas com tamanho menor do que 2 μm dentro das microfestações (Lin *et al.*, 1993; Marshall *et al.*, 2003).

Diversas doenças ou condições sistêmicas congênitas ou da infância possuem a capacidade de alterar as características micromorfológicas do esmalte, da dentina e da JAD, sobretudo aquelas condições que ocorrem simultaneamente às fases da odontogênese. Dentre elas, destacam-se o raquitismo, a hipofosfatase, a sífilis e a porfíria eritropoiética. Entretanto, pouco se conhece a respeito do impacto da hiperbilirrubinemia congênita ou neonatal sobre a micromorfologia do esmalte, da dentina e da JAD (Neville *et al.*, 2004; Katchburian & Arana, 2010).

2.4 O IMPACTO DA HIPERBILIRRUBINEMIA NOS DENTES E MUCOSA ORAL

As manifestações orais da hiperbilirrubinemia congênita ou neonatal incluem diferentes graus no atraso do desenvolvimento dental e dos ossos da face, hiperplasia gengival, maior suscetibilidade à cárie e hipoplasia de esmalte (Shibata *et al.*, 1996; Sommer *et al.*, 2010, Fernandes *et al.*, 2011).

No que diz respeito às alterações na morfologia dos dentes verdes, Belanger *et al.* (1982) avaliaram, por exame visual e radiográfico, alterações morfológicas nos dentes de 11 crianças, com média de idade de 4 anos e 4 meses que apresentavam dentes verdes e que tinham AVB. Estes autores encontraram 5 (45,4%) de 11 crianças com câmara pulpar dentária alargada, como também observaram que o desenvolvimento dentário estava atrasado em 4 (36,3%) das 11 crianças. Os mesmos autores relataram pigmentação gengival verde em 4 (36,3%) crianças e uma associação entre pigmentação gengival e pigmentação na dentição decídua. A cárie foi avaliada por meio do número de superfícies cariadas, perdidas e restauradas, estando presente em 7 (63,6%).

Lin *et al.* (2003) estudaram 34 crianças que se submeteram ao transplante de fígado, destes, 31 (91,2%) apresentavam atresia biliar congênita. A prevalência de cárie nas 34 crianças que se submeteram ao transplante de fígado foi de 61,8%, enquanto que a pigmentação verde nos dentes e gengiva foi encontrada em 19 (61,3%) crianças, sugerindo que a pigmentação verde dos dentes e gengiva parecia estar associada com hiperbilirrubinemia fetal ou neonatal como resultado de insuficiência hepática crônica.

Em pesquisa realizada por Vivas (2012), de um total de 73 pacientes com doenças hepáticas avaliadas antes de realizarem transplante hepático, 34 (46,6%) apresentaram cárie. Quanto à presença de pigmentação dental, 172 pacientes foram avaliados, sendo que 100 (58,1%) apresentaram pigmentação verde. Dos 100 pacientes com pigmentação dentária verde, 85 (85%) possuíam AVB, 6 (6%) síndrome de Alagille, 3 (3%) colestase familiar, 2 (2%) cirrose criptogênica, 1 (1%) colangite esclerosante primária, 1 (1%) cisto do colédoco, 1 (1%) colestase crônica e 1 (1%) hepatite fulminante. Em relação à presença de hipoplasia do esmalte

dentário, a alteração foi observada em 56 (34,4%) de 163 pacientes avaliados para esta condição. Dos 56 pacientes com hipoplasia do esmalte, 46 (82,14%) pacientes tinham AVB, 3 (5,35%) colestase familiar, 3 (5,35%) síndrome de Alagille, 2 (3,57%) cirrose criptogênica, 1 (1,78%) tirosinemia e 1 (1,78%) doença de Caroli. Também foi observado atraso na erupção dos dentes de 4 pacientes, porém, não foi possível precisar o número total de pacientes avaliados neste quesito. Destes 4 pacientes, 2 (50%) tiveram hepatoblastoma e foram submetidos a tratamento quimioterápico previamente ao transplante, 1 (25%) tinha AVB e 1 (25%) tinha deficiência de alfa-1-antitripsina.

Tendo em vista as evidências clínicas de alterações em esmalte e dentina induzidas pela hiperbilirrubinemia, dois estudos experimentais utilizaram modelos animais (ratos e hamsters) de obstrução do ducto biliar com o objetivo de compreender melhor quais os seus efeitos na estrutura dental. Microscopicamente, foram observados depósitos irregulares na primeira camada de esmalte, mineralização incompleta do esmalte e distúrbios na mineralização da dentina em regiões que correspondiam às linhas incrementais de crescimento da dentina, bem como linhas verdes escuras localizadas paralelamente às linhas incrementais de dentina (Hals & Nielsen, 1969; Shibata *et al.*, 1996).

Carrillo *et al.*, (2011) descreveram o caso de 1 paciente de 7 anos de idade diagnosticado com atresia biliar intrahepática congênita que apresentou hiperbilirrubinemia neonatal. No caso em questão, identificou-se textura e pigmentação normal dos tecidos moles orais, porém, os dentes decíduos (caninos superiores e inferiores e molares) apresentaram diferentes intensidades de pigmentação verde. A distribuição das áreas pigmentadas de verde correspondiam ao período em que o paciente era portador de atresia biliar intrahepática congênita e apresentava quadro clínico de hiperbilirrubinemia. Neste caso, como o diagnóstico de hiperbilirrubinemia foi precoce e a cirurgia exploratória do fígado foi realizada pouco tempo depois, observou-se que as regiões incisais e oclusais dos dentes decíduos que se desenvolveram antes do tratamento da doença hepática foram afetadas pela pigmentação verde, enquanto que as regiões dos dentes que se desenvolveram após o tratamento cirúrgico não apresentaram pigmentação verde. Foi realizada análise histológica em dois incisivos centrais superiores decíduos

preparados por desgaste depois que eles esfoliaram e notou-se pigmento verde depositado apenas na dentina, que se apresentou na forma de 3 linhas de pigmentação que se assemelhavam às linhas incrementais da dentina. Por outro lado, o esmalte não apresentou alterações morfológicas ou linhas de pigmentação.

As crianças afetadas por hiperbilirrubinemia neonatal (a despeito do tipo de doença hepática de base) apresentam grandes chances de desenvolver pigmentação dental verde permanente, fato que – por sua vez – costuma causar um estigma da doença e gerar discriminação nas crianças em idade escolar. O tratamento estético dos dentes verdes torna-se uma prioridade à medida que o paciente cresce a fim de melhorar a autoestima e colaborar com a integração social destes pacientes. Contudo, pouco se sabe a respeito das alterações morfológicas em dentina induzidas pela hiperbilirrubinemia na infância e, conseqüentemente, não se sabe qual o grau de preservação estrutural destes tecidos e tampouco qual o real impacto destas alterações na qualidade de vida de crianças afetadas por doenças hepáticas crônicas.

Até o presente momento, não existem protocolos restauradores específicos para os “dentes verdes” e várias dúvidas persistem com relação ao possível elevado risco para o desenvolvimento de cárie nesta população pediátrica. Estas evidências fomentam inúmeros mitos acerca da estrutura de esmalte e dentina dos “dentes verdes” que – para muitos profissionais – estariam negativamente afetadas pela deposição de bilirrubina, o que tornaria os “dentes verdes” quebradiços e menos resistentes ao início e progressão da cárie. Além disto, o tratamento odontológico de crianças com “dentes verdes” pode ser complicado por sangramento excessivo e incapacidade de metabolizar anestésicos de rotina decorrentes da doença hepática de base, bem como pela dificuldade em ocultar a cor verde dentária com materiais restauradores convencionais. Finalmente, os efeitos colaterais das drogas imunossupressoras destes pacientes que foram tratados por meio de transplante de fígado também podem imprimir limitações no plano de tratamento odontológico (Amaral *et al.*, 2008; Sommer *et al.*, 2010).

Em resumo, o tratamento odontológico de pacientes com histórico de hiperbilirrubinemia que desenvolveram “dentes verdes” é extremamente desafiador e

exclui os pacientes afetados do tratamento odontológico de rotina, fato que agrava substancialmente a situação clínica (já limitada por natureza) desta população.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição deste trabalho está fundamentada nos seguintes objetivos:

Objetivo geral:

Descrever as características clínicas de pacientes que apresentaram hiperbilirrubinemia e analisar as características macroscópicas e a micromorfologia da dentina dos dentes destes pacientes que sofreram pigmentação intrínseca verde.

Objetivos específicos:

- a) Estudar o perfil clínico de pacientes com hiperbilirrubinemia que desenvolveram pigmentação dental intrínseca verde por meio de uma análise retrospectiva dos prontuários destes pacientes;
- b) Caracterizar de forma macroscópica e radiográfica dentes com pigmentação intrínseca verde;
- c) Analisar as estruturas da dentina dos dentes verdes por meio da microscopia eletrônica de varredura;
- d) Analisar a densidade média e o diâmetro médio dos túbulos dentinários de dentes com pigmentação intrínseca verde e comparar com dentes controles.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A proposta desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas (CEP - FOP - UNICAMP), conforme protocolo nº 122/2011 (Anexo 01).

