PAULO EDUARDO MIAMOTO DIAS

Estimativa de idade através das linhas incrementais de cemento

São Paulo

2010

PAULO EDUARDO MIAMOTO DIAS

Estimativa de idade através das linhas incrementais de cemento

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas

Área de Concentração: Odontologia Social

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo F. H. Melani

São Paulo

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dias PEM.Estimativa de idade através das linhas incrementais de cemento. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof. Dr._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof. Dr._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico carinhosamente este trabalho a meus pais, Dr. Paulo Antônio Esteves Dias e Cristina Maria Miamoto Dias, minha irmã, Érika Cristina Miamoto Dias, e minha namorada, Anie Diana. Meus exemplos a seguir, meus portos seguros, meus tesouros, meus amores eternos...

Às famílias mineiras Esteves Dias e Miamoto, pelo apoio incondicional. Há quanto tempo não os visito senão em meu coração? Em minha caminhada em São Paulo tive a certeza de estar bem acompanhado por vossos pensamentos positivos.

A meus amigos Thiago Leite Beaini e Silvia Virgínia Tedeschi-Oliveira, pelo incentivo e ajuda nos momentos mais difíceis desta jornada.

A meus amigos de morada Denis Eduardo Covan Trombino, Mateus Ramos de Vasconcelos Gozzi e Rafael Mauri Carvalho, pela agradável (e hilária) convivência durante este período.

Aos amigos Pedro Vinicius Bello Ferrouche Cordeiro, Fernando Teixeira Coelho Domingos, Fabrício Maurílio da Silva Fonseca, Bruno Souza Teixeira, Guilherme Ramos Costa, Leonardo Mavros Filizzola Octaviano Teixeira Murakami, Anderson Cerqueira da Silva, Alexandre Meiji Yamamoto, João Eduardo Ramos Alves, Samantha Cristine Santos Xisto Braga Cavalcanti, Maria Rachel Figueiredo Penalva Monteiro, Hugo Felipe do Vale, Alan Rodrigo Muniz Palialol e Anadélia Alves de Lima Riso.

AGRADECIMENTOS

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão de bolsa de estudos para este curso.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP),** que carinhosamente me acolheu e se transformou em extensão de meu lar.

Ao Prof. Dr. **Moacyr da Silva**, pelos sólidos ensinamentos em Odontologia Legal, transmitidos de maneira tão simples e cativante.

Ao Prof. Dr. **Rodolfo Francisco Haltenhoff Melani**, grande amigo e orientador. Agradeço profundamente a orientação segura e a oportunidade oferecida de cursar o Mestrado na FOUSP, fonte de grande amadurecimento pessoal e acadêmico. Uma mente brilhante, um eterno expoente da Odontologia Forense.

Aos docentes do Departamento de Odontologia Social da FOUSP,Prof. Dr. **Dalton Luiz de Paula Ramos**, Prof. Dr. **José Leopoldo Ferreira Antunes**, Profa. Dra. **Maria Ercília de Araújo**, Prof. Dr. **Antonio Carlos Frias**, Profa. Dra. **Maria Gabriela Haye Biazevic**, Prof. Dr. **Edgard Crosato**,Profa. Dra. **Hilda Ferreira Cardozo** *(in memorian)*, Profa. Dra. **Simone Rennó Junqueira**, e uma especial saudação a Prof. Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**, Prof. Dr. **Edgard Michel Crosato** e Prof. Dr. **Luiz Airton Saavedra de Paiva** (Disciplina de Medicina Legal da Universidade de Mogi das Cruzes), pelo pronto auxílio e sugestões metodológicas neste estudo.

Ao docente do Departamento de Estomatologia da FOUSP, Prof. Dr. **Décio dos Santos Pinto Júnior**, pelos ensinamentos em histotécnica e microscopia durante as fases preliminares do trabalho.

Ao docente do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Prof. Dr. **Victor Elias Arana-Chavez**, pelos preciosos conhecimentos transmitidos sobre biologia oral.

Ao docente do Departamento de Mineralogia e Geotectônica do Instituto de Geociências da USP, Prof. Dr. **Gergely Andres Julio Szabo**, pela disponibilização do Laboratório de Microscopia Petrográfica para o registro das imagens deste estudo.

Aos docentes Prof. Dr. **Paulo Macedo**, Profa. Dra. **Gisele R. Pestana Macedo**, Profa. Dra. **Márcia Denise Mallanconi Tubel** e Prof. Dr. **Carlos Tubel**, pelo apoio e incentivo a seguir a carreira acadêmica.

Às secretárias do Departamento de Odontologia Social da FOUSP, Sra. **Sonia Castro Lucia Lopes**, Sra. **Andréia dos Santos Teixeira** e Sra. **Maria Laura de Toledo**, pela paciência, carisma e eficiência no dia a dia da faculdade.

Aos amigos e colegas de pós-graduação Dr. **Thiago Leite Beaini** e Profa. Dra. **Silvia Virgínia Tedeschi-Oliveira**, pela ajuda na contagem e interpretação histológica.

Aos colegas Dra. **Samantha Cristine Santos Xisto Braga Cavalcanti**, Dr. **Francisco Amélio Mendes** e ao estagiário da Disciplina de Odontologia Legal, Sr. **Caio Henrique Martins Pires**, pela coleta dos dentes usados no trabalho.

Às técnicas de laboratório Sra. **Beatriz Costa** e Sra. **Elisa dos Santos,** do Departamento de Estomatologia FOUSP, pelas sugestões e esclarecimentos em histotécnica, e à Sra**. Angélica Dolores de Mello Morente** do Departamento de Mineralogia e Geotectônica IGCUSP, pela ajuda nas fotomicrografias.

Aos **funcionários do Serviço de Documentação Odontológica (SDO)** da FOUSP, pelo inestimável auxílio na formatação do trabalho.

A **todos os funcionários da Universidade de São Paulo** que prontamente me ajudaram quando necessitei. Citá-los nominalmente seria um desatino, pois correria o risco de ser traído pela memória!

"Envelhecer é passar da paixão à compaixão."

Albert Camus

RESUMO

Dias PEM. Estimativa da idade através das linhas incrementais de cemento [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

A estimativa de idade pela contagem das linhas incrementais de cemento (LC) adicionadas à idade média de erupção do dente analisado é um método tido como preciso e confiável por alguns autores, enquanto outros o rejeitam afirmando não haver forte correlação entre idade real e estimada. O objetivo do estudo foi avaliar a técnica descrita e verificar se há influência de patologias bucais na estimativa de idade, analisando-se, além do número de LC, correlação entre espessura de cemento e idade real. Foram preparadas por desgaste 31 lâminas transversais, de aproximadamente 30 µm, de 25 dentes recém extraídos. As lâminas foram observadas, fotografadas e medidas em microscopia óptica. As LC das imagens foram realçadas com uso do software Image J 1.43s e as contagens foram feitas por um observador e dois observadores-controle. Houve correlação moderada de 0.58 para toda a amostra, com erro médio de 9,7 anos. Para dentes com alterações periodontais, a correlação foi de 0.03 e erro médio de 22,6 anos. Para dentes sem alterações periodontais, a correlação foi de 0.74 e erro médio de 1,6 anos. A espessura de cemento teve correlação com idade real de 0.69 para toda amostra, 0.25 para dentes com problemas periodontais e 0.75 para dentes sem problemas periodontais. A técnica das LC associada à medição de espessura de cemento mostrou-se confiável para dentes sem patologias periodontais, porém em dentes com patologias periodontais ou histórico/quadro clínico desconhecido, recomenda-se a realização de exames macroscópicos conjuntos para comparação.

Palavras-Chave: Estimativa de idade. Linhas incrementais. Odontologia Legal. Cemento dentário. Identificação humana.

ABSTRACT

Dias PEM. Age estimation through incremental lines in cementum [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Age estimation by counting incremental lines in cementum added to the average age of tooth eruption is considered an accurate and reliable method by some authors, while others reject it stating no strong correlation between estimated and actual age. The aim of this study was to evaluate this technique and check the influence of oral conditions on age estimation by analyzing both the number of cementum lines as well as the correlation between cementum thickness and actual age, on diseased teeth. Thirty one undecalcified ground cross sections of approximately 30 µm, from 25 freshly extracted teeth were prepared, observed, photographed and measured. The images were enhanced with the use of software and the counts were made by one observer and two control-observers. There was moderate correlation ((r)=0.58) for the entire sample, with mean error of 9.7 years. For teeth with periodontal pathologies, the correlation was 0.03 with a mean error of 22.6 years. For teeth without periodontal pathologies, the correlation was 0.74 with mean error of 1.6 years. There was correlation of 0.69 between cementum thickness and actual age for the entire sample, 0.25 for teeth with periodontal problems and 0.75 for teeth without periodontal pathologies. The cementum lines technique associated with the measurement of cementum thickness was reliable for teeth without periodontal pathologies, but in periodontally diseased teeth or teeth with

unknown history/clinical background, parallel macroscopic examinations should be conducted.

Keywords: Age estimation. Incremental lines. Forensic Dentistry. Dental cementum. Human identification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Desenho mostrando a diferença das LC vistas em cortes transversais perpendiculares ao longo eixo do dente (caixa superior), e à superfície radicular (caixa inferior). Por minimizar a sobreposição tangencial de LC, os cortes do segundo tipo produzirão mais contraste entre linhas incrementais claras e escuras. D=dentina,TCA=LC (extraído de Maat et al. 2006).....52

Figura 4.2 – Plano de corte paralelo à superfície externa radicular (A), raiz em posição de corte (B), corte em andamento (C) e corte obtido (D). Notar a fina espessura e a translucidez contra a luz.....54

Figura 4.3 – O dispositivo fixador de amostras (A) é de simples manuseio. Quando a amostra se torna opaca (B), deve-se interromper o desgaste.....55

Figura 4.4 – Critérios para exclusão de imagens: presença de cemento celular (A), artefatos de técnica que inviabilizem a análise (B), ausência de LC contáveis e fratura de cemento(D).....57

Figura 4.5a – Imagem nota 1. Cemento: (c), dentina (d), junção cementodentinária (jcd) e linha de erupção (le). Indivíduo 23, idade real 28,3 anos, idade estimada 29,5 anos 58

Figura 4.5b – Imagem nota 2. Cemento: (c), dentina (d), junção cementodentinária (jcd) e camada granular de Tomes (cgt). Indivíduo 18, idade real 62 anos, idade estimada 40,5 anos 59

Figura 4.5c – Imagem nota 3. Cemento: (c), dentina (d), junção cementodentinária (jcd) e camada granular de Tomes (cgt). Indivíduo 2, idade real 77,3 anos, idade estimada 39,1 anos.....59

Figura 6.1 – Cemento secundário celular misto, com muitas LC organizadas, em luz polarizada. Fotomicrografia feita no mesmo aumento (20x) das lâminas analisadas. Notar a espessa camada de cemento e as numerosas LC que ocasionariam em estimativas de idade inadequadas.....74

Figura 6.2 – Lâmina 006 (indivíduo 20, sem relato de eventos sistêmicos; dente perdido por motivos periodontais. Idade real 54,2 anos; Idade estimada 47 anos). A visualização em microscopia polarizada (esq.) mostra

regiões claras que poderiam ser interpretadas como regiões com mudança na direção das fibras colágenas ou variação na mineralização relativa, mas que não refletem necessariamente eventos de envolvimento sistêmico. Na imagem pós aplicação do protocolo (dir.), feita no mesmo lugar, em microscopia óptica, nota-se melhor diferenciação entre as LC. As LC mais espessas também poderiam ser interpretadas erroneamente como eventos sistêmicos, em caso de indivíduo de histórico desconhecido.....75