4.2 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS DOS PACIENTES

Para a caracterização do perfil clínico dos 08 pacientes cujos dentes foram utilizados nesta pesquisa, o Serviço de Arquivo Médico (SAME) do A. C. Camargo Câncer Center (centro médico que tratou os pacientes) foi consultado. Um formulário padronizado (Anexo 02) foi utilizado para coletar os seguintes dados: gênero, naturalidade, data de nascimento (idade), doença hepática de base, data da realização do transplante hepático, tipo de transplante, níveis séricos de bilirrubina total, direta e indireta (pré-transplante, pós-transplante e na data da última consulta), data que atingiu estes níveis (BT, BD e BI), tempo entre o nascimento e o transplante hepático, data da exodontia, dente extraído, motivo da extração dental e situação clínica.

4.3 ANÁLISE MACROSCÓPICA E RADIOGRÁFICA DOS “DENTES VERDES”

Os dentes com pigmentação intrínseca verde foram extraídos independentemente da realização desta pesquisa. Logo após as extrações, os dentes foram acondicionados em recipientes plásticos, com solução tamponada de formol a 10% e armazenados no Departamento de Estomatologia do A. C. Camargo Câncer Center. Todos os dentes foram extraídos de acordo com as necessidades odontológicas individuais apresentadas por cada paciente. Os dentes do grupo controle estavam acondicionados em recipientes plásticos como solução tamponada

de formal a 10% e foram preservados desta forma até serem preparados para serem utilizados nesta pesquisa.

Para a análise macroscópica e radiográfica foram preparados 22 dentes, dos quais 10 (45,45%) eram incisivos, 3 (13,65 %) caninos e 9 (40,9%) molares. Quanto à dentição, 21 (95,45%) dentes eram decíduos e 1 (4,55%) era permanente.

Todos os dentes foram fotografados de modo padronizado na Clínica de Estomatologia (OROCENTRO) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba para que o registro fotográfico de cada espécime pudesse ser usado como ferramenta auxiliar no momento da descrição macroscópica dos espécimes, baseando-se na metodologia aplicada por Silva *et al.* (2009). Cada dente foi identificado em ordem numérica crescente e classificado de acordo com o grupo anatômico a que pertencia. A descrição macroscópica foi realizada para identificar a extensão macroscópica da pigmentação intrínseca verde, o estado da coroa e da raiz de cada dente e a presença de cárie. Para a análise macroscópica da pigmentação verde, somente foram analisados os dentes que apresentaram os três terços completamente preservados, tanto da raiz (cervical, médio e apical), quanto da coroa (cervical, médio e incisal ou oclusal).

Todos os dentes com pigmentação verde foram radiografados de maneira padronizada na Clínica de Estomatologia (OROCENTRO) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Os dentes foram fixados com fita adesiva transparente (Brasilfitas Ind. Com. de Fitas Adesivas, São Paulo - SP - Brasil), com a face vestibular voltada para o tubo do colimador radiográfico, posicionado no lado de exposição da película radiográfica periapical para adultos (Kodak Ultra-speed, Eastman Kodak Company, Rochester - NY - USA), com a coroa voltada para o picote da película radiográfica que foi posicionada sobre uma superfície plana fixa. Foi utilizado um aparelho de raios-x (Toshiba XR 6010, 127 V, 60 KV, 10 mAs, 60 Hz), com tempo de exposição de 0,3 s e distância foco-filme de 15 cm, estabelecida com o auxílio de uma régua milimetrada. Todas as películas radiográficas foram reveladas em máquina processadora automática (Level 300, Flat CO. Ltd., Tokyo, Japan). As radiografias periapicais foram analisadas por exame visual com o auxílio de lupa.

4.4 PREPARO DOS ESPÉCIMES

4.4.1 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DENTINÁRIA POR MEIO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a análise por meio da MEV foram preparados 14 dos 22 dentes com pigmentação verde, dos quais 10 (71,4%) eram incisivos, 2 (14,3%) caninos e 2 (14,3%) molares. Quanto à dentição, 13 (92,85%) eram decíduos e 1 (7,15%) era permanente.

Quatorze dentes com pigmentação verde foram preparados para análise por meio da MEV nos laboratórios das áreas de Patologia Oral, do Departamento de Diagnóstico Oral e de Materiais Dentários, do Departamento de Odontologia Restauradora, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Um sulco de 1 mm de profundidade foi realizado em cada face dos dentes cortados, ao longo da coroa e da raiz, com o auxílio de um disco diamantado de alta concentração (Isomet® Wefering Blade, Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) em cortadeira de precisão (Isomet® 1000, Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA), com a finalidade de permitir uma fratura no eixo axial do dente. Após a realização dos sulcos, os dentes foram fraturados com o auxílio de cinzel cirúrgico e de martelo odontológico. Em seguida, as superfícies dentárias internas dos espécimes fraturados foram condicionadas com ácido fosfórico a 37% (Condac 37, FGM Produtos Odontológicos, Joinville - SC - Brasil) por 30 s em esmalte e 15 s em dentina, com posterior lavagem e secagem com água e ar, respectivamente, durando 15 s cada procedimento. Todos os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70% ao absoluto), durante 30 min em cada concentração e secados em aparelho ponto crítico (DCP-1, Denton Vacuum Inc., Moorestown - NJ - USA).

Os espécimes foram montados em discos de alumínio (*stubs*) com suas superfícies fraturadas voltadas para cima, usando uma fita adesiva dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences, Hatfield - PA - USA). Posteriormente, a superfície dos espécimes foi coberta por meio da pulverização com ouro em um aparelho metalizador (Balzers SCD 050 sputter coater, Balzers Union

Aktiengesellschaft, Furstentum Liechtenstein - FL - Germany), operando com corrente de 40 mA, por 120 s.

Todas as amostras foram examinadas no MEV (JSM - 5600 LV - Jeol Ltd., Tokyo, Japan) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, operando com uma voltagem de 15 KV e utilizando elétrons secundários.

4.4.2 ANÁLISE DA DENSIDADE E DO DIÂMETRO DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS

Para a análise da densidade média e o diâmetro médio dos túbulos dentinários dos “dentes verdes”, 16 dentes decíduos anteriores foram preparados e divididos em 2 grupos. No grupo de “dentes verdes”, 8 dentes (espécimes diferentes daqueles utilizados para análises por meio do MEV) foram selecionados, sendo 2 (25%) caninos e 6 (75%) incisivos. No grupo controle, 8 dentes decíduos hígidos de pacientes saudáveis foram usados, sendo 2 (25%) incisivos e 6 (75%) caninos. Os 16 dentes foram preparados baseando-se na metodologia aplicada por Dutra-Correa *et al.* (2007).

Os dentes decíduos hígidos, usados como dentes controle, foram doados pelo Banco de Dentes Humanos (BDH) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas (FOUFAL).

Posteriormente, os 16 dentes foram divididos em 4 subgrupos. No grupo I, 4 “dentes verdes” foram fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina exposta foi condicionada com ácido fosfórico 37% (Condac 37, FGM Produtos Odontológicos, Joinville - SC - Brasil) durante 20 s, lavadas e secadas com água e ar por 15 s, cada procedimento. No grupo II, 4 “dentes verdes” foram fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina não foi condicionada. No grupo III, 4 dentes controles foram fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina exposta foi condicionada com ácido fosfórico 37% (Condac 37, FGM Produtos Odontológicos, Joinville - SC - Brasil) durante 20 s, lavadas e secadas com água e ar por 15 s, cada procedimento. No grupo IV, 4 dentes controles foram fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina não foi condicionada.

Para realizar as fraturas, os espécimes foram fixados em uma placa de acrílico com godiva em bastão (Godiva Exata, DFL, Rio de Janeiro - RJ - Brasil) aquecida com o auxílio da chama de uma lamparina, manipulada manualmente e aplicada por meio de uma espátula odontológica metálica nº 36. Após fixação na placa de acrílico, os espécimes foram submetidos a 2 sulcos de orientação no terço cervical da coroa, com profundidade de aproximadamente 1 mm (1 na face vestibular e 1 na face lingual), com o auxílio de um disco diamantado de alta concentração (Isomet[®] wefering blade, buehler, Lake Bluff, Illinois, USA) em cortadeira de precisão (Isomet[®] 1000, Buehler, Lake Bluff, Illinois, USA), cuja finalidade era a de facilitar e orientar o plano de realização da fratura dos espécimes. Os espécimes foram fraturados com o auxílio de cinzel cirúrgico e de martelo odontológico. Em seguida, foi realizado um corte 2 mm distante da área fraturada, para obtenção do espécime, na cortadeira de precisão com disco de corte diamantado.

Todos os espécimes foram lavados com água destilada, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70% ao absoluto) durante 30 min em cada concentração e secados à temperatura ambiente por 24 h. Os espécimes foram colados em discos de alumínio (*stubs*) com suas superfícies fraturadas voltadas para cima, usando uma fita adesiva dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences, Hatfield - PA - USA). Posteriormente, os espécimes foram cobertos por meio da pulverização com ouro utilizando um aparelho metalizador (Balzers SCD 050 sputter coater, Balzers Union Aktiengesellschaft, Furstentum Liechtenstein - FL - Germany), operando com corrente de 40 mA, por 120 s. Todas as amostras foram examinadas em um MEV (JSM - 5600 LV - Jeol Ltd., Tokyo - Japan) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, operando com uma voltagem de 15 KV e utilizando elétrons secundários.

4.5 ANÁLISE DOS ESPÉCIMES

4.5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a análise de 14 dos 22 espécimes afetados pela pigmentação intrínseca verde, os espécimes foram preparados como descrito no item 4.4.1 foram avaliados em MEV (JSM - 5600 LV - Jeol Ltd., Tokyo - Japan) com voltagem de 15 KV, por meio de elétrons secundários.

Na dentina, foi analisada a presença das seguintes estruturas morfológicas: relação entre os túbulos dentinários e a JAD (aquém da JAD, no limite da JAD ou além da JAD), padrão da ramificação dos túbulos dentinários (ramificação em delta ou ramificação retilínea) e a presença de festonações e microfestações.

As imagens da MEV utilizadas neste estudo foram obtidas por meio da detecção dos elétrons secundários gerados após interação dos elétrons primários com a superfície da amostra. A captura das imagens foi realizada por um detector de elétrons no MEV e permitiu a análise descritiva e quantitativa dos espécimes.

4.5.2 DENSIDADE E DIÂMETRO DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS

Para a análise da densidade média e o diâmetro médio dos túbulos dentinários, foram utilizados os métodos descritos por Dutra-Correa *et al.* (2007).

De modo resumido, 15 fotomicrografias da superfície fraturada de cada espécime preparado como descrito no item 4.4.2 foram obtidas por meio do MEV (JSM - 5600 LV - Jeol Ltd., Tokyo - Japan) operando em voltagem de 15 KV, por meio de elétrons secundários. As fotomicrografias foram obtidas em uma ampliação de 2.500x e, posteriormente, analisadas no programa de processamento de imagens e análise ImageJ 1.45s (*National Institutes of Health - USA*) (NIH, 2012).

Para a determinação da densidade média dos túbulos dentinários, as 15 fotomicrografias de cada espécime foram realizadas aleatoriamente pela superfície fraturada. Cada fotomicrografia foi padronizada para a dimensão de 50,79 μm x 38,1 μm , resultando em uma área de 1.935,099 μm^2 (ou 0,001935099 mm^2). Todos os túbulos dentinários identificados nas 15 fotomicrografias de cada espécime foram

contados e o número total foi anotado. O número total de túbulos dentinários presentes em cada uma das fotomicrografias foi dividido pelo valor da área em milímetros quadrados ($0,001935099 \text{ mm}^2$), o que forneceu o valor da densidade de túbulos dentinários para cada espécime. A densidade média dos túbulos dentinários de cada espécime foi então obtida a partir do valor médio das 15 densidades de cada uma das 15 fotomicrografias. Todos os resultados foram processados no programa Excel®. Os valores médios da densidade de túbulos dentinários foram comparados entre os 4 subgrupos (grupo I *versus* grupo III e grupo II *versus* grupo IV).

Para a análise do diâmetro médio dos túbulos dentinários, 15 fotomicrografias da superfície fraturada de cada espécime foram obtidas com os mesmos padrões descritos para a análise da densidade média dos túbulos dentinários. Foi utilizada uma escala na forma de barra de $10 \mu\text{m}$ de cada fotomicrografia. Quinze túbulos dentinários aleatoriamente selecionados em cada fotomicrografia foram medidos nos diâmetros horizontal e vertical, totalizando, assim, 30 medições por imagem. Dessa forma, foram obtidas duas medidas a partir de cada túbulo e a média do somatório destas medidas foi considerada como o diâmetro final de cada túbulo. O diâmetro médio dos túbulos dentinários de cada espécime foi então obtido a partir do valor médio dos 15 diâmetros médios de cada uma das 15 fotomicrografias. Todos os resultados foram processados no programa Excel®. Os valores dos diâmetros médios dos túbulos dentinários foram comparados entre os 4 subgrupos (grupo I *versus* grupo III e grupo II *versus* grupo IV).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma análise estatística foi realizada para os dados referentes à investigação da densidade média dos túbulos dentinários e do diâmetro médio dos túbulos entre os espécimes afetados pela pigmentação dental verde e os espécimes do grupo controle. Para isto, foi aplicado o teste *One-way* ANOVA de natureza paramétrica. Os cálculos foram efetuados por meio do sistema SAS® e em todos os testes estatísticos aplicados foi definido o nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

A idade dos pacientes variou de 8 a 12 anos, com média de idade de 10 anos. Quanto ao gênero dos 8 pacientes, 4 (50%) eram do gênero masculino.

Os 8 pacientes eram portadores de doenças hepáticas, das quais 4 (50%) eram AVB, 1 (12,5%) CBP, 1 (12,5%) HVBIH, 1 (12,5%) CF e 1 (12,5%) CH. Essas doenças hepáticas foram as causas dos quadros de hiperbilirrubinemia destes pacientes. Todos os pacientes foram tratados por meio de transplante hepático e a idade em que o transplante hepático foi realizado variou de 1 a 6 anos.

Todos os níveis de bilirrubina obtidos antes dos pacientes terem sido submetidos ao transplante hepático apresentavam-se acima dos valores normais, porém após o transplante os níveis de 5 (62,5%) pacientes apresentaram significativo decréscimo. Os níveis de bilirrubina na última consulta do acompanhamento médico foram obtidos em 7 (87,5%) pacientes, sendo que apenas 1 (14,28%) paciente persistiu com valores elevados (Tabela 1).

A amostra dos pacientes desta pesquisa foi composta por pacientes de diferentes Estados do Brasil, sendo 1 (12,5%) paciente das Alagoas, 3 (37,5%) pacientes da Bahia, 3 (37,5%) de São Paulo e 1 (12,5%) caso não foi possível obter a origem do paciente.

O tratamento da doença de base realizado nos 8 (100%) pacientes foi o transplante hepático, sendo que 1 (12,5%) dos pacientes já tinha sido submetido à cirurgia de Kasai aos 2 meses de vida. Seis (75%) pacientes da amostra estão com a doença controlada e em acompanhamento pelas equipes médica e odontológica (Figura 1), em 1 (12,5%) caso não foi possível obter informação da situação clínica atual e 1 (12,5%) paciente foi a óbito decorrente de neoplasia maligna não associada à doença hepática de base.

Tabela 1: Valores de bilirrubina total, direta e indireta (mg/dL).

Paciente	Níveis de bilirrubina antes do transplante hepático			Níveis de bilirrubina após o transplante hepático			Níveis de bilirrubina na última consulta		
	BT	BD	BI	BT	BD	BI	BT	BD	BI
1	28,2	23	5,2	Desc	Desc	Desc	0,6	0,1	0,4
2	1º - 19,98 2º - 9,6	1º - 14,6 2º - 7,7	1º - 5,38 2º - 1,9	1º - 7,0 2º - 3,0	1º - 5,21 2º - 2,5	1º - 1,79 2º - 0,5	0,4	0,2	0,2
3	22,8	16,6	6,2	Desc	Desc	Desc	Desc	Desc	Desc
4	12,8	11,8	1	5,9	5,8	0,1	0,56	0,16	0,4
5	17,5	11,7	5,8	4,1	3,9	0,2	0,3	0,1	0,2
6	11,8	8,1	3,7	2,9	1,9	1	0,6	0,1	0,5
7	11,6	10,6	0,9	1,8	1,6	0,2	0,21	0,03	0,18
8	21,3	14,9	6,4	Desc	Desc	Desc	18,6	15	3,6

BT - Bilirrubina Total; BD - Bilirrubina Direta; BI - Bilirrubina Indireta.
Desc - Desconhecido.



Figura 1: Aspecto clínico dos dentes de paciente avaliado por este estudo. Intensa pigmentação dentária verde afetando todos os dentes. A pigmentação verde se concentrou no terço cervical das coroas dentais, esta observação sugere que a hiperbilirrubinemia teve início tardio, após a fase final de desenvolvimento da coroa dos dentes afetados. O paciente em questão apresentou discreta pigmentação verde-escurecida em gengiva marginal superior e inferior e ausência de hipoplasia de esmalte.

5.2 ANÁLISE MACROSCÓPICA E RADIOGRÁFICA DOS “DENTES VERDES”

Na análise macroscópica, todos os espécimes apresentaram pigmentação intrínseca verde e a pigmentação apresentou-se distribuída de forma variável nos três terços da raiz e da coroa dental. Os terços cervicais e médios da raiz dos 22

(100%) espécimes apresentaram pigmentação verde. Porém, no terço apical da raiz a pigmentação foi identificada em 19 (86,36%) espécimes. Na coroa dental, o terço cervical de 15 (68,18%) espécimes apresentou pigmentação verde, enquanto que 10 (45,45%) espécimes apresentaram pigmentação verde no terço médio e nenhum espécime apresentou pigmentação incisal (Figura 2). A maior parte dos espécimes, 16 (72,73 %) casos, apresentou lesões de cárie. A análise radiográfica dos 22 espécimes identificou 14 (63,63%) casos com câmara pulpar e canais radiculares alargados (Figura 3).