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1 – Divisão da amostra por faixas etárias, número de indivíduos e porcentagens correspondentes.....63

Quadro 5.2 – Distribuição da amostra de acordo com grupo dentário e motivo de extração: destruição profunda causada por cárie (a), perda irreversível de inserção periodontal (b), destruição causada por cárie associada a periapicopatias (c), impactação (d) e indicação ortodôntica, com dente hígido (e). I1: incisivo central; I2: incisivo lateral; C: canino; P1: primeiro premolar; P2: segundo premolar; M1: primeiro molar; M2: segundo molar; M3: terceiro molar.....64

Quadro 5.3 – Extrações múltiplas e motivos: destruição profunda causada por cárie (a), perda irreversível de inserção periodontal (b), destruição causada por cárie associada a periapicopatias (c). Numeração dos dentes de acordo com a ISO 3950 da FDI World Dental Association.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Tabela de Marques (1977) adaptada. Idades mínimas e máximas de erupção dentária em anos. I1: incisivo central; I2: incisivo lateral; C: canino; P1: primeiro premolar; P2: segundo premolar; M1: primeiro molar; M2: segundo molar; M3: terceiro molar.....62

Tabela 5.1 – Variação intraobservador para duas contagens de cinco imagens diferentes, sendo uma delas nota 1 e as quatro restantes nota 2. O: observador; OCA: observador-controle A; OCB: observador controle B; c: coeficiente de correlação intraclasse, considerado do excelente para os valores encontrados, de acordo com Fleiss (1986).....65

Tabela 5.2 – Resultados divididos por indivíduo, lâmina analisada, imagem selecionada, nota da imagem, motivo de extração, idade real e idade estimada em anos. Motivos para extração: destruição profunda causada por cárie (a), perda irreversível de inserção periodontal (b), destruição causada por cárie associada a periapicopatias (c), impactação (d) e indicação ortodôntica, com dente hígido (e). Coeficiente de correlação de Pearson (r)= 0.59, p<0,001.....66

Tabela 5.3 – Estimativas de idade para dentes extraídos por qualquer motivo que não seja periodontal. Coeficiente de correlação de Pearson (r)= 0.74, p<0,001.....67

Tabela 5.4 – Estimativas de idade para dentes com extraídos por perda irreversível de inserção periodontal. Coeficiente de correlação de Pearson (r)= 0.06 67

Tabela 5.5 – Coeficiente de correlação de Pearson entre idade estimada e idade real, de acordo com qualidade de imagem (esq.) e idade (dir.). As imagens de nota 3 não foram incluídas na tabela devido à sua menor quantidade na amostra (n=2). *p<0,001; **p<0,05.....68

Tabela 5.6 – Estimativas de idade do observador (O) e observadores-controle (OCA e OCB), em anos.....68

Tabela 5.7 – Erro médio, em anos, e coeficiente de correlação de Pearson, em relação à média das idades reais. *p<0,001; **p<0,05.....69

Tabela 5.8 – Replicabilidade (c) entre as contagens do observador e observadores-controle, consideradas médias a boas. *p<0,001; **p= 0,01; ¤: replicabilidade considerada excelente; DEM: diferença entre idades médias estimadas, em anos.....69
Tabela 5.9 – Espessura média em µm e idade em anos, para dentes estraídos por motivos periodontais (esq.) e motivos não periodontais (dir.).....70

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CD	Cirurgião-Dentista
FDI	Federação Dentária Internacional (World Dental Federation)
INPM	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
ISO	International Standards Organization
JPG	Joint Photographic Experts Group
LC	linha(s) de cemento
ACS	American Chemistry Society
NIH	National Institutes of Health
PA	para análise

LISTA DE SÍMBOLOS

µm	micrômetro
g	gramas
l	litros
mg	miligramas
ml	mililitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
2 REVISÃO DA LITERATURA 21
2.1 CEMENTOGÊNESE E ANATOHISTOPATOLOGIA DO CEMENTO.....21
2.1.1 Alterações periodontais patológicas do cemento.....23
2.2 HISTÓRICO DO USO DAS LINHAS INCREMENTAIS DE
CEMENTO COMO FERRAMENTA PARA ESTIMATIVA DE IDADE 25
2.2.1 Aplicações em Zoologia e Zooarqueologia.....25
2.2.2 Aplicações da técnica em Odontologia Forense,
Arqueologia e Paleodemografia......30
2.3 CRONOLOGIA DE ERUPÇÃO DENTÁRIA.....47
3 PROPOSIÇÃO 48
4 MATERIAL E MÉTODOS 49
4.1 MATERIAL 49
4.2 MÉTODOS 50
4.2.1 Atendimento às normas de bioética..... 50
4.2.2 Coleta de informações sobre os sujeitos..... 51
4.2.3 Preparação histotécnica..... 51
4.2.4 Registro e classificação das imagens..... 56
4.2.5 Protocolo para análise de imagens.....60
4.2.6 Tabela de cronologia de erupção dentária.....61
5 RESULTADOS..... 63
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA 63
5.2. CONFRONTO ENTRE ESTIMATIVAS E IDADE REAL 65
5.2.1 Variação intraobservador 65
5.2.2 Estimativas de idade e idade real 65
5.2.3 Variação interobservador 68
5.3 CORRELAÇÃO ENTRE ESPESSURA DE CEMENTO E IDADE REAL 69
6 DISCUSSÃO 72
7 CONCLUSÕES 81
REFERÊNCIAS..... 82
APÊNDICES 90
ANEXOS 95

1 INTRODUÇÃO

A Identificação Humana é uma das áreas de competência do cirurgião-dentista (CD) especialista em Odontologia Legal. A unicidade da dentição humana, com atributos singulares verificados na anatomia dentária e tratamentos anteriores, confere alto grau de confiabilidade ao exame de identificação, com rápida obtenção de dados a baixos custos. Através de características do sistema estomatognático, é possível ainda, determinar o gênero, estimar a cor da pele, a estatura, a compleição física (biótipo) e a idade de um indivíduo.

Particularmente, a estimativa da idade por parâmetros odontológicos é um exame pericial auxiliar no processo de identificação humana, que contribui para a determinação da imputabilidade legal de adolescentes e jovens adultos de idade desconhecida, e estudo da estimativa de idade com finalidades social e previdenciária. Além do mais, presta auxílio nas pesquisas arqueológicas.

A formação e desenvolvimento da dentição humana apresentam estágios bem definidos, que pela sua forte correlação com idade cronológica, são utilizados com bom grau de confiabilidade na estimativa da idade de jovens indivíduos, de faixa etária entre zero a 12 anos (Nolla, 1960)

Entretanto, este exame se torna mais complexo quando é necessário estimar a idade de indivíduos adultos, com suas dentições já formadas. Gustafson (1950) propôs um método para estimativa de idade de indivíduos adultos, através da análise de alguns fatores exclusivamente dentários como: grau de atrição, aposição de dentina secundária, grau de translucidez radicular, presença e extensão de reabsorções radiculares, espessura do cemento e saúde periodontal. Até os dias atuais o método proposto por Gustafson é referência para este tipo de perícia odontolegal.

O método proposto por Gustafson e muitos outros subsequentes utilizados atualmente, baseiam-se na análise macroscópica morfológica e/ou radiográfica dos elementos dentários e suas alterações. Todavia, também há disponíveis métodos baseados em alterações microscópicas das estruturas dentárias, especificamente o cemento.

A análise histológica da quantidade e qualidade das linhas incrementais de cemento (LC) depositadas ao redor das raízes dos dentes humanos também pode

ajudar a estimar a idade de um indivíduo. Um processo fisiológico aposicional faz com que se possam observar novos pares de linhas incrementais (um claro e um escuro) na superfície externa do cemento, ao longo do tempo. As LC usadas para estimativa de idade são mais bem observadas no cemento acelular, presente nos terços cervical e médio das raízes dentárias. A contagem do número de pares de linhas incrementais claras e escuras, acrescidos à idade média em que o dente analisado erupciona, fornece uma estimativa da idade cronológica do indivíduo. Alguns autores apontam uma margem de erro significativamente baixa nesta técnica, variando entre seis meses e três anos (Kagerer; Grupe, 2001).

Já outros autores obtiveram resultados com menor correlação entre número de LC e estimativa da idade para esta técnica, ou não conseguiram observar o mesmo número de linhas incrementais ao redor do mesmo corte histológico, entre outros resultados negativos, mostrando-se muito céticos quanto à confiabilidade do método(Renz; Radlanski, 2006). De fato, a literatura expressa resultados e opiniões antagônicos acerca da técnica e sua confiabilidade.

A base biológica para a formação aposicional das LC ainda não é totalmente entendida. Um estudo em cabras (Lieberman, 1994) demonstrou que fatores como a qualidade nutricional e a dureza dos alimentos podem alterar, no cemento, a mineralização e densidade das fibras colágenas e, por conseguinte a espessura e translucidez das LC ao microscópio polarizado. Em humanos, eventos de envolvimento sistêmico como gravidez, patologias renais e traumas esqueléticos, alteram o metabolismo do cálcio e podem originar linhas incrementais hipomineralizadas espessas e datáveis (Kagerer; Grupe, 2001). Fatores indiretos, como o frio, também podem alterar o metabolismo do cálcio sistêmico, via esforço muscular de tremor, dando origem à LC hipomineralizadas, também datáveis (Cipriano, 2001).

O estudo histológico das LC pode, portanto, fornecer subsídios valiosos para a identificação humana, que extrapolam a idade cronológica e sinalizam eventos *in vivo* e sua época de ocorrência.

Embora seja uma técnica que destrói a raiz dentária, é aplicável em todos os tipos de dentes, e não há diferenças no padrão de formação anelar entre os gêneros masculino e feminino, de acordo com alguns autores(Jankauskas et al., 2001; Wittwer-Backofen et al., 2004). Patologias orais, como cáries, lesões periapicais,

problemas periodontais e alterações como a impactação/retenção também podem alterar este fenômeno aposicional, ocasionando estimativas menos precisas. De acordo com Kagerer e Grupe (2001), os resultados, nestes casos, se equivalem aos mesmos atingidos com exames qualitativos macroscópicos (ex.: estudo das sinostoses cranianas e translucidez do cemento apical).

Inicialmente utilizada por biólogos e arqueólogos, por volta dos anos 50 (Laws, 1952), a técnica foi primeiramente aplicada na estimativa da idade de diversas espécies de mamíferos, como focas, gazelas, ursos, alces, coiotes, entre outros. Animais selvagens, cativos ou esqueletizados oriundos de sítios arqueológicos puderam ter suas idades estimadas pela técnica. Em 1982, George G. Stott fez o primeiro estudo da técnica em humanos.

No Brasil, há poucas publicações sobre o tema, com destaque para os professores Eliane Marques Duarte de Sousa (UFPB) e José Bento Alves (UFMG), que chegaram a publicar um estudo em 1999 (Sousa et al.) com o professor George G. Stott, o primeiro pesquisador a aplicar a técnica em humanos, constituindo-se como a única publicação de autores brasileiros sobre o tema até abril de 2010.