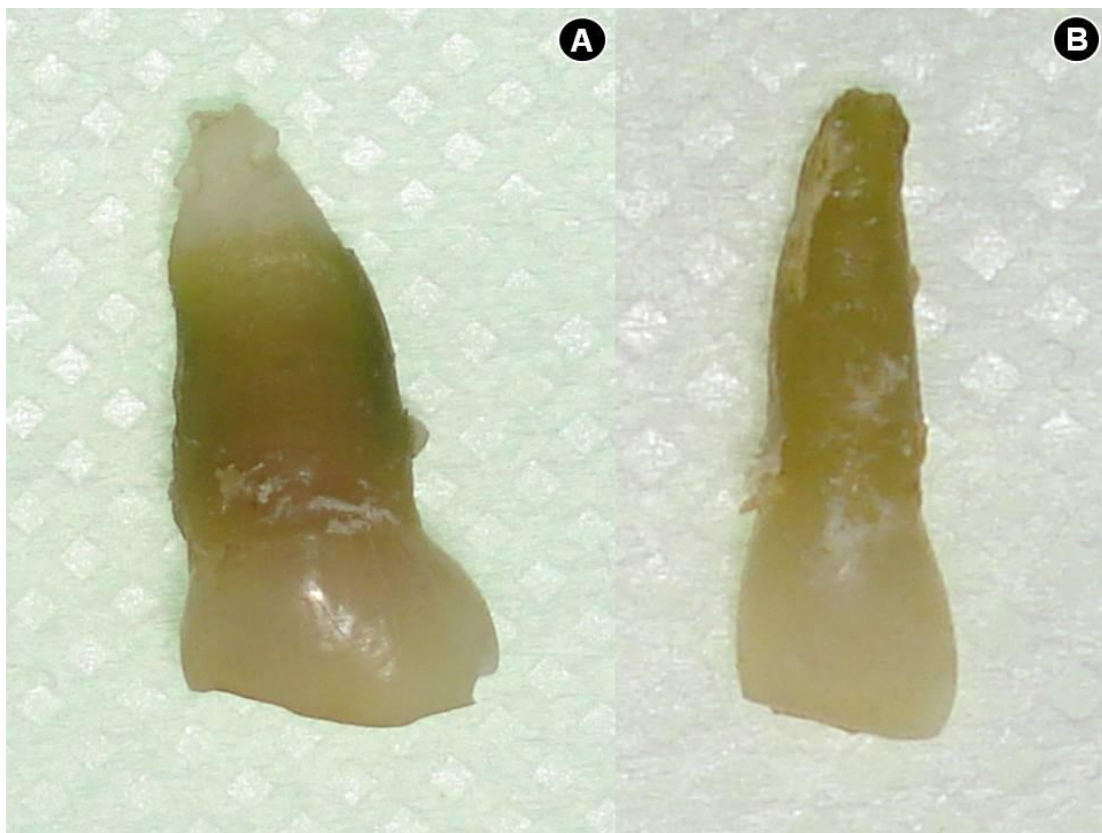


Figura 2: Análise macroscópica dos espécimes deste estudo. **A.** Incisivo livre de cárie afetado por pigmentação verde restrita aos terços cervical, médio e apical da raiz. Pigmentação verde discreta pode ser observada no terços cervical e médio da coroa, com linha branca em esmalte delimitando a extensão da pigmentação verde ao terço médio da coroa dental. **B.** Canino apresentando intensa pigmentação verde em toda a extensão da raiz e nos terços cervical e médio da coroa. O espécime apresenta extenso envolvimento de coroa dental por cárie.



Figura 3: Aspecto radiográfico dos espécimes da amostra. **A.** Incisivo decíduo apresentando alargamento da câmara pulpar e do canal radicular (forame apical com dimensões normais). **B.** Incisivo decíduo apresentando alargamento da câmara pulpar e do canal radicular.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Durante a análise das estruturas morfológicas da dentina, 14 (100%) espécimes apresentaram os túbulos dentinários aquém da JAD, 7 (50%) espécimes apresentaram túbulos dentinários no limite da JAD e 14 (100%) espécimes mostraram túbulos se estendendo além da JAD. A terminação em delta dos túbulos dentinários foi observada em 2 (14,28%) espécimes e a terminação retilínea dos túbulos dentinários foi observada em 14 (100%) espécimes (Figura 4). As festonações foram observadas em 13 (92,85%) espécimes, enquanto que as microfestonações foram observadas em 12 (85,71%) espécimes (Figura 5).

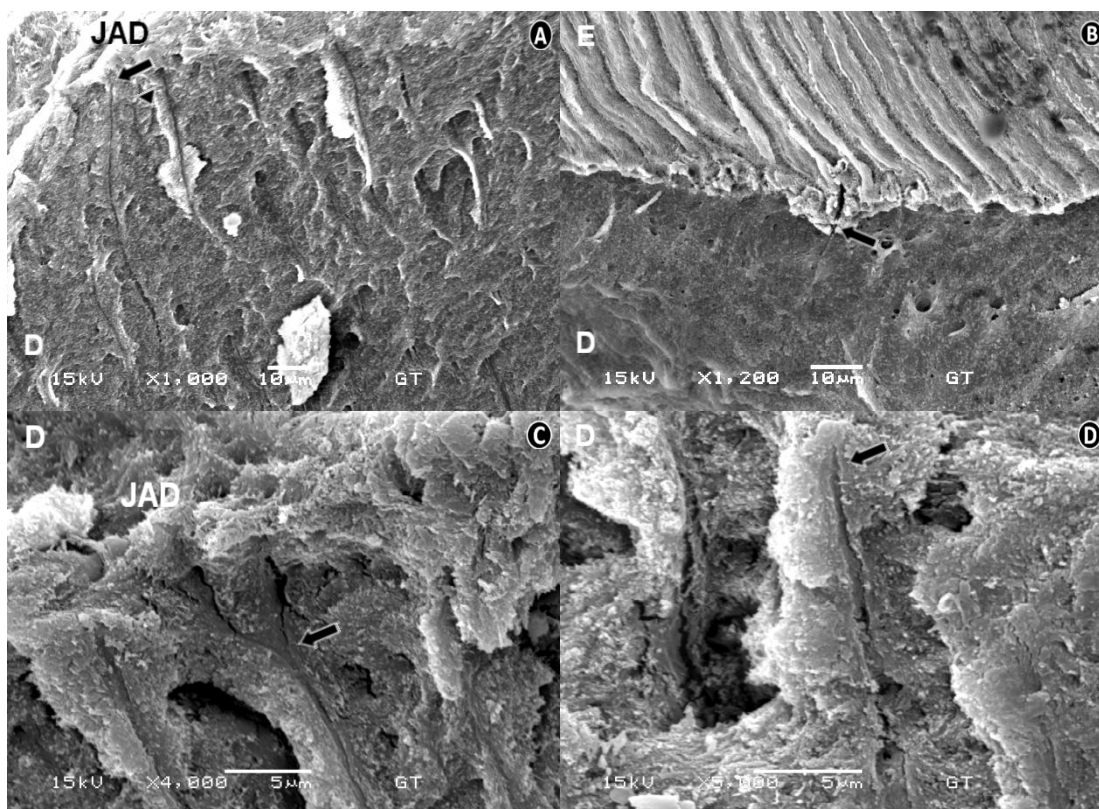


Figura 4: Análise dos componentes estruturais da dentina por meio da MEV. **A.** Túbulos dentinários aquém (cabeça de seta) e no limite (seta) da JAD (MEV, ES, 1.000x). **B.** Túbulo dentinário além da JAD (MEV, ES, 1.200x). **C.** Túbulo dentinário com ramificação em delta (seta) (MEV, ES, 4.000x). **D.** Túbulo dentinário com terminação retilínea (seta) (MEV, ES, 5.000x). D: Dentina; E: Esmalte; JAD: Junção amelodentinária; ES: Elétrons secundários.

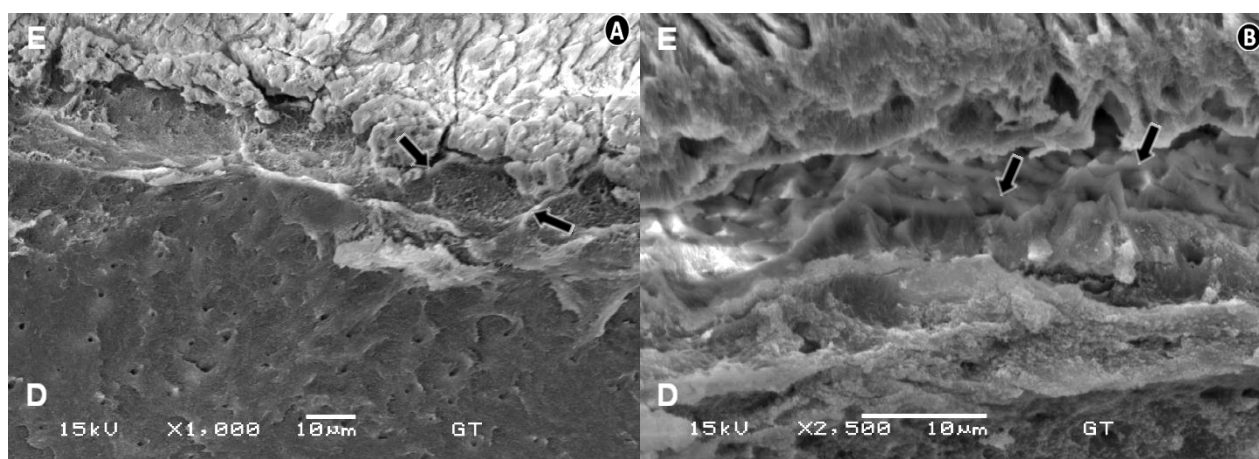


Figura 5: Análise dos componentes estruturais da dentina por meio da MEV. **A.** Festonação da JAD (MEV, ES, 1.000x). **B.** Microfestonações da JAD (MEV, ES, 2.500x). D: Dentina; JAD: Junção amelodentinária; ES: Elétrons secundários.

5.4 DENSIDADE MÉDIA E DIÂMETRO MÉDIO DOS TÚBULOS DENTINÁRIOS

Os resultados referentes à densidade média dos túbulos dentinários e do diâmetro médio dos túbulos dentinários estão apresentados nas tabelas 2 e 3, e na figura 6.

Tabela 2: Densidade média dos túbulos dentinários.

Grupo I		Grupo III	Valor de p
Espécime	Densidade mm ²	Densidade mm ²	0,0020
1	17.363,45 ± 8.005,28	40.480,27 ± 12.114,06	
2	17.397,90 ± 3.364,20	39.860,14 ± 5.991,17	
3	11.747,89 ± 3.235,80	28.146,70 ± 3.547,45	
4	14.193,93 ± 3.031,35	28.663,47 ± 4.329,54	
Média	15.175,79	34.287,65	
Grupo II		Grupo IV	Valor de p
Espécime	Densidade mm ²	Densidade mm ²	0,2674
1	20.636,32 ± 2.880,34	30.799,45 ± 8.943,88	
2	30.868,36 ± 6.062,70	20.016,20 ± 3.881,79	
3	11.989,05 ± 1.238,39	45.096,74 ± 21.824,79	
4	18.982,66 ± 7.102,97	20.877,48 ± 6.148,09	
Média	20.619,10	29.197,47	

Grupo I – “dentes verdes” fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina exposta foi condicionada com ácido fosfórico a 37%.

Grupo II – “dentes verdes” fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina não foi condicionada.

Grupo III – dentes controles fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina exposta foi condicionada com ácido fosfórico a 37%.

Grupo IV – dentes controles fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina não foi condicionada.

Tabela 3: Diâmetro médio dos túbulos dentinários.

Grupo I		Grupo III	Valor de p
Espécime	Diâmetro médio (μm)	Diâmetro médio (μm)	0,1285
1	$0,91 \pm 0,22$	$1,02 \pm 0,13$	
2	$1,16 \pm 0,09$	$1,12 \pm 0,09$	
3	$0,85 \pm 0,11$	$1,17 \pm 0,06$	
4	$0,89 \pm 0,14$	$1,05 \pm 0,16$	
Média	0,95	1,09	

Grupo II		Grupo IV	Valor de p
Espécime	Diâmetro médio (μm)	Diâmetro médio (μm)	0,6189
1	$0,78 \pm 0,08$	$0,77 \pm 0,11$	
2	$0,99 \pm 0,17$	$0,79 \pm 0,08$	
3	$0,70 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,08$	
4	$0,65 \pm 0,07$	$0,65 \pm 0,08$	
Média	0,78	0,73	

Grupo I – “dentes verdes” fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina exposta foi condicionada com ácido fosfórico a 37%.

Grupo II – “dentes verdes” fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina não foi condicionada.

Grupo III – dentes controles fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina exposta foi condicionada com ácido fosfórico a 37%.

Grupo IV – dentes controles fraturados transversalmente no terço cervical da coroa e a dentina não foi condicionada.

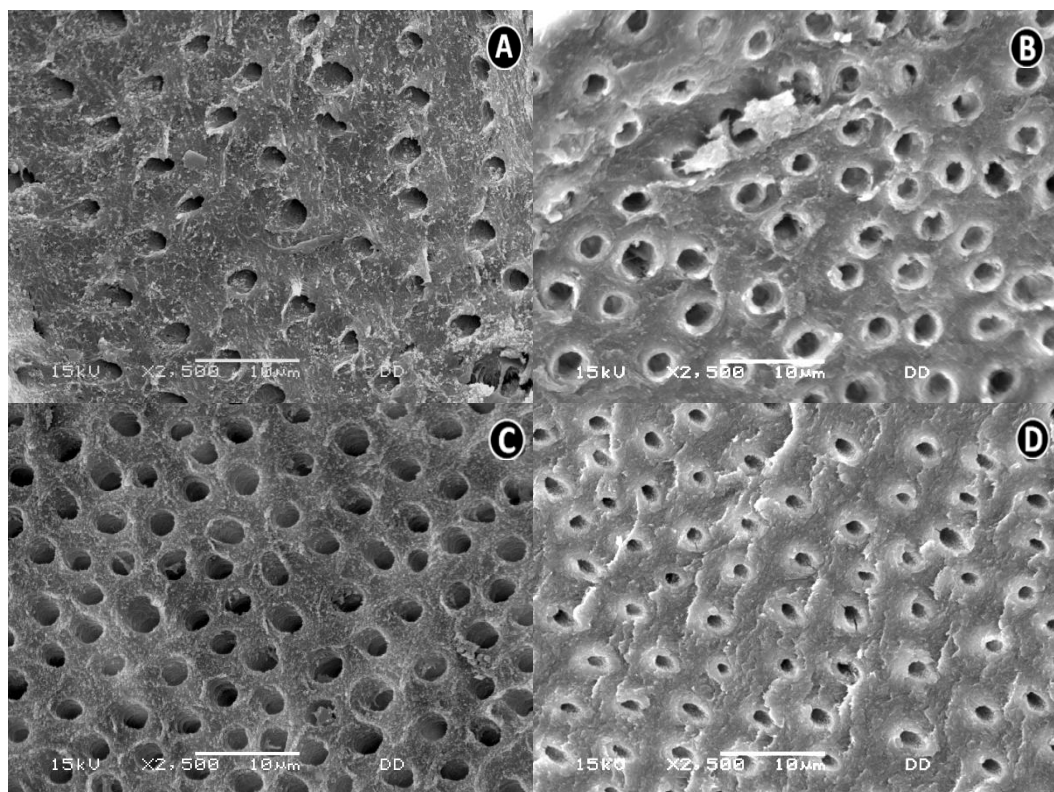


Figura 6: Análise da densidade e do diâmetro dos túbulos dentinários por meio da MEV. **A.** Túbulos dentinários do grupo I. **B.** Túbulos dentinários do grupo II. **C.** Túbulos dentinários do grupo III. **D.** Túbulos dentinários do grupo IV (MEV, ES, 2.500x). ES: Elétrons secundários.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística paramétrica do efeito da hiperbilirrubinemia sobre a densidade média dos túbulos dentinários mostrou a existência de diferenças significativas nas médias da densidade dos túbulos dentinários entre o Grupo I e o Grupo III ($p < 0,01$) (Figura 7).

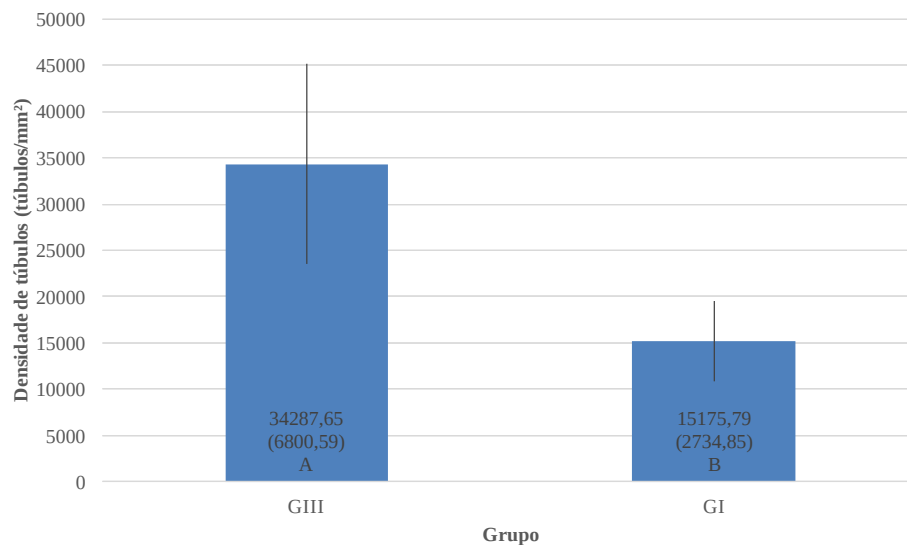


Figura 7: Média (desvio padrão) e limites do intervalo de confiança (95%) dos dados de densidade média dos túbulos dentinários (túbulos/mm²) dos Grupos I e III onde foi realizado o condicionamento. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem significativamente entre si pela análise de variância com nível de significância de 5%.

Na análise estatística do efeito da hiperbilirrubinemia sobre a densidade média dos túbulos dentinários do Grupo II e do Grupo IV, a análise paramétrica não mostrou a existência de diferenças entre as médias da densidade dos túbulos dentinários entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 8).

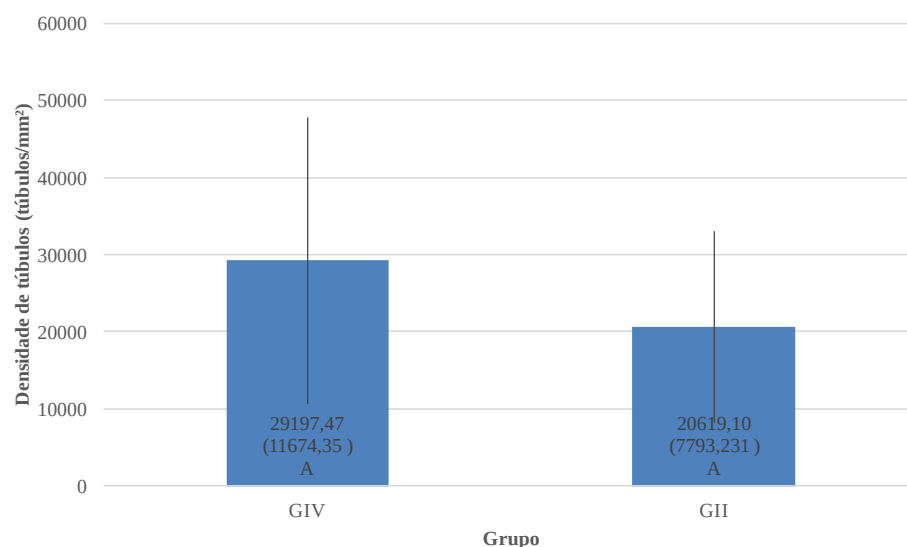


Figura 8: Média (desvio padrão) e limites do intervalo de confiança (95%) dos dados de densidade média de túbulos dentinários (túbulos/mm²) dos grupos II e IV, quando não realizado o condicionamento. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem significativamente entre si pela análise de variância com nível de significância de 5%.