Com este trabalho, espera-se avaliar a aplicabilidade e confiabilidade da técnica a indivíduos brasileiros. A técnica descrita e seu uso como recurso para os serviços nacionais de antropologia, paleodemografia e odontologia legal, figuram entre os principais norteadores deste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CEMENTOGÊNESE E ANATOHISTOFISIOPATOLOGIA DO CEMENTO

O periodonto é definido por Junqueira e Carneiro (2008) como os tecidos responsáveis por “manter o dente nos ossos maxilar e mandibular”, e que de acordo com Ten Cate (2001) “apóiam e envolvem os dentes, os quais consistem no ligamento periodontal, no osso que reveste o alvéolo e na gengiva que se encontra em contato com o dente”.

Katchburian e Arana-Chavez (2004) ressaltam que o cemento faz parte do periodonto de sustentação, e não do dente. O periodonto de sustentação é composto por: cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. Estas estruturas têm origem ectomesenquimal e dependem da formação de dentina radicular e presença da bainha epitelial de Hertwig para seu desenvolvimento. A formação simultânea da dentina radicular e do cemento, bem como a íntima relação entre elas após a formação, podem levar à interpretação que o cemento é parte do dente. As fibras colágenas que se inserem tanto no osso alveolar quanto no cemento, sendo posteriormente mineralizadas, formam as fibras de Sharpey.

Zander e Hürzeler (1958) estabeleceram a relação linear entre a idade cronológica de um indivíduo e crescimento contínuo de cemento. Analisando 233 dentes unirradiculares com saúde periodontal, os autores observaram que a espessura do cemento humano formado entre as idades de 11 a 76 anos praticamente triplicou. Esta taxa não foi a mesma para todas as áreas do dente, sendo menor perto da junção cementoesmalte e maior na área apical. Vale notar que o primeiro a notar o aumento da espessura do cemento com a idade foi Broomel, em 1898.

Recobrindo a superfície radicular, o cemento tem composição semelhante ao tecido ósseo embora não tenha vasos sanguíneos e sistemas harvesianos. É formado a partir da bainha radicular epitelial de Hertwig. Na fase de dentinogênese radicular, o colágeno depositado para a formação da superfície radicular é depositado paralelamente à lâmina basal da bainha radicular. A membrana desta

bainha se rompe em seguida e secreta proteínas semelhantes ao esmalte. Esta porção se mineraliza depois da dentina radicular propriamente dita, e de forma mais intensa. Este fenômeno forma uma camada mineralizada de cerca de 10 µm de espessura, desorganizada, denominada camada hialina. A hipótese mais aceita afirma que a função desta camada é promover a união entre cemento e dentina radicular. Assim, sobre esta superfície é depositado o cemento primário. A natureza da camada hialina é alvo de controvérsias, por suas características mistas: mineralização maior que a da dentina e do cemento, aspecto atubular como o cemento e matriz orgânica com proteínas semelhantes ao esmalte (Ten Cate, 2001). No dente já formado, a região de aspecto granuloso vista próxima à junção cementodentinária constitui a Camada Granular de Tomes.

Quando o dente está formado, irrompido e com o ligamento periodontal mais organizado, os cementoblastos secretam matriz orgânica, que é mineralizada posteriormente e agregada ao cemento. Quando os cementoblastos ficam aprisionados na própria matriz que secretam, e posteriormente no cemento mineralizado, diminuem sua atividade secretória e transformam-se em cementócitos, que caracterizarão o cemento celular (Ten Cate, 2001).

O cemento pode ser classificado de acordo com Ten Cate (2001), por 03 fatores: época da formação (primário ou secundário), presença ou ausência de células na matriz (acelular ou celular) e origem das fibras colágenas da matriz orgânica (intrínsecas, resultantes da atividade dos cementoblastos, ou extrínsecas, resultantes da incorporação de fibras do ligamento periodontal), a saber:

1. Cemento primário acelular de fibras intrínsecas
2. Cemento primário acelular de fibras extrínsecas,
3. Cemento secundário celular de fibras intrínsecas
4. Cemento secundário celular de fibras mistas
5. Cemento acelular afibrilar

O cemento acelular primário de fibras intrínsecas e extrínsecas é analisado nas perícias de estimativa de idade pelas linhas de cemento (LC) e é predominante da margem cervical até o terço apical radicular, quando predomina a ocorrência dos cementos celulares citados acima (Ten Cate, 2001).

Lieberman (1994) destaca como função primária do cemento acelular manter o dente em posição para manter uma efetiva oclusão. As camadas que constituem

as LC são depositadas por toda a vida. A microestrutura delas é influenciada em grande parte pela orientação das fibras de Sharpey, fibras colágenas extrínsecas originárias do ligamento periodontal que são mineralizadas pelos cementoblastos. As fibras extrínsecas de Sharpey se dispõem paralelamente umas às outras, e em ângulo oblíquo em relação à junção cementodentinária. Já as fibras intrínsecas dos cementoblastos se dispõem em ângulo reto com as fibras de Sharpey. Este arranjo faz com que as forças e tensões oclusais sejam dissipadas eficientemente pela superfície radicular em direção ao periodonto e osso alveolar.

2.1.1 Alterações periodontais patológicas do cemento

As alterações patológicas do cemento e sua influência na estimativa da idade ainda não são tema pacificado. O estudo destas condições pode ajudar a compreender melhor os resultados obtidos na aplicação da técnica.

O estudo de Yamamoto et al. (1966), por microrradiografias de dentes com doenças periodontais, localizou alterações progressivas na matriz orgânica do cemento, algumas delas necróticas, associada a perda gradual do arranjo espacial das fibras colágenas.

Já Selvig (1966) constatou que a maior destruição de fibras colágenas na superfície radicular de dentes com doença periodontal ocorre abaixo do epitélio juncional, a aproximadamente 18µm de profundidade no cemento. Estas e outras mudanças causaram alterações da espessura do cemento de 40 a 100 µm.

Em microscopia eletrônica de varredura, Jones (1972) notou a presença, em superfícies radiculares atingidas por doença periodontal, de cavidades provocadas por reabsorção de cemento, depressões com cálculo dental, invasão bacteriana e fibras de Sharpey. Também foi possível observar cemento normal com inserção de fibras de Sharpey.

Armitage e Christie (1973) observaram microscopicamente raízes de sete dentes com doença periodontal e constataram a presença de vacúolos no cemento, que seguiam padrões morfológicos de matriz intrínseca. A hipótese para este

achado sugere que estes vacúolos são áreas de destruição de fibras colágenas que não foram mineralizadas por completo.

Young (1973) examinou 24 raízes com doença periodontal, em microscopia de varredura, encontrando áreas com cemento ausente (devido a raspagens) e áreas com presença de fibras mineralizadas sem evidência de neoformação fibrilar.

Moreinos (1975) comparou as alterações microscópicas impostas à superfície radicular, causadas tanto por curetas periodontais quanto por pontas de aparelhos de ultrassom, ambos utilizados na terapêutica periodontal. Coletou sete dentes para cada um dos cinco grupos utilizados no estudo. Três grupos foram submetidos a quantidades de movimentos da curetas diferentes: 10, 20 e 30 movimentos. Outros dois grupos de dentes foram submetidos à terapia ultrassônica com: 10-12 e 20-22 manobras da ponta do equipamento, respectivamente. Registrou em fotomicrografias de microscopia óptica as alterações da superfície radicular sofridas por dentes que são submetidos à terapêutica periodontal, entre elas a formação de mossas e degraus, perda parcial de cemento por instrumentação e exposição de dentina subjacente por perda total de cemento.

Observações da superfície radicular de 20 dentes humanos, com doença periodontal, realizadas por Sottosanti e Garret (1975), verificaram que a espessura do cemento variava entre 10 e 20 µm.

Karadzov et al. (1981) estudaram alterações qualitativas do cemento em função do tempo e evolução de doença periodontal. Em microscopia óptica, concluíram que a espessura do cemento se apresentou irregular, de acordo com a periodicidade do processo inflamatório.

Barton e Van Swol (1987) compararam em microscopia eletrônica de varredura, dentes saudáveis e dentes com doença periodontal. Enquanto nos dentes saudáveis se observou fibras inseridas no cemento, nos dentes com patologia se observou superfície radicular com diversas convexidades e estruturas desorganizadas e aglomeradas.

Kato et al. (1992) constataram que em dentes com doença periodontal, o cemento do terço médio radicular é menos espesso que em dentes saudáveis. Já em indivíduos com mais de 60 anos, os pesquisadores observaram que o cemento da porção apical é mais espesso.

Kagerer e Grupe (2001) afirmam que quando há um processo patológico periodontal, a degeneração progressiva do periodonto torna um dente cada vez mais impróprio para análise. Há maior probabilidade de haver estimativas de idade menos precisas (subestimativas) que em dentes sem problemas periodontais, ou mesmo com presença de problemas periodontais ou periapicais, mas que possuam pelo menos uma raiz apropriada para análise.

Wittwer-Backofen et al. (2004), num estudo de validação com 363 dentes, não concluíram que problemas periodontais possam afetar as estimativas pelo método das LC.

Gokhan et al. (2004) pesquisaram as diferenças na espessura do cemento entre 23 indivíduos diabéticos tipo 2 e não diabéticos. A idade média da amostra era de 61,7 anos, e os 46 dentes extraídos eram premolares unirradiculares hígidos. Os dentes foram desmineralizados, corados com hematoxilina-eosina (HE) e examinados em microscopia óptica. A espessura do cemento foi medida em quatro locais das raízes: camada mais espessa de cemento do ápice da raiz (local 1), nível médioapical da raiz (local 2), meio da raiz (local 3) e metade médiocervical da raiz (local 4). As espessuras médias em µm, entre os diabéticos tipo 2 e os não diabéticos foram respectivamente de 175 versus 113,1 para o local 1, 159,1 versus 98,1 para o local 2, 54 versus 87,5 para o local 3 e 24,5 versus 40,2 para o local 4. Observou-se que nos locais 3 e 4, onde há predominância de cemento acelular, sua espessura média é menor que nos indivíduos não diabéticos. Já nos locais 1 e 2, predominantemente celulares, as espessuras médias dos diabéticos foram maiores.

2.2 HISTÓRICO DO USO DAS LINHAS INCREMENTAIS DE CEMENTO COMO FERRAMENTA PARA ESTIMATIVA DE IDADE

2.2.1 Aplicações em Zoologia e Zooarqueologia

Scheffer (1950) desenvolveu um método de estimativa da idade baseado na observação de cortes transversais de dentes de focas selvagens (*Callorhinus*

ursinus), especificamente em dentes caninos inferiores, região radicular. Os dentes analisados mostraram padrões em forma de linhas incrementais claras e escuras, destacadamente na dentina. O autor notou que nestes animais há mudanças sazonais nos padrões de alimentação durante as épocas de acasalamento e migração, sugerindo que este fator pode levar a alterações no processo de calcificação dentária observáveis macroscopicamente. Contando as linhas incrementais de dentina, somados á época de erupção destes dentes, estimou a idade destes animais em meses.

Laws (1952) observou padrões anelares claros e escuros na dentina de 227 dentes de elefantes marinhos (*Mirounga leonina*). O pesquisador realizou cortes transversais em caninos, que eram polidos e observados, mostrando diferenças na estrutura dentinária, correspondentes com as épocas de jejum anuais, acasalamento e migração. Observou também que animais mais jovens passam por mais períodos de jejum, que também puderam ser correlacionados e datados nos cortes dentários. Observou o autor que os caninos de elefantes marinhos erupcionam pouco tempo após o nascimento e crescem durante toda a vida do animal, fornecendo um referencial estável para a estimativa de idade até a época de obliteração da câmara pulpar por dentina secundária. Houve correlação positiva entre a massa corporal e a quantidade das LC, sugerindo que as épocas de crescimento, com maior disponibilidade de alimento, influenciavam o processo de calcificação dentário de maneira anual e cíclica. Também foi notado que a camada de cemento exibia padrões anelares, embora de análise e observação mais difíceis que os formados na dentina.