Na análise estatística do efeito da hiperbilirrubinemia sobre o diâmetro médio dos túbulos dentinários do Grupo I e do Grupo III, o teste paramétrico não mostrou a existência de diferenças entre os diâmetros dos túbulos dentinários ($p>0,05$) (Figura 9).

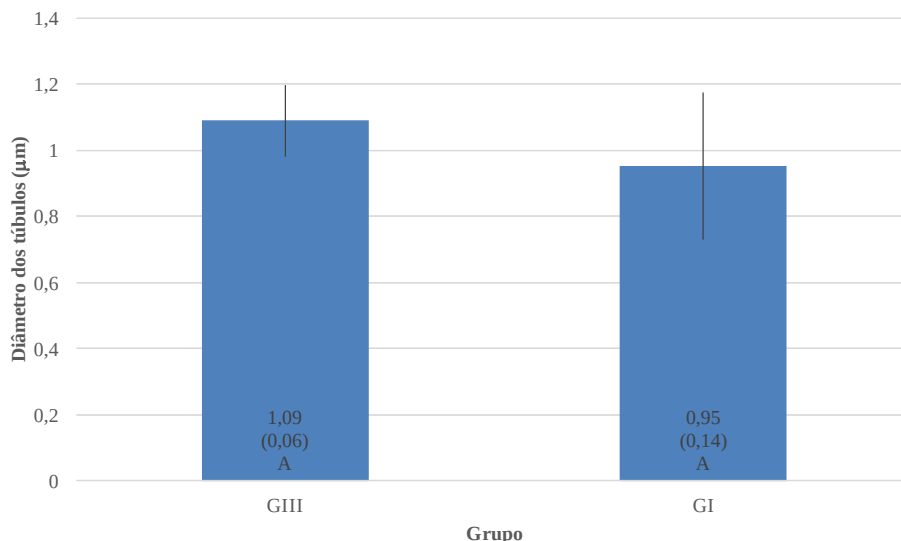


Figura 9: Média (desvio padrão) e limites do intervalo de confiança (95%) dos dados do diâmetro médio de túbulos dentinários (μm) entre o Grupo I e o Grupo III. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem significativamente entre si pela análise de variância com nível de significância de 5%.

Na análise estatística do efeito da hiperbilirrubinemia sobre o diâmetro médio dos túbulos dentinários entre o Grupo II e o Grupo IV, o teste paramétrico não mostrou a existência de diferenças entre as médias dos diâmetros dos túbulos dentinários ($p>0,05$) (Figura 10).

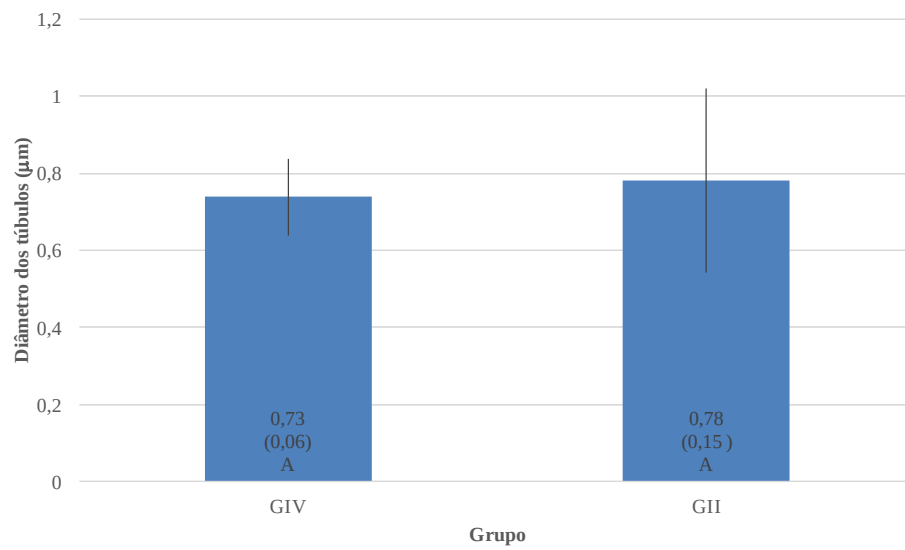


Figura 10: Média (desvio padrão) e limites do intervalo de confiança (95%) dos dados de diâmetro médio dos túbulos (μm) entre os grupos não condicionados (Grupo II e Grupo IV). Barras com letras iguais indicam médias que não diferem significativamente entre si pela análise de variância com nível de significância de 5%.

6 DISCUSSÃO

A análise das características clínicas da amostra de pacientes deste estudo identificou que diferentes doenças hepáticas geraram hiperbilirrubinemia que, por sua vez, causou pigmentação dental intrínseca de cor verde nos espécimes avaliados. Esta afirmação pode ser reforçada com base nos valores de bilirrubina elevados encontrados nos pacientes desta pesquisa.

As doenças de base diagnosticadas nos pacientes desta amostra foram AVB (50%), CBP (12,5%), HVBIH (12,5%), CF (12,5%) e CH (12,5%). De modo semelhante, um levantamento de 43 casos de pigmentação dental verde realizado por Guimarães & Silva (2003), mostrou que as causas mais comuns para pigmentação dental verde foram atribuídas a AVB (58,1%), doença hemolítica (30,2%), oclusão dos ductos biliares (2,3%), ausência de ductos biliares (2,3%), hemólise intrauterina (2,3%), HVBIH (2,3%) e colestase associada à sepse (2,3%). A AVB foi a doença hepática mais prevalente na presente amostra, representando, como já anteriormente demonstrado na literatura, uma das principais doenças associadas à pigmentação verde intrínseca nas dentições decídua e permanente (Belanger *et al.*, 1982; Seow *et al.*, 1991; Alto *et al.*, 2004; Hartley *et al.*, 2009).

De acordo com Belanger *et al.* (1982) e Guimarães & Silva (2003) as doenças hepáticas encontradas nos pacientes desta pesquisa podem ser consideradas como causas comuns de pigmentação dental intrínseca verde, com exceção da CBP que parece ainda não ter sido associada com a pigmentação dental intrínseca verde na literatura científica, sobretudo porque esta doença raramente afeta neonatais ou crianças (Dahlan *et al.*, 2003; Floreani *et al.*, 2006). Possivelmente, o paciente desta pesquisa que é portador de CBP e desenvolveu pigmentação dental verde se trata de uma excepcionalidade.

Os três tipos de bilirrubina (BT, BD e BI) sérica analisados nos pacientes deste estudo se apresentaram muito elevados antes do transplante hepático e confirmaram o quadro clínico de hiperbilirrubinemia em todos os pacientes da amostra. De acordo com Lin *et al.* (2003) os níveis séricos de bilirrubina devem ser investigados em todos os pacientes que desenvolverem dentes com pigmentação verde para um diagnóstico adequado da origem da pigmentação dental. Entretanto, esta interpretação dos resultados deve ser realizada com cautela, pois os níveis

destes três diferentes tipos de bilirrubina podem se mostrar aumentados de acordo com as diferentes doenças hepáticas de base. Neste contexto, Guimarães & Silva (2003) afirmaram que os casos de hiperbilirrubinemia associados à incompatibilidade do sistema ABO (fator Rh) geram elevação da concentração de BI no soro, enquanto os casos de hiperbilirrubinemia secundários à AVB geram aumento apenas na concentração sérica de BD. Esses dados estão parcialmente de acordo com os níveis encontrados nos pacientes desta pesquisa, pois todos os pacientes diagnosticados com AVB apresentaram níveis séricos elevados de BD, porém os níveis de BI de todos os pacientes que apresentaram AVB também apresentaram níveis elevados, diferentemente do que foi afirmado anteriormente.

Atualmente, mesmo com o avanço do conhecimento a respeito das doenças hepáticas crônicas da infância, ainda há pensamentos contraditórios acerca da prevalência da pigmentação dental verde. Um exemplo deste fato é o relato de Guimarães & Silva (2003) que mencionam que os “dentes verdes” são considerados raros. Entretanto, Naudi *et al.* (2008) afirmam que esta condição dental é comum e na realidade seria subdiagnosticada na clínica médica e ainda fazem a ressalva que com o aprimoramento do tratamento das doenças hepáticas crônicas neonatais é possível que a sobrevida dos pacientes afetados aumente e que esta complicação odontológica da hiperbilirrubinemia seja cada vez mais relevante. Embora seja difícil extrapolar esta situação clínica para a amostra avaliada nesta pesquisa, é interessante notar que pacientes com hiperbilirrubinemia secundária a diferentes doenças hepáticas da infância – e com níveis variados de bilirrubina sérica - foram capazes de desenvolver “dentes verdes”. Esta constatação pode ser interpretada como um reforço àqueles pesquisadores que acreditam que, de fato, pigmentação dental verde pode ser considerada uma complicação frequente da hiperbilirrubinemia congênita ou neonatal.