Entre os anos de 1959 e 1980, várias espécies de mamíferos foram estudadas utilizando-se a ocorrência das linhas incrementais de dentina ou cemento como critério para estimativa da idade: alce(Sergeant; Pimlott, 1959; Gasaway et al., 1978), caribu (McEwan, 1963), bisão (Novakowski, 1965) urso negro (Free; Sauer, 1966; Marks; Erickson, 1966; Sauer et al., 1966; Stoneberg; Jonkel, 1966), veado (Ransom, 1966; Douglas, 1970; Lockard, 1972), coiote (Linhart; Knowlton, 1967), 21 espécies de mamíferos aquáticos (Klevezal; Kleinenberg, 1967), raposa (Monson et al., 1973), lontra (Tabor; Wright, 1977), macacos japoneses (Wada et al., 1978), esquilo (Fogl; Mosby, 1978) marmota (Stott et al., 1980.) e macacos *rhesus* (Kay et

al., 1984). Todos estes estudos encontraram correlação entre número de linhas incrementais detectadas e idade do animal.

Lieberman et al. (1990) apontaram em seu estudo que o tipo de microscopia e a técnica de preparo histológico podem fazer com que um mesmo anel de cemento se apresente ora claro, ora escuro à observação. Identificaram quatro grandes problemas que interferem na capacidade do pesquisador de identificar e interpretar as estruturas aposicionais do cemento, principalmente do ponto de vista arqueológico: mecanismos desconhecidos que alteram a formação e composição do cemento; seleção, manuseio e preparo das amostras; estado de conservação das amostras; subjetividade do pesquisador na interpretação das amostras. Visando diminuir o problema da subjetividade do observador nas análises, os autores prepararam 20 dentes de 15 gazelas de data de morte conhecida e outros três dentes oriundos de sítios arqueológicos. Foram feitos cortes longitudinais de aproximadamente 100 µm, que foram fotografados sob microscopia polarizada nas regiões com melhor visualização. Foi utilizado o programa para análise de imagem de domínio público Image 0.92, criado por Wayne Rasband, do *National Institutes of Health*, dos Estados Unidos (NIH-USA). O software permitiu realçar as imagens usando diferentes ferramentas que registram os valores relativos de luminância dos pixels de uma imagem, numa região pré determinada, traduzindo-os em gráficos (perfis de luminância). Entre as ferramentas usadas e avaliadas estão o aumento de contraste (*contrast enhancement*), redução de ruído (*noise reduction*), sombreamento (*shadowing*), pseudocoloração, aumento de nitidez (*sharpening*) e suavização (*smoothing*). Como há variações entre os cortes obtidos, não foi determinado pelos autores um protocolo específico de uso do software, devendo o mesmo sempre ser usado para realçar as linhas incrementais presentes nas imagens. Além disso, os pesquisadores tomaram o cuidado de sempre se certificarem que a Camada Granular de Tomes presente nas imagens estivesse escura, para evitar inversões de cor prejudiciais à contagem e interpretação. Concluiu-se que o realce de imagens por software apresenta vantagens, com os perfis de luminância possibilitando aos pesquisadores quantificar diferenças entre linhas incrementais de uma imagem e entre diferentes espécies, além de favorecer um meio conveniente de armazenamento de imagens.

Lieberman (1994) elenca dois fatores primários para a formação das linhas incrementais de cemento em animais: variação na mineralização relativa das fibras colágenas e variação na orientação das mesmas. Como fatores secundários, elenca aqueles que variam anualmente e assim agem indiretamente nos fatores primários de formação de LC: nutrição (disponibilidade de alimentos de acordo com a estação), forças biomecânicas (esforços oclusais de acordo com tipo de alimentos consumidos em maior quantidade) e ciclos hormonais. O autor analisou a influência da alimentação nas LC de cabras. Numa população de seis cabras (*Capra hircus*), dividiu os animais em três grupos. O grupo controle foi alimentado durante um ano com alimentos de consistência dura e padrão nutricional adequado. O segundo grupo (grupo da dureza alimentar) foi alimentado com os mesmos alimentos do grupo controle durante todo o ano, exceto entre os meses cinco a oito, quando foi fornecido alimento triturado e amaciado. Já o terceiro grupo (grupo do valor nutricional) foi alimentado durante todo o ano com alimentos de valor nutricional e consistência igual aos do grupo controle, exceto pelo período do mês cinco ao mês oito, quando foi fornecido alimento de menor qualidade nutricional. Os tecidos formados no período foram marcados com corante fluorocromo (oxitetraciclina, calceína e alizarina), administrados via injeção subperitoneal. Os primeiros molares das cabras, únicos dentes em oclusão durante o estudo, foram extraídos e suas raízes fraturadas para observação em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia polarizada. À microscopia polarizada, constatou-se que o grupo controle originou, no período dos meses cinco a oito, LC translúcidas. Já o grupo da dureza alimentar teve formação de uma linha opaca. No grupo do valor nutricional houve a formação de uma linha opaca de espessura menor que no último grupo. As análises em MEV e microrradiografias demonstraram que o anel formado no grupo da dureza foi causado por variações na orientação das fibras colágenas e que aquele formado no grupo do valor alimentar foi ocasionado por variação na mineralização relativa do cemento. Concluiu-se que o esforço oclusal derivado de diferentes consistências alimentares e fatores nutricionais influenciam a formação de LC, via variação na orientação de fibras colágenas do cemento e variação na mineralização relativa do cemento.

Cipriano (2001) estudou o cemento acelular de espécies de grande símios, buscando averiguar se há diferenças histológicas entre primatas selvagens de clima

tropical e primatas cativos mantidos em regiões de clima temperado. Os dentes de animais selvagens foram obtidos de coleções museológicas, de animais abatidos em seus habitats naturais, com registros de origem geográfica, ano de “coleção”, gênero e idade ao morrer conhecidos. No caso dos animais cativos, as idades dentárias no momento de suas chegadas aos zoológicos, adicionada aos anos em que lá viveram até morrerem, aliadas às informações sobre eventos em vida fornecidos pelos próprios zoológicos, serviram como controle para os dentes coletados destes animais. Foram preparadas quatro secções mineralizadas transversais de 70 µm de espessura por cada dente, limpas em banhos ultrassônicos de 30 min, desidratadas em álcool e montadas em lâminas. As lâminas foram observadas em microscopia de contraste de fase, fotografadas em diversas regiões e as contagens foram feitas pelo menos por cinco vezes por observador, sem os mesmos terem acessos aos dados dos indivíduos que estavam sendo analisados. A maior parte das lâminas preparadas revelou imagens satisfatórias das linhas incrementais de cemento destes animais. Os animais selvagens apresentaram linhas incrementais claras e escuras bem diferenciadas e com espessuras regulares, ao passo que os animais cativos mostraram irregularidades na diferenciação e espessura das linhas incrementais. Quatro dos cinco animais cativos tiveram suas idades estimadas com bastante precisão, enquanto o quinto indivíduo apresentava pobre conservação do cemento. Dos animais selvagens, quatro dos onze tiveram suas idades superestimadas. Algumas diferenças na imprecisão das estimativas de idade dos animais selvagens podem ser explicadas por diferenças no modo de vida destes seres nos habitats naturais (disponibilidade de alimentos, menor tendência a aumentar massa corporal) em relação aos animais cativos, com acesso mais regular a alimentos com as mesmas características nutricionais e menor exposição a intempéries. Um dado marcante presente em quatro dos cinco animais cativos foi um anel claro que pôde ser precisamente datado como sendo formado no ano de 1963, ano de inverno rigoroso no hemisfério norte. Estes resultados sugeriram que no frio, o metabolismo do cálcio se altera, já que este mineral sofre reduções em seu nível sérico devido ao processo de contração muscular dos tremores, dando origem a linhas incrementais de cemento hipomineralizados.

Nakanishi et al. (2009) realizaram um estudo de estimativa de idade de gatos selvagens japoneses de Iriomote (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*), usando as

LC. Levando em conta os fatores sazonais do meio ambiente (clima, disponibilidade de alimento, entre outros), determinaram que as LC que ficam mais escuras no processamento histológico aparecem entre fevereiro e setembro, entre os animais machos. As cronologias de erupção de dentes permanentes e de fechamento de ápices dentários levaram os autores a concluir que a primeira LC escura aparece entre o segundo inverno e a terceira primavera de vida nestes animais. Presumindo que estes animais nascem em abril, basta adicionar um ao número de LC observadas em cortes de caninos para que uma adequada estimativa de idade seja feita, observam os pesquisadores. Este fato foi confirmado por exames em animais de idade conhecida, levando à conclusão que a técnica das LC aplicada a estes felinos constitui um meio confiável de estimativa de idade.

2.2.2 Aplicações da técnica em Odontologia Forense, Arqueologia e Paleodemografia

Gustafson (1950) foi o primeiro a relatar o uso da largura da camada de cemento em humanos para estimativa da idade, num método que também avaliava fatores como atrição dentária, deposição de dentina secundária, translucidez e reabsorção radicular e grau de saúde periodontal.

Stott et al. (1982) fizeram o primeiro estudo dos linhas incrementais de cemento em humanos. Dentes oriundos de três cadáveres de idade conhecida foram cortados transversalmente a aproximadamente 100-150 µm. Notaram que as LC humanas mais visíveis se localizavam não somente nas faces radiculares linguais ou vestibulares, mas também se estendiam para as faces proximais. Preferiram cortes transversais aos longitudinais, pois os últimos não mostravam boa diferenciação entre as LC. Apontaram que séries de cortes transversais não somente informariam mudanças no cemento ao longo da raiz (como nos cortes longitudinais), mas também uma avaliação do perímetro total da raiz em determinado nível de corte. Mais de um dente do mesmo cadáver foi seccionado em diversos pontos da raiz a partir de dois milímetros do ápice, e os cortes mineralizados foram corados com vermelho alizarina. As lâminas obtidas foram fotografadas em preto e branco e as

linhas incrementais escuras foram contadas em fotografias ampliadas. Observaram a dificuldade de se obter LC diferenciadas em regiões de furca e que, comparados com outros animais, as LC de humanos eram muito mais numerosas e próximas entre si. Os resultados apontaram uma estimativa de idade precisa nos três indivíduos estudados. Ao contrário do que se acreditava, este trabalho mostrou a presença das linhas incrementais de cemento em humanos e a viabilidade do método em espécies de mamíferos que não hibernam ou migram sazonalmente.

Naylor et al. (1985) apontaram que as LC de humanos são menos diferenciados que em animais com grandes mudanças alimentares sazonais (ex.: focas e ursos). Visando uma melhor diferenciação das linhas incrementais humanos, apresentaram uma técnica com boa repetibilidade para evidenciá-los. Fizeram cortes radiculares transversais de 100 µm, limparam os mesmos com álcool 70% e banho ultrassônico por 30 s. Coraram as peças com cresil violeta e montaram lâminas microscópicas, que foram fotografadas em microscopia de Nomarski. A contagem das linhas incrementais foi feita em fotografias ampliadas. Notaram que as LC eram mais bem visualizadas em áreas mesiovestibulares e distolinguais de cortes transversais, ao invés de longitudinais. Os autores concluíram que séries de cortes transversais possibilitam uma série de observações em diferentes níveis ao longo da raiz, em regiões que nem sempre são observáveis em cortes longitudinais.