Ten & Houwen (2007) destacam que é possível que outros fatores, além da hiperbilirrubinemia, sejam capazes de influenciar e definir quais pacientes desenvolverão “dentes verdes”. Esta constatação foi realizada com base na evidência clínica que muitos pacientes, a despeito de uma hiperbilirrubinemia congênita ou neonatal grave, não desenvolvem pigmentação dental. Além disso, alguns pacientes que enfrentaram hiperbilirrubinemia leve e de curta duração podem

desenvolver “dentes verdes”. Este fato é corroborado pelos resultados de Watanabe *et al.* (1999) que demonstraram que a gravidade e a duração da icterícia não se correlacionou diretamente com as alterações dentárias. Nos pacientes da amostra em questão, pela natureza retrospectiva do estudo, não foi possível avaliar a duração exata da hiperbilirrubinemia sendo que a primeira análise sérica foi realizada após admissão dos pacientes no centro de tratamento que colaborou com este estudo.

Um fator que parece contribuir para o desenvolvimento da pigmentação dental verde é a relação entre o início e a duração da hiperbilirrubinemia com a cronologia do desenvolvimento dos dentes. Ou seja, a presença da hiperbilirrubinemia nas fases de intensa mineralização durante a odontogênese (que tem início por volta do quarto mês de vida intrauterina e fim aos 11 meses após o nascimento - calcificação dos dentes decíduos) parece ser decisiva para o desenvolvimento de “dentes verdes”. Isso pode explicar, ao menos em parte, a maior ocorrência de pigmentação dental verde por hiperbilirrubinemia em dentes decíduos (Fernandes *et al.*, 2011).

Shibata *et al.* (1996) considera que a pigmentação dental verde é reflexo da bilirrubina que se aderiu durante a odontogênese e permaneceu aderida aos tecidos duros dentários após a completa formação do dente. A diminuição da atividade metabólica dos tecidos dentários duros após a conclusão da odontogênese limitaria a capacidade de degradação do pigmento verde agregado aos componentes do dente e perpetuaria a pigmentação verde. O motivo pelo qual esta pesquisa optou por avaliar alguns critérios morfológicos dividindo em terços a raiz (cervical, médio e apical) e a coroa (cervical médio e incisal/oclusal) foi justamente a intenção de analisar o eventual impacto da hiperbilirrubinemia nas diferentes fases de formação do dente, acompanhando a odontogênese.

Carrillo *et al.* (2011) também observaram variabilidade do local do dente afetado pela pigmentação verde. Estes autores encontraram coroas de molares decíduos com pigmentação verde escura em quase dois terços da coroa, enquanto os caninos decíduos avaliados apresentavam pigmentação verde somente no terço incisal. Como o desenvolvimento dos dentes do paciente estudado por estes autores foi acompanhado desde o nascimento, foi observado que as áreas dos dentes que se desenvolveram após o período de hiperbilirrubinemia mostraram-se com cor

normal e uma linha branca divisória nítida foi observada separando a área com pigmentação verde da área normal.

Além da evidente pigmentação dental verde, esta pesquisa identificou que aproximadamente 65% das câmaras pulpares e canais radiculares da amostra eram alargados do ponto de vista radiográfico. Aparentemente, apenas um estudo prévio chamou atenção para este possível efeito da hiperbilirrubinemia na morfologia da câmara pulpar e do canal radicular e, interessantemente, a descrição original desta alteração radiográfica mostrou uma associação entre hiperbilirrubinemia, alargamento da câmara pulpar/canal radicular, retardo do crescimento geral e insucesso no tratamento cirúrgico da doença hepática (Belanger *et al.*, 1982). Infelizmente, não foi possível investigar esta relação no presente estudo.

Os túbulos dentinários e sua relação com a JAD foram avaliados e identificou-se 100% dos espécimes com túbulos dentinários aquém da JAD, 50% dos espécimes com túbulos dentinários no limite da JAD e 100% dos espécimes com túbulos dentinários além da JAD; bem como a terminação dos túbulos dentinários em delta em 14,28% e a retilínea em 100% dos espécimes. Whittaker (1978) também estudou a relação dos túbulos dentinários com a JAD e o tipo de terminação dos túbulos dentinários em dentes decíduos e permanentes humanos normais. Embora estes autores não tenham quantificado estes eventos morfológicos, foi identificada semelhança com nosso estudo pela presença de ramificações tubulares próximas da JAD com a maioria dos túbulos dentinários terminando na JAD ou imediatamente antes dela; os túbulos dentinários foram ocasionalmente identificados dentro da camada de esmalte.

As festonações foram identificadas em 92,85% e as microfestonações em 85,71% dos espécimes. A alta prevalência de festonações e de microfestonações nos “dentes verdes” é uma constatação importante, pois para Oliveira (2001) e Radlanski & Renz (2007) elas representam um fator que aumenta a aderência entre o esmalte e a dentina, ajudando a prevenir as fraturas no esmalte durante a mastigação, bem como aumentam a estabilidade da camada de esmalte sob a dentina. Whittaker (1978) e Lin *et al.* (1993) também avaliaram a interface entre o esmalte e da dentina e observaram áreas em forma de festonação semelhantes aquelas identificadas no presente estudo. A falta de pesquisas quantitativas das

estruturas morfológicas do esmalte e da dentina por meio de MEV inviabilizou uma discussão detalhada das estruturas estudadas neste trabalho.

A falta de trabalhos de pesquisa que investigaram as mesmas estruturas morfológicas desta pesquisa em dentes normais inviabilizou parte da discussão destes resultados.

A densidade dos túbulos dentinários do Grupo I apresentou média de 15.175,79 túbulos/mm², porém, no Grupo II o valor médio da densidade de túbulos dentinários foi de 20.619,10 túbulos/mm². Já a densidade média dos túbulos dentinários do Grupo III foi de 34.287,65 túbulos/mm² enquanto que o Grupo IV apresentou densidade média de 29.197,47 túbulos/mm². Portanto, a hiperbilirrubinemia foi capaz de diminuir a densidade dos túbulos dentinários nos “dentes verdes” ($p < 0,01$).

O diâmetro médio dos túbulos dentinários do Grupo I apresentou média de 0,95 μm , enquanto o diâmetro médio dos túbulos dentinários do Grupo II apresentou média de 0,78 μm . Já o diâmetro médio dos túbulos dentinários do Grupo III foi de 1,09 μm , enquanto que o Grupo IV apresentou diâmetro médio de 0,73 μm . Portanto, a hiperbilirrubinemia não gerou alterações no diâmetro médio dos túbulos dentinários dos “dentes verdes” ($p > 0,05$).

Os valores da densidade média e do diâmetro médio dos túbulos dentinários dos grupos estudados nesta pesquisa quando comparados com os valores de pesquisa realizada por Koutsi *et al.* (1994) que também mediram a densidade média dos túbulos dentinários e o diâmetro médio dos túbulos dentinários são semelhantes. Sendo que Koutsi *et al.* (1994), ao estudar a densidade tubular dentinária, encontraram na camada superficial 17.433 túbulos/mm², na externa 18.075 túbulos/mm², na intermediária 20.433 túbulos/mm² e na profunda 26.391 túbulos/mm², enquanto que os valores de diâmetro foram de 0,96 μm ; 1,08 μm ; 1,10 μm e 1,29 μm nas camadas superficial, externa, intermediária e profunda, respectivamente.

Em pesquisa já realizada por Garberoglio & Brännström (1976) para analisar a densidade dos túbulos dentinários em dentes permanentes humanos unirradiculares os valores obtidos foram semelhantes aos desta pesquisa, encontrando na dentina das proximidades da polpa um número de 45.000

túbulos/mm² e o diâmetro médio foi de 2,5 µm. Na porção intermediária da dentina, foram encontrados 29.500 túbulos/mm² e o diâmetro médio foi de 1,2 µm. Na região mais periférica da dentina, os valores correspondentes foram de 20.000 túbulos/mm² e o diâmetro tubular médio foi de 0,9 µm.

Este estudo constata a hipótese teste desta pesquisa que conjecturava que a hiperbilirrubinemia seria capaz de alterar a morfologia da dentina humana. Esta constatação se deve às alterações macroscópicas (pigmentação dental intrínseca verde) radiográficas (alargamento da câmara pulpar e do canal radicular) e micromorfológicas (diminuição da quantidade de túbulos dentinários) na dentina dos “dentes verdes”.

7 CONCLUSÕES

1. Diferentes doenças hepáticas da infância foram capazes de causar pigmentação dental intrínseca verde secundária à hiperbilirrubinemia.
2. As análises macroscópica e radiográfica identificaram pigmentação dentinária verde e alargamento das câmaras pulpaes e canais radiculares, respectivamente.
3. A hiperbilirrubinemia foi capaz de alterar a micromorfologia da dentina (diminuição da densidade média dos túbulos dentinários).