Charles et al. (1986) avaliaram uma amostra de 42 pares de caninos e primeiros premolares inferiores de idade conhecida para testar a confiabilidade, erro do observador e variabilidade na contagem dos linhas incrementais entre dentes do mesmo indivíduo. Compararam ainda duas técnicas de preparo histológico: secções transversais mineralizadas de 80 µm coradas com vermelho alizarina versus secções longitudinais desmineralizadas de 7 µm e coradas com hematoxilina. Foram feitos dois slides fotográficos para cada dente, das áreas de cemento acelular que mostravam a mais clara distinção entre linhas incrementais escuras e claras à microscopia óptica. Os slides foram projetados em 22 x 28 cm e as contagens foram feitas. Dois observadores fizeram diversas contagens de cada slide até que se chegasse a um resultado consistente, que foi registrado como o escore daquele slide para aquela contagem. Duas observações independentes foram feitas pelos dois observadores, com as lâminas aleatoriamente distribuídas. Somente os dentes em que os dois observadores fizeram as duas contagens independentes de cada

slide foram analisados. Dentes com definição pobre ou inconsistente das linhas incrementais foram descartados. Preferiram o uso de secções desmineralizadas, que de acordo com os autores, parecem ter mais repetibilidade nas contagens. Registraram nesta técnica erro interobservador e intraobservador bem menores do que nas contagens das lâminas mineralizadas. Diferentes modelos de número de lâminas, número de observadores e número de contagens foram propostos, e o aumento de eficiência em relação ao modelo de uma lâmina, um observador e uma contagem foram estimados. Concluíram que podiam melhorar a eficácia das contagens aumentando o número de lâminas desmineralizadas ao invés de aumentar o número de observadores, embora a primeira alternativa seja até cinco vezes mais cara. Também concluíram que aumentar o número de contagens por observador tem pouco ou nenhum efeito na eficiência das contagens.

Condon et al. (1986) avaliaram a técnica de estimativa de idade pelos linhas incrementais de cemento numa amostra de 80 premolares de indivíduos de idade conhecida, provenientes de extrações clínicas, em secções desmineralizadas de 7 µm coradas com hematoxilina. Fizeram diversas contagens da mesma lâmina até que um resultado consistente fosse alcançado. A média destes resultados consistentes foi considerada o escore de linhas incrementais para aquela determinada secção. Ao adicionarem às contagens de linhas incrementais a idade média em que tais dentes erupcionam, obtiveram a contagem ajustada. Retiraram da amostra três indivíduos sem definição microscópica de estrutura cementária e outros quatro indivíduos que apresentaram possíveis casos de duplicação das LC e consequente contribuição negativa para as análises estatísticas. Observaram uma correlação entre a idade e a contagem de (r)=0.78 para a amostra inteira (n=73) e de (r)=0.86 numa amostra que excluía dentes com problemas periodontais (n=55). O erro padrão das estimativas variou entre 4,7 a 9,7 anos dependendo do sexo do indivíduo e condição do dente, sendo que as estimativas para o sexo feminino foram significativamente melhores do que para o sexo masculino. O erro médio absoluto da técnica foi de 6,0 anos com erro médio de 0,26 anos.

Lipsinic et al.(1986) coletaram 31 primeiros premolares sem evidências clínicas e/ou radiográficas de alterações periodontais, extraídos de pacientes sem patologias sistêmicas, para um estudo de validação da técnica de estimativa de idade pelas linhas incrementais cementárias numa população maior do que a

estudada por Stott et al. (1982). Os autores relataram desvantagem ao observarem lâminas de secções mineralizadas, devido a artefatos de técnica e dificuldade para se contar as linhas incrementais. Todavia, lâminas de cortes transversais de 5 µm, desmineralizadas e coradas com hematoxilina e eosina resultaram em linhas incrementais facilmente contáveis. Três observadores fizeram as contagens no microscópio óptico em aumento de 100 vezes. Pelo menos dois cortes, oriundos de diferentes regiões do terço radicular médio, por dente foram avaliados. Cada observador registrou número máximo de linhas observadas em todas as contagens para cada dente. A média das contagens entre os três observadores foi feita para a análise dos resultados. A esta média se adicionou a idade média de erupção dos primeiros premolares superiores para se alcançar a estimativa de idade para as amostras. Os resultados mostraram que a eficiência da técnica diminuía à medida que a idade aumentava, mais especificamente a partir dos 30 anos de idade, resultando em subestimativas de idade. Este dado sugere uma diminuição no número de linhas incrementais de cemento com a idade, de acordo com os pesquisadores. Os autores concluíram que estimar a idade a partir de linhas incrementais de cemento de primeiros premolares superiores, com lâminas desmineralizadas de 5 µm e coradas com hematoxilina e eosina não é um método confiável e sugeriram mais estudos com outros grupos de dentes e faixas etárias.

Lucas e Loh (1986) verificaram a ocorrência das LC em 41 dentes de indivíduos portadores de documento de identidade da população de Cingapura. O objetivo do trabalho foi verificar se as LC são formadas anualmente. Os dentes foram cortados transversalmente, sendo que alguns foram corados com vermelho de alizarina. Um observador em cego contou as linhas, reportando dificuldades em contá-las. A hipótese de que as LC são formadas anualmente não pôde ser sustentada neste trabalho, já que correlação entre idade estimada e idade real não foi alta ((r)=0.535).

Miller et al. (1988) tentaram validar a técnica de estimativa da idade pela contagem de linhas incrementais de cemento numa amostra maior do que as estudadas por Stott et al. (1982) e Lipsinic et al. (1986). Coletaram 100 dentes extraídos de 100 indivíduos diferentes, de idade entre nove e 97 anos. Observaram que secções transversais de 350 µm de espessura, mineralizadas e polidas com pasta diamantada produziam as melhores imagens das linhas incrementais. Os

autores utilizaram uma secção de um dente por indivíduo. Observadas ao microscópio, as regiões com mais linhas incrementais foram fotografadas em filme preto e branco e projetadas numa tela para contagem. A contagem foi iniciada a partir da primeira linha escura a partir da camada granular de Tomes. Quatro observadores analisaram as imagens separadamente. A idade estimada foi o resultado da média dos escores dos observadores adicionada à idade média de erupção do dente. Não foram vistas linhas incrementais contáveis em 29 imagens, apesar do acabamento e polimento. Somente 5,7% das amostras estimaram idade dos indivíduos com intervalo de cinco anos de variação. Mais de 85% das amostras estimaram a idade incorretamente, com intervalos de mais de dez anos. Notou-se maior correlação entre a estimativa e a idade conhecida na faixa etária abaixo de 35 anos. A partir da análise dos dados de 71 indivíduos, os autores concluíram que estimar a idade humana pelas LC não é possível.

Grosskopf (1989), em trabalho de ordem técnica, demonstrou a ocorrência das LC em indivíduos carbonizados, especulando seu potencial positivo para as perícias odontolegais de identificação humana neste tipo de vítimas.

Solheim (1990) estudou a espessura do cemento em 1000 dentes humanos de uma amostra de indivíduos leucodermas. Apontou correlação positiva ((r)= 0.40 a 0.65) entre idade e a soma da espessura do cemento medido em faces vestibular e lingual de regiões radiculares no limite entre terço médio e terço apical, bem como observou uma taxa reduzida de aposição cementária em idosos. Também foi notado que os dentes superiores tinham mais cemento na face lingual do que na vestibular. Observou que há tendência para mulheres terem menos cemento que homens, e que dentes extraídos de cadáveres ou por condições patológicas de indivíduos vivos também apresentem menos.

Grosskopf (1990) realizou a análise das LC em 102 dentes de idade conhecida, oriundos de indivíduos de diferentes características. Destes dentes, 66 eram de populações antigas, de diferentes períodos históricos, 15 eram de vítimas carbonizadas e 36 dentes pertenciam a indivíduos contemporâneos e foram usados como controle. Secções mineralizadas de 100 µm foram feitas e a análise consistiu em adicionar a idade média de erupção do dente estudado, específica para cada gênero, ao número de linhas incrementais contados. Em todos os dentes foi possível realizar esta análise, e o desvio médio da idade real foi de apenas +/- 3,23 anos.

Concluiu o autor que a aplicação desta técnica representa um método quantitativo vantajoso para a estimativa de idade.

Stein e Corcoran (1994) buscaram averiguar a confiabilidade da técnica das LC para estimativas de idade. Em 52 dentes não restauráveis, doados por 42 pacientes, realizaram cortes longitudinais de 500 µm que foram corados com vermelho alizarina. Fotomicrografias foram feitas, as contagens foram conduzidas e o resultado adicionado à idade média de erupção do dente analisado. O coeficiente de correlação de Pearson entre idade estimada e idade real foi de (r)=0.93. Em indivíduos com mais de 55 anos, a técnica tendeu a subestimar a idade, e os autores apresentaram uma fórmula para tentar compensar esta falha. Os autores concluíram que estimar a idade pelas LC é uma técnica moderadamente confiável.

Kvaal e Solheim (1995) avaliaram a correlação entre a idade em que a raiz do dente alcança seu comprimento máximo e o número de linhas incrementais formadas, também observando se a cada ano de fato se formava um anel opaco. Os autores prepararam 95 dentes extraídos de cadáveres (grupo I), extraídos por doenças periodontais (grupo II), cáries e suas conseqüências (grupo III) e razões protéticas e/ou ortodônticas (grupo IV). Os dentes foram cortados longitudinalmente após serem desmineralizados e corados com cresil violeta, originando de quatro a cinco lâminas histológicas com 5 a 7µm de espessura. As lâminas foram observadas em microscopia de fluorescência, onde as imagens foram exibidas num monitor externo e avaliadas. As contagens foram feitas em diferentes regiões, sempre buscando as áreas em que as linhas incrementais poderiam ser mais bem contadas. Foram feitas contagens por dois observadores, em três áreas diferentes do cemento e em diferentes lâminas, sendo considerada a contagem máxima. Também foi feita a medição da largura do cemento a partir da junção cementodentinária até sua superfície externa, em áreas que as LC estavam paralelas entre si e facilmente distinguíveis. No mesmo plano, mediu-se a largura de quatro a seis linhas incrementais consecutivos entre si. Calculou-se então o número aproximado de linhas em relação à largura do cemento. Nas análises, a idade do dente não era conhecida pelos observadores. O coeficiente de correlação para todos os dentes quando as linhas foram contadas foi de (r)= 0.84 e quando se calculou o número de linhas incrementais se obteve (r)= 0.73. Por grupo de dente, o coeficiente foi maior em segundos premolares inferiores, e menor em dentes extraídos por razões

periodontais. Só se obteve resultados significantes em indivíduos menores de 50 anos. Os resultados sugerem que as técnicas de preparação histológica podem não ter corado todas as linhas incrementais presentes na secção, levando tanto o método de contagem quanto o de cálculo a não confirmarem a hipótese que um anel de cemento se forma por ano.

Kvaal et al. (1996) avaliaram diversas técnicas para o preparo das lâminas usadas para estimativa de idade por LC. Compararam cortes transversais e longitudinais, lâminas mineralizadas e desmineralizadas, métodos de inclusão (em parafina ou congelados), diversas técnicas para corar os tecidos (azul de toluidina, violeta cresil, hematoxilina e eosina, ácido periódico de Schiff - PAS). Diferentes técnicas de microscopia também foram comparadas (óptica convencional, fluorescência, polarizada, varredura a laser confocal, interferência de contraste, contraste de fase e microscopia eletrônica de varredura. As LC foram observáveis em microscopia óptica nas lâminas mineralizadas, e no caso das lâminas desmineralizadas, foram visíveis naquelas coradas com azul de toluidina, violeta cresil, hematoxilina, ácido periódico de Schiff. O melhor contraste foi obtido nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina, PAS e violeta cresil) quando iluminadas com microscopia de fluorescência. Outras técnicas microscópicas foram insatisfatórias.

Renz et al. (1997) buscaram entender a natureza estrutural das linhas incrementais de cemento através de diferentes técnicas de microscopia. Utilizaram microscopia óptica convencional, microscopia de varredura a laser confocal, microscopia eletrônica de transmissão, e radiação-x elétron-dispersiva em microscopia eletrônica de varredura. Prepararam lâminas mineralizadas espessas de 100-150 µm, lâminas mineralizadas semifinas de 0.5 a 2 µm e lâminas ultrafinas de 50-100 nm. Em microscopia óptica, as linhas incrementais puderam ser visualizadas, mas não em todos os dentes das secções espessas, e corar ou não a amostra não influenciou em sua visibilidade. Tentou se observar o mesmo local do mesmo espécime na medida do possível para comparação dos resultados. Os fatores que influenciaram a visualização neste método foram a espessura do corte, o meio de montagem, o campo de profundidade e o ajuste da fonte de luz. Nas lâminas semifinas, não se observou quaisquer linhas incrementais, sendo que corar as amostras não revelou nenhum anel de cemento. Já na microscopia de varredura

a laser confocal, a observação dos mesmos locais revelou estruturas similares aos da microscopia óptica, com resolução muito melhor. A microscopia eletrônica de transmissão não revelou estruturas similares às linhas incrementais de cemento. Nas leituras gráficas da radiação-x elétron-dispersiva em microscopia eletrônica de varredura, houve uma leve variação de intensidade da radiação transmitida. Todavia, esta variação não correspondeu ao número, posições e distâncias das LC observadas à microscopia óptica. O estudo demonstrou que a aplicação de diferentes métodos para observação de um mesmo objeto nem sempre resulta em resultados complementares que poderiam levar a uma compreensão mais ampla. Para os autores, a natureza ultra-estrutural das linhas incrementais de cemento permaneceu uma questão em aberto.

Rao e Rao (1998) observaram a vantagem em se observar as LC em monitores de televisão ligados ao microscópio, onde analisaram secções longitudinais mineralizadas de dentes hígidos de indivíduos de idade conhecida foram analisadas ao nível da junção entre terços médio e cervical. Os resultados chegaram a erros relativamente baixos, variando entre +/- 1 a 2 anos, levando a conclusão que a técnica é bastante precisa e constitui ferramenta útil para as análises odontolegais.

Sousa et al. (1999) prepararam 17 dentes de indivíduos com idades entre 23 a 77 anos, visando analisar a contabilidade e eficiência da técnica. As raízes dos dentes mineralizados foram cortadas a 100 µm, transversalmente, sendo coradas com preparação de Villanueva ou laranja acridina. Alguns dentes não foram corados. As contagens feitas nas lâminas mineralizadas não coradas foram as melhores. Os autores concluíram que a repetibilidade e acurácia da técnica não depende do tipo de dente analisado ou sua localização, mas sim da média obtida após o maior número de contagens possível, sendo que não há influência da saúde periodontal nas contagens.

Ritz-Timme et al (2000) publicaram um trabalho onde diversos métodos para estimativa de idade foram comparados e a melhor indicação para cada técnica foi elencada. Os autores recomendaram a técnica das LC para cadáveres adultos, indivíduos vivos nos casos em que há um dente extraído disponível para análise, e indivíduos carbonizados.

Kagerer e Grupe (2001) sugeriram que o padrão alternante de linhas incrementais claras e escuras no cemento acelular humano se deve a fatores como doses de radiação UV, fatores climáticos, propriedades dos alimentos e mudanças hormonais. Também apontaram que os resultados contraditórios entre estudos prévios sobre os linhas incrementais de cemento podem ser explicados principalmente por diferenças no preparo das amostras, isto é, secções longitudinais versus transversais, número e espessura de cortes analisados por dente, meio de fixação dos mesmos, e o mais importante, dentes mineralizados versus dentes desmineralizados. Os autores destacaram um aspecto significativo que poderia enviesar as análises: estados patológicos dentários que poderiam aumentar ou diminuir a contagem das linhas incrementais, como por exemplo, hipercementose e periodontite, respectivamente. Como o cemento é um tecido mineralizado que sofre constante aposição e calcificação, especularam que eventos que alterassem os níveis de cálcio sistêmico, como doenças renais, traumas esqueléticos e gravidez, também poderiam deixar marcas nas linhas incrementais cementários. Segundo os autores, tais eventos poderiam ser de grande valia em processos de identificação humana. Visando investigar tais aspectos, estudaram 80 dentes humanos recém extraídos controlados em face de anamneses para avaliar se sob condições patológicas, as linhas incrementais de cemento continuariam sendo um método válido de estimativa da idade, e se eventos em vida poderiam ser identificados no cemento e servir de auxílio à identificação humana. Foram feitos entre quatro e 24 cortes transversais de 70 µm por dente, que foram montados mineralizados em lâminas e observados em microscopia de contraste de fase, sendo fotografados. Um observador contou as lâminas, que foram confrontadas com as contagens de outros três pesquisadores independentes, para validação. Foram observadas linhas incrementais de cemento mais nítidas em lados convexos das raízes, sendo em alguns casos observadas linhas incrementais mais largas e translúcidas, tomados como linhas incrementais hipomineralizadas. Nos 80 dentes o desvio médio entre a idade histológica e a cronológica foi de 5,7 anos. Nos dentes sem estados patológicos este desvio foi de dois a três anos apenas. Linhas incrementais hipomineralizadas puderam ter os anos de ocorrência datados precisamente, coincidindo com eventos relacionados nas anamneses (gravidez, aborto, doenças renais, traumas esqueléticos). Os autores concluíram que o método é altamente

aceitável, sendo que a precisão é maior nos dentes com suporte ósseo e nutricional adequados, e, mesmo em dentes com estados patológicos, a precisão do método se equipara a análises microscópicas e histomorfométricas de osso. Também se concluiu que eventos sistêmicos em vida que alteram e diminuem a disponibilidade de cálcio na frente de mineralização do cemento deixam linhas incrementais hipomineralizadas que servem como um “arquivo” de doenças renais, traumas esqueléticos e gravidez passados.

Maat et al. (2001), observando que o preparo de lâminas histológicas de tecidos ósseos mineralizados era tido como demorado e caro por muitos membros da comunidade científica, publicaram um trabalho de natureza técnica que buscou desmistificar esta visão, a partir de simples adaptações da técnica de Frost (1958). Utilizando materiais baratos e de fácil acesso (disponíveis em casas de materiais de construção, por exemplo), apresentaram uma técnica passo a passo para o preparo de amostras ósseas para serem observadas em microscopia polarizada, tanto arqueológicas quanto forenses. Até mesmo sugeriram um método de se polarizar a luz de microscópios ópticos convencionais para as observações histomorfométricas a partir de materiais fotográficos comuns. Além disso, também divulgaram sugestões para a resolução de alguns problemas comumente encontrados pelos pesquisadores que confeccionam lâminas histológicas com este tipo de tecido, sejam eles arqueológicos ou forenses. Com simplicidade, demonstraram que processar amostras de tecido ósseo mineralizado pode ser rápido, barato e eficaz.

Jankauskas et al. (2001) aplicaram a técnica a duas amostras: uma de 51 dentes variados e extraídos de 49 indivíduos de idade conhecida, por motivos clínicos, na Clínica de Estomatologia da Universidade de Vilnius (Lituânia). A outra amostra consistiu em 48 dentes caninos inferiores de indivíduos inumados entre 1944 e 1947, na vala comum de Tuskulenai (Vilnius, Lituânia). A idade destes últimos indivíduos foi determinada através de processos de identificação humana. Secções mineralizadas de 35 a 100 µm foram preparadas e linhas visíveis em 84 a 86% das amostras foram obtidas. Em três contagens, os resultados demonstraram que não há influência significativa da variação intraobservador nas análises. Para a primeira amostra, o erro médio absoluto foi de 6,46 anos, ao passo que este valor foi de 6,27 para a segunda amostra. Em alguns casos o erro ultrapassou a margem de 10 anos. Na segunda amostra, a técnica das LC foi comparada a outros métodos

macroscópicos, como a análise de suturas endocranianas e sínfise púbica. Os resultados mostraram que o erro encontrado nestas análises foi similar aos encontrados na técnica das LC, o que levou à conclusão de que a aplicabilidade desta técnica existe, porém os resultados encontrados foram menos animadores do que em outros estudos.

Bojarun et al. (2003) também analisaram a eficácia da técnica numa amostra de 178 indivíduos de idade conhecida, em 227 dentes permanentes. Não encontraram diferenças entre homens e mulheres. A correlação entre idade real, número de linhas e tempo de erupção dentária foi alta ($r>0.95$, $p<0,001$). O erro absoluto foi da ordem de 5,58 anos, sendo que em jovens o erro é menor (3,71 anos) e em indivíduos mais velhos o erro é maior (7,86 anos). Apontaram que equações de regressão produzem erros maiores, preferindo a contagem direta sobre imagens digitalizadas e exibidas em monitores. Julgaram a técnica aplicável para âmbito antropoforense.

Soomer et al.(2003) compararam métodos publicados para estimativa de idade que usam dentes seccionados (entre eles a técnica das LC), e dentes que analisam dentes intactos. Um observador independente mediu cada um dos 20 dentes de indivíduos caucasianos de idade conhecida. O erro médio e o erro padrão foram considerados as medidas para acurácia eficiência da técnica. Outros parâmetros como simplicidade, requisitos mínimos e equipamento necessário para a preparação dos dentes foram avaliados. As recomendações para o uso forense de cada técnica, de acordo com o tipo de indivíduo analisado foram dadas. No geral, os métodos para dentes seccionados originaram resultados mais confiáveis que os métodos para dentes intactos.

Pilloud (2004) objetivou analisar a acurácia das LC para a estimativa de idade de indivíduos mais velhos. Dois grupos foram formados: um com 34 dentes de 34 indivíduos com idade entre 57 e 90 anos, e outro com pessoas mais jovens, utilizado como grupo controle, 24 dentes de 24 indivíduos, com idades variando entre 21 e 45 anos. Os resultados demonstraram que há uma diferença significativamente maior entre a idade estimada e a idade real no grupo de mais idade. Além disso, o autor encontrou diferenças significativas entre homens e mulheres bem como entre dentes de indivíduos modernos e indivíduos que viveram no século XIX.