8 REFERÊNCIAS*

1. Alagille D. Management of paucity of interlobular bile ducts. J Hepatol. 1985; 1(5): 561-5.
2. Alto LAM, Pomarico L, Souza IPR, Janini MER. Green pigmentation of deciduous teeth: report of two cases. J Dent Child. 2004; 71(2): 179-82.
3. Amaral THA, Guerra CS, Bombonato-Prado KF, Silva FWGP, Queiroz AM. Tooth pigmentation caused by bilirubin: a case report and histological evaluation. Spec Care Dentist. 2008; 28(6): 254-57.
4. Belanger GK, Sanger R, Casamassimo PS, Bystrom EB. Oral and systemic findings in biliary atresia: report of 11 cases. Pediatr Dent. 1982; 4(4): 322-26.
5. Bogdanos DP, Baum H, Vergani D. Antimitochondrial and other autoantibodies. Clin Liver Dis. 2003; 7(4): 759-777.
6. Boyde A, Stewart ADG. A study of the etching of dental tissues with argon ion beams. J Ultrastruct Res. 1962; 7(1-2): 159-72.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais de saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.
8. Carrillo A, Rezende KMPC, Carrillo SR, Arana-Chavez VE, Bonecker M. Hyperbilirubinemia and intrinsic pigmentation in primary teeth: a case report and histological findings. Pediatr dev pathol. 2011; 14(2): 155-6.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do *Internacional Committee of Medical Journal Editors* – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *Medline*.

9. Dahlan Y, Smith L, Simmonds D, Jewell LD, Wanless I, Heathcote EJ *et al*. Pediatric-onset primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*. 2003; 125(5): 1476-1479.
10. Dehghani SM, Imanieh MH, Haghighat M, Malekpour A, Falizkar Z. Etiology and complications of liver cirrhosis in children: report of a single center from Southern Iran. *Middle East J Dig Dis*. 2013; 5(1): 41-6.
11. Dutra-Correa M, Anauate-Netto C, Arana-Chavez VE. Density and diameter of dentinal tubules in etched and non-etched bovine dentine examined by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(9): 850-5.
12. Fernandes KS, Magalhães M, Ortega KL. Green teeth. *J Pediatr*. 2011; 158(3): 510.
13. Floreani A, Ostuni PA, Ferrara F, Guido M. Primary biliary cirrhosis: when and why does the disease develop? *Dig Liver Dis*. 2006; 38(4): 272-5.
14. Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976; 21(6): 355-62.
15. Guadagni MG, Cocchi S, Tagariello T, Piana G. Case report: Alagille syndrome. *Minerva Stomatol*. 2005; 54(10): 593-600.
16. Guimarães LP, Silva TA. Green teeth associated with cholestasis caused by sepsis: a case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95(4): 446-51.
17. Hadchouel M, Hugon RN, Gautier M. Reduced ratio of portal tracts to paucity of intrahepatic bile ducts. *Arch Path Lab Med*. 1978; 102(8): 402.
18. Hals E, Nielsen K. Dental changes in experimental bile duct obstruction in rodents. *Arch Oral Biol*. 1969; 14(2): 151-60.
19. Hals E. Observation on giant tubules in human coronal dentin by light microscopy and microradiography. *Scand J Dent Res*. 1983; 91(1): 1-7.
20. Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet*. 2009; 374(9702): 1704-13.
21. Haydon GH, Neuberger J. PBC: an infectious disease? *Gut*. 2000; 47(4): 586-8.
22. Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part 1. diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician*. 2006; 74(5): 756-62.

23. Ishibashi H, Nakamura M, Shimoda S, Gershwin ME. T cell immunity and primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev.* 2003; 2(1): 19-24.
24. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: correlações clínicas.* Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2010.
25. Klinge RF. Further observations on tertiary dentin in human deciduous teeth. *Adv Dent Res.* 2001; 15(1): 76-9.
26. Koutsi V, Noonan RG, Horner JA, Simpson MD, Matthews WG, Pashley DH. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. *Pediatr Dent.* 1994; 16(1): 29-35.
27. Lefton HB, Rosa A, Cohen M. Diagnosis and epidemiology of cirrhosis. *Med Clin N Am.* 2009; 93(4): 787-99.
28. Lin CP, Douglas WH, Erlandsen SL. Scanning electron microscopy of type I collagen at the dentin-enamel junction of human teeth. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41(3): 381-8.
29. Lin YT, Lin YT, Chen CL. A survey of the oral status of children undergoing liver transplantation. *Chang Gung Med J.* 2003; 26(3): 184-8.
30. Malekzadeh R, Mohamadnejad M, Rakhshani N, Nasser-Moghaddam S, Merat S, Tavangar SM *et al.* Reversibility of cirrhosis in chronic hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004; 2(4): 344-7.
31. Morisaki I, Abe K, Tong LSM, Kato K, Sobue S. Dental findings of children with biliary atresia: report of seven cases. *J Dent Child.* 1990; 57(3): 220-3.
32. Nanci A. *Ten Cate Histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
33. Naudi AB, Ammari AB, Fung DE. A report of 2 cases of green pigmentation in the primary dentition associated with cholestasis caused by sepsis. *J Dent Child.* 2008; 75(1): 91-4.
34. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxillofacial.* Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2004.
35. Oliveira CA. *A análise comparativa da junção dentina-esmalte em mamíferos [Dissertação].* Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2001.

36. Radlanski RJ, Renz H. Insular dentin formation pattern in human odontogenesis in relation to the scalloped dentino-enamel junction. *Ann Anat.* 2007; 189(3): 243-50.
37. National Institutes of Health. ImageJ: image processing and analysis in java. Bethesda: NIH. [acesso 2012 Jan 19]. Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij/>.
38. Ruschel HC, Ligocki GD, Flaminghi DL, Fossati ACM. Microstructure of mineralized tissues in human primary teeth. *J Clin Pediatr Dent.* 2011; 35(3): 295-300.
39. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008; 371(9615): 838-51.
40. Seow WK, Shepherd RW, Ong TH. Oral changes associated with end-stage liver disease and liver transplantation: implications for dental management. *J Dent Child.* 1991; 58(6): 474-80.
41. Shibata T, Watanabe K, Oda H, Arisue M, Kurosawa T, Tohma M *et al.* Experimental bilirubin pigmentation of rat dentine and its detection by a qualitative analytical method. *Arch Oral Biol.* 1996; 41(5): 509-11.
42. Silva ARS. Análise morfológica e conteúdo mineral da cárie de radiação. Estudo por microscopia de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2008.
43. Silva ARS, Alves FA, Antunes A, Goes MF, Lopes MA. Patterns of demineralization and dentin reactions in radiation-related caries. *Caries Res.* 2009; 43(1): 43-9.
44. Smyk DS, Rigopoulou EI, Lleo A, Abeles RD, Mavropoulos A, Billinis C *et al.* Immunopathogenesis of primary biliary cirrhosis: an old wives' tale. *Immun Ageing.* 2011; 8(1): 1-13.
45. Sommer S, Magagnin K, Kramer PF, Tovo MF, Bervian J. Green teeth associated with neonatal hyperbilirubinemia caused by biliary atresia: review and case report. *J Clin Pediatr Dent.* 2010; 35(2): 199-202.
46. Stewart DJ. A polychromatic specimen: the result of jaundice and tetracycline. *Dent Pract Dent Rec.* 1967; 17(9): 313-4.
47. Sulieman M. An overview of tooth discoloration: extrinsic, intrinsic, and internalized stains. *Dent Update.* 2005; 32(8): 463-71.
48. Ten WETA, Houwen RHJ. Green teeth. *Arch Dis Child.* 2007; 92(3): 250.

49. Tommaso AMA, Kawasaki AS, Hessel G. Paucity of intrahepatic bile ducts in infancy-experience of a tertiary center. *Arq Gastroenterol*. 2004; 41(3): 190-2.
50. Vivas APM. Avaliação de manifestações bucais em pacientes pediátricos submetidos ao transplante hepático [Dissertação]. São Paulo: USP/FO; 2012.
51. Watanabe K, Shibata T, Kurosawa T, Morisaki I, Kinehara M, Igarashi S *et al*. Bilirubin pigmentation of human teeth caused by hyperbilirubinemia. *J Oral Pathol Med*. 1999; 28(3): 128-30.
52. Watts A, Addy M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. *Br Dent J*. 2001; 190(6): 309-16.
53. Whittaker DK. The enamel-dentine junction of human and *Macaca irus* teeth: a light and electron microscopic study. *J Anat*. 1978; 125(Pt 2): 323-35.
54. Xu C, Yao X, Walker MP, Wang Y, Wang Y. Chemical/molecular structure of the dentin-enamel junction is dependent on the intratooth location. *Calcif Tissue Int*. 2009; 84(3): 221-8.
55. Zaia AA, Graner E, de Almeida OP, Scully C. Oral changes associated with biliary atresia and liver transplantation. *J Clin Pediatr Dent*. 1993; 18(1): 39-41.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1: Certificado de aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (CEP - FOP - UNICAMP).



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

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise morfológica de dentes pigmentados por bilirrubina"**, protocolo nº 122/2011, dos pesquisadores Alan Roger dos Santos Silva, Fábio de Abreu Alves, Karina Harumi Komada, Márcio Ajudarte Lopes e Rodrigo Neves Silva, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 18/09/2013.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Morphological analysis of teeth pigmented by bilirubin"**, register number 122/2011, of Alan Roger dos Santos Silva, Fábio de Abreu Alves, Karina Harumi Komada, Márcio Ajudarte Lopes and Rodrigo Neves Silva, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 09/18/2013.



Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP



Profa. Dra. Livia Maria Andalo Tenuta
Coordenadora
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

9.2 Anexo 2: formulário para coleta de dados dos pacientes.

[illegible]