Wittwer-Backofen et al. (2004) realizaram um estudo de validação do método de estimativa de idade pelas LC com uma amostra de 433 dentes unirradiculares, com idade conhecida. Os autores removeram da amostra 70 dentes de 63 indivíduos (16,2%), que mostraram qualidade ruim dos tecidos após a preparação histológica e irregularidades significativas nos linhas incrementais de cemento. Dentes maxilares, principalmente segundos premolares apresentaram mais problemas de visualização, com padrões do cemento em formato ondulado, com faixas largas de cemento sem formação de linhas incrementais. As secções analisadas tinham entre 70 e 80 µm e não foram coradas, sendo apenas limpas em álcool. Foram feitas até três cortes em sequência a partir do terço apical dos dentes da amostra. As imagens das lâminas, sendo pelo menos três por dente, foram melhoradas com auxílio de softwares. As estimativas foram feitas em cego, com uma pesquisadora realizando as contagens em pelo menos quatro imagens diferentes do dente. Onde havia discrepância entre as contagens, a média destes valores foi considerada para analise estatística. Os resultados alcançados demonstraram uma alta concordância ((r)=0.970 para homens e (r)=0.978 para mulheres) entre a idade cronológica e a idade estimada, com um erro médio de dois anos e meio. Sexo, doença periodontal e variação intra-individual (a partir de casos de extrações múltiplas) foram analisados, e de acordo com os autores, nenhum destes fatores teve influência quantitativa nos linhas incrementais de cemento quando a metodologia proposta pelos autores foi seguida. Os autores atentam para o fato de que a exclusão de amostras com qualidade de imagem ruim, que não permita a contagem é um procedimento razoável, que apenas contribui para a obtenção de estimativas mais precisas. Não houve um grupo específico de dentes mais confiável para as análises, sendo que todos os espécimes da amostra renderam bons resultados. O uso de recursos de software para remoção de artefatos histológicos e marcação de contagens diretamente na imagem, uso de imagens em tempo real e contagem em monitor grande ao invés de diretamente no microscópio foram apontados como melhoramentos técnicos que podem ter contribuído para resultados mais precisos. Os autores também observaram com atenção a correlação entre doença periodontal e estimativas de idade, constatando que mesmo em casos de avançada periodontopatia, a formação das linhas incrementais de cemento persistia, de modo que os resultados alcançados se mostraram favoráveis. Esta técnica de estimativa de idade foi considerada confiável

pelos autores, que recomendaram sua aplicação em casos forenses usando-se dois dentes por indivíduo e combinando seu uso com outras técnicas de estimativa de idade.

Czermak et al. (2006) apontaram que a contagem manual das LC pode tomar muito tempo, além de estar sujeita a fatores indesejáveis como subjetividade e fadiga do observador. Foi apresentado um software desenvolvido pelos autores, que através de análises de Fourier, algoritmos e reconhecimento automático de padrões, promove uma contagem automatizada de LC em imagens digitais. Em determinadas regiões de interesse, o programa realiza uma varredura “linha a linha” e contagem de picos dentro da escala de cinza da imagem. Cada varredura do software pode fazer até 400 contagens e conduzir análises estatísticas dos resultados. Através deste recurso, os autores buscaram automatizar as análises e eliminar potenciais fontes de erros.

Maat et al. (2006), observando o fenômeno de duplicação dos linhas incrementais de cemento acelular relatado por alguns pesquisadores, procuraram uma solução técnica para este problema. Apontaram que como o cemento é formado em camadas uniformes e cônicas ao redor das raízes dentárias, seguindo sua anatomia, um corte transversal e perpendicular ao longo eixo do dente favorece o fenômeno da duplicação na medida em que sobrepõe de tangencialmente as linhas incrementais de cemento, que passam a ser observadas em duplicidade ao microscópio. Quando se faz o corte das raízes perpendicular à sua própria superfície (e não ao seu longo eixo), as camadas de cemento são sobrepostas de maneira vertical entre si, aumentando sua visibilidade à microscopia e evitando erros de contagem que podem prejudicar a aplicação da técnica.

Klauenberg e Lagona (2007) chamaram atenção para a grande dificuldade em se analisar, através de contagens manuais em fotomicrografias digitais, imagens de LC de qualidade média, que podem não apresentar nitidez e contraste adequados entre as camadas de cemento observadas. Através de filtros eletrônicos para imagens digitais, desenvolveram um método semi-automático para contagem de LC. Através de algoritmos complexos, a aplicação do filtro analisa os valores de escala de cinza presentes numa imagem e prevê a provável localização das LC, que são apresentadas em figuras com padrões distintos entre linhas claras e escuras. As imagens resultantes muito se assemelham às imagens de impressões

datiloscópicas. Concluíram os autores que este tipo de tratamento de imagem pode ajudar a diminuir a subjetividade presente nas análises de imagens com nitidez e contraste insatisfatórios.

Wittwer-Backofen et al. (2006) buscaram estimar a idade duma população de 121 indivíduos esqueletizados do período medieval. Uma equipe de 13 observadores independentes conduziu estimativas de idade utilizando diversas técnicas para estimativa de idade, como análise de suturas endocranianas, contagem de ósteons, análise da superfície auricular do osso temporal, translucidez de dentina e contagem de LC. Entre as dificuldades reportadas pelos autores, está a subjetividade das análises, inevitável em alguns momentos, mesmo numa equipe altamente capacitada. De maneira geral, todas as técnicas apresentaram intervalos de estimativa de idade menores para os indivíduos jovens, ao passo que estes intervalos aumentaram para os adultos com mais idade.

Pinchi et al. (2007) analisaram a correlação entre espessura do cemento e idade. O cemento de 127 dentes de indivíduos variando entre 16 e 90 anos de idade, foi medido em dois locais: no ápice e no limite entre os terços radiculares apical e médio. Encontraram correlação estatística entre o aumento na espessura do cemento e idade maior ao nível do ápice ((r)=0.67) que no limite entre terços médio e apical ((r)= 0.56).

Wedel (2007), observado que as linhas incrementais de cemento alternavam entre claros (supostamente depositados na primavera/verão) e escuros (correspondentes ao outono/inverno), buscou em seu estudo técnico observar a camada mais externa do cemento de dentes doados por um cirurgião-dentista entre setembro de 2004 e setembro de 2005 e assim determinar a estação em que estes dentes foram extraídos (ou numa aplicação forense, a época de morte de um indivíduo). Foram obtidos 132 dentes de 100 indivíduos diferentes, dos quais 52 foram excluídos por apresentarem estágios muito precoces de desenvolvimento, sem formação radicular, anomalias de formação, cáries que impossibilitaram a visualização das linhas incrementais, além de informações sobre idade e outros parâmetros incompletas. A faixa etária dos sujeitos da pesquisa variou entre 15 e 90 anos de idade. Os dentes foram seccionados transversalmente, lixados e polidos, sem serem descalcificados. As amostras foram observadas em microscopia a polarizada e fotografadas digitalmente. Quando a linha mais externa era identificada,

a espessura média das outras linhas incrementais similares à mesma era medida com a função régua do programa Adobe Photoshop®. A medida da espessura do anel mais externo era dividida pela espessura média das LC correspondentes para se determinar sua formação percentual aproximada. A autora apontou que as espessuras das LC diferiram minimamente entre os sujeitos, mas não de maneira significante entre diferentes faixas etárias. A largura média das linhas incrementais teve correlação com o número de dias transcorridos em cada estação. As linhas incrementais opacas tiveram sua espessura média fortemente correlacionada com o número de dias passados a partir de 12 de outubro de 2004, enquanto as LC claras tiveram forte correlação com o número de dias passados a partir de primeiro de abril de 2005. Os resultados mostraram uma clara transição entre a porcentagem de formação entre as LC claras e escuras na época do fim de setembro/início de outubro, e outra transição, menos marcada, entre fim de março e início de abril. Houve 99% de acurácia em se determinar se um dente foi extraído entre 12 de outubro e primeiro de abril (outono e inverno, no hemisfério norte), ou se foi extraído entre primeiro de abril e 12 de outubro (primavera e verão). De acordo com a pesquisadora, a porcentagem de formação de um anel pode ainda ajudar a estimar em que mês aproximadamente o dente foi extraído. A autora destacou a aplicabilidade do método em conjunto com a estimativa da idade pelas linhas incrementais de cemento, o que poderia, feitas as devidas validações de métodos, ajudar os profissionais de áreas forenses a obter intervalos postmortem mais precisos ao se estimar também a estação do ano em que um indivíduo foi morto.

Aggarwal et al. (2008) estudaram o método de estimativa da idade pelas linhas incrementais de cemento de 30 dentes de idade conhecida, com faixa etária variando de 13 a 69 anos. Foram preparados cortes longitudinais mineralizados, observados em microscopia polarizada e fotografados para análise em um monitor de computador. Não foram feitas contagens de linhas incrementais, mas sim estimativas de seu número a partir de medições de espessura média. Mediu-se a largura de uma área onde as linhas incrementais eram facilmente visualizadas, partindo da junção dentina-cemento até a superfície externa da raiz. Depois, a medida de duas linhas incrementais consecutivas (uma clara e uma escura) foi feita. A média entre a espessura total do cemento e a largura de um par de linhas incrementais foi considerada o número de linhas incrementais presentes. A esta

média foi adicionada a idade média de erupção dentária e a estimativa de idade foi obtida. Os resultados mostraram correlação entre a idade estimada e a idade real. Os autores concluíram que não há influência significativa do sexo, idade, doença periodontal ou tipo de dente na qualidade da estimativa da idade pelo método descrito, destacando seu potencial auxílio à identificação humana forense.

Meinl et al. (2008) conduziram um estudo comparativo entre as técnicas de Lamendin et. al (1992), Bang e Ramm (1970) e a das LC. As duas primeiras técnicas consistem basicamente em analisar as proporções entre comprimento radicular e comprimento de dentina translúcida, analisada contra a luz. Um grupo de 37 indivíduos, com idades variando entre 20 a 91 anos, doou 67 dentes, que foram analisados de acordo com as metodologias dos trabalhos citados. O erro médio absoluto da técnica das LC foi metade do encontrado nas técnicas de Lamendin e Bang e Ramm. Para idosos, o erro médio absoluto da técnica de Bang e Ramm foi semelhante ao uso das LC. A técnica de Lamendin foi mais precisa em indivíduos jovens e idosos, ao passo que as LC foram mais precisas em adultos de idade média. O método das LC foi o mais preciso quando se analisaram todas as faixas etárias. Os métodos analisados mostraram um viés de tender a superestimarem a idade de jovens adultos e subestimar a idade de adultos mais velhos, com exceção da técnica das LC, que não originou estimativas enviesadas para jovens adultos. Concluíram os autores que quando há disponibilidade de materiais e *know-how*, deve preferir a técnica das LC às técnicas de Lamendin e Bang e Ramm, pela precisão demonstrada no estudo.

Avadhani et al. (2009) avaliaram a correlação entre número de LC e idade. De 25 dentes saudáveis de pacientes com idade conhecida, 19 apresentaram LC visíveis e os seis restantes foram descartados por não apresentarem incrementos visíveis. As lâminas preparadas foram do tipo mineralizado, desgastadas manualmente. Metade foi cortada transversalmente ao longo eixos do dente, ao nível do terço médio. A outra metade foi cortada longitudinalmente ao longo eixo radicular. A contagem foi feita manualmente e adicionada à idade média de erupção dentária do dente analisado. Os resultados mostraram desvio de dois a três anos da idade real, ou seja, 94,73% de eficácia. Os autores concluíram que a técnica é confiável para este tipo de perícia odontolegal.

Roksandic et al. (2009) aplicaram a técnica numa população arqueológica dos períodos mesolítico e neolítico, oriunda de sítios arqueológicos da margem direita do rio Danúbio. Foram coletados 116 dentes monorradiculares de 116 indivíduos esqueletizados. Como não havia registros prévios sobre idade destes indivíduos, o estudo se concentrou na análise da variação intra e inter examinadores. A técnica de preparo seguiu o estudo de Wittwer-Backofen et al. (2004). Da amostra, 40 dentes apresentaram cortes com LC analisáveis. Os 76 dentes restantes apresentaram degradação de cemento, diagênese (mudanças físicas, químicas ou biológicas sofridas pelo cemento ao longo do tempo), linhas pouco visíveis, fendas atípicas verticais ou diagonais ao longo do cemento ou fratura do cemento, sendo descartados do estudo. Mesmo com a seleção dos espécimes mais facilmente analisáveis, os resultados não foram consistentes. Os autores encontraram grande variação de linhas contadas entre segmentos do mesmo dente, em situações onde a calibração entre os observadores era considerada adequada. Os processos que alteram o cemento, citados acima, podem explicar esta variação. Esta variação nas estimativas de idade pelo método foi tamanha que se assemelhou com as obtidas em outros métodos de exame macroscópicos. Enquanto os processos biológicos, tafonômicos e diagênicos do cemento não forem totalmente compreendidos, não se pode arriscar destruir espécimes arqueológicos raros para a aplicação da técnica, recomendaram os autores.

Obertová e Francken (2009) tentaram examinar a acurácia e viés de uma amostra de 116 dentes de 65 indivíduos de idade e gênero conhecidos, integrantes de uma coleção anatômica de uma universidade alemã. As lâminas analisadas eram mineralizadas, não coradas, de cortes transversais de terço médio radicular de dentes unirradiculares. As contagens máximas de LC aumentaram da secção mais cervical para a mais apical. Os melhores resultados foram obtidos em jovens adultos. A acurácia diminuiu à medida que aumentava a idade dos sujeitos analisados. Em faixas etárias acima de 40 anos, houve uma significativa subestimativa de idade. Devido a este fato, os autores recomendaram que a técnica dos LC devesse ser usada em associação com outras técnicas macroscópicas.

Kasetty et al. (2010) aplicaram a técnica a uma amostra de 200 dentes unirradiculares de idade conhecida, de variadas faixas etárias. A espessura do cemento também foi medida. Os resultados mostraram que há correlação entre o

número de LC, espessura de cemento e idade. Os autores enfrentaram dificuldades como: variação de espessura das LC, falta de nitidez, sobreposição da mesma linha em planos diferentes que pode ser interpretada como duas linhas, falta de definição da junção cementodentinária, reabsorções de cemento que diminuem a espessura do cemento. Embora tenha sido encontrada correlação positiva entre LC e espessura de cemento, estimativas de idade precisas foram atingidas somente em 1,5 e 1% dos casos, respectivamente. Os autores procuram métodos ainda mais precisos para estimar a idade pelo cemento, e recomendam mais estudos sobre fatores que podem alterar a qualidade e quantidade das LC, como gênero, clima e fatores nutricionais.

2.3 CRONOLOGIA DE ERUPÇÃO DENTÁRIA

Logan e Kronfeld (1933), estudando a cronologia de erupção dentária, observaram que entre os 17 e os 21 anos de idade, poderão erupcionar os terceiros molares superiores e inferiores de um indivíduo.

Marques et al. (1978) realizaram em São Paulo-SP um estudo transversal em 1741 crianças de idade entre 4 e 14 anos de idade. Foram examinados 878 meninos e 863 meninas. Incluiu-se na amostra crianças de dez escolas diferentes da cidade, de diferentes níveis socioeconômicos. Foram divididas por gênero, em grupos de seis em seis meses, de acordo com a idade cronológica. O exame foi clínico, sem complementação radiográfica. Observou-se que os dentes de crianças do gênero feminino erupcionam antes das do gênero masculino. Os dentes inferiores, para ambos os gêneros, erupcionam antes, com exceção dos premolares. Os resultados com a época de erupção para cada dente foram apresentados em tabelas que evidenciam as diferenças de cronologia de erupção entre crianças brasileiras e estrangeiras.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a eficácia da técnica descrita, tanto em dentes hígidos quanto atingidos por patologias e alterações bucais.

Verificar se patologias e alterações bucais podem interferir na investigação da estimativa de idade pela técnica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

01 l de xilol (C_8H_{10} P.M. 106,17) PA ACS

10 discos de carborundo.

01 pacote de compressas de gaze hidrófila de algodão de 250 g, 08 dobras, 09 fios por cm^2.

02 frascos de líquido para acrílico autopolimerizante JET® 120 ml. Polímero metil etil metacrilato.

02 frascos de pó para acrílico autopolimerizante JET® 220 g. Copolímero metil etil metacrilato.

01 frasco de líquido detergente para corte EXTEC® hidrossolúvel 950 ml.

01 l de água destilada.

25 folhas de lixa d água granulação 280.

01 l de hipoclorito de sódio 0,5% (Líquido de Dakin).

01 frasco de EDTA a 17% 100 ml.

01 l de álcool 99,3° INPM.

01 frasco de meio de montagem Permount® 100 ml.

01 caixa de filtros de papel para café nº102.

Lâminas de vidro 75x25x01 mm.

Lamínulas de vidro 24x24 mm.

01 caneta preta marcador para retroprojetor, tinta permanente, ponta média 2,0 mm.

01 lápis comum.

01 tesoura comum.

01 espátula nº 36.

01 mandril para discos de carborundo para peça reta.

01 pedra montada para peça reta.

01 forma de gelo com capacidade para 14 cubos de formato retangular.

03 pinças clínicas.

01 seringa plástica de 10 ml.

02 recipientes plásticos de 100 ml.

01 recipiente de vidro de 100 ml.

03 potes de Dappen.

01 placa de Petri.

01 disco diamantado Buehler® (Isomet Wafering Blade – Evanston, EUA) de 4 ”.

01 motor elétrico com peça reta, modelo odontológico Multi Micro NSR®, RPM máx. 20.000 e frequência de 50/60 Hz (São Paulo, Brasil).

01 cortadora de precisão de baixa rotação Labcut 1010® (Enfield, EUA).

01 microscópio polarizado Olympus BXP50® (Tóquio, Japão)

01 câmera digital Olympus C5050 5 megapixels® (Tóquio, Japão)

01 computador com as especificações mínimas: processador Intel® Celeron M, 80 GB de disco rígido, 02 GB de memória RAM, sistema operacional Microsoft Windows XP® equipado com softwares Image J® (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, EUA) e BioEstat 5.0 (Manuel Ayres, Manuel Ayres Jr., Daniel Lima Ayres e Alex Assis dos Santos, Instituto Mamirauá, Brasil)

Foram obtidos 55 dentes da Clínica de Graduação FOUSP e de outro CD colaborador de consultório particular (Anexo B). A indicação para a extração de todos os dentes utilizados no estudo foi o tratamento odontológico eletivo, incluindo dentes hígidos e portadores de alterações patológicas, extraídos apresentando diagnóstico de: destruição coronária profunda, extensa destruição associada a periapicopatias, impactação, perda irreversível de inserção periodontal, e indicação ortodôntica.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Atendimento às normas de bioética

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP, parecer 118/2009 – Anexo A).

4.2.2 Coleta de informações sobre os sujeitos

Após leitura, esclarecimentos e assinatura de um termo de consentimento (Apêndice A), 42 indivíduos doaram seus dentes para a pesquisa. A coleta foi realizada em cego, sem contato dos examinadores com os doadores, por três auxiliares independentes.

Antes de serem submetidos às extrações dentárias, os sujeitos responderam a um questionário (Apêndice A) sobre sua história médica, odontológica e hábitos individuais, contando com apoio dos auxiliares para esclarecimento de dúvidas. Os auxiliares complementaram o preenchimento do questionário com dados individuais dos dentes extraídos e do procedimento cirúrgico executado. Os envelopes com os questionários foram lacrados e identificados com um código alfanumérico. Os envelopes somente foram abertos e confrontados com as estimativas de idade após a preparação histotécnica, registro e contagem das imagens das lâminas histológicas.

4.2.3 Preparação histotécnica

Os dentes, lavados em água corrente, tiveram suas raízes limpas com xilol para remoção de material orgânico aderido e desinfetados com álcool a 70%. Depois, tiveram suas coroas (quando presentes) removidas com discos de carborundo, montados em motor com peça reta. Após, as raízes foram incluídas em resina acrílica ativada quimicamente incolor, em formas de gelo.

A inclusão foi feita se observando o correto posicionamento das raízes: a superfície a ser analisada foi posicionada o mais paralela possível à parede da

forma, de modo a propiciar cortes perpendiculares às paredes radiculares externas, ao invés de perpendiculares ao longo eixo (Figura 4.1) Esta medida favorece uma melhor visualização das LC (Maat et al., 2006), já que as raízes dentárias possuem formato cônico, e o cemento nelas depositado, em camadas, segue este formato. Faces radiculares com presença de cálculo ou outras alterações evidentes não foram selecionadas como área de corte

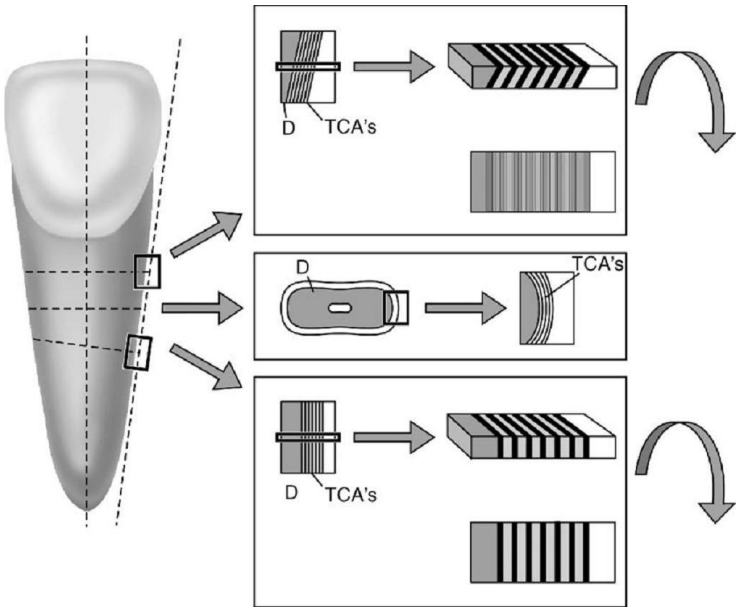

Figura 4.1 - Desenho mostrando a diferença das LC vistas em cortes transversais perpendiculares ao longo eixo do dente (caixa superior), e à superfície radicular (caixa inferior). Por minimizar a sobreposição tangencial de LC, os cortes do segundo tipo produzirão mais contraste entre linhas incrementais claras e escuras. D=dentina,TCA=LC (extraído de Maat et al., 2006)

Quando um corte transversal à raiz é feito perpendicular ao longo eixo do dente, a sobreposição tangencial das camadas de cemento dificulta sua visualização e favorece a ocorrência do fenômeno de duplicação relatado em outros estudos (Kagerer; Grupe, 2001; Wittwer-Backofen et al., 2004; Maat et al., 2006; Renz; Radlanski, 2006). Todavia, ao se realizar o corte perpendicular à superfície externa da raiz, a sobreposição tangencial é minimizada no lado selecionado, possibilitando melhor análise das LC (Figura 4.1). Vale notar que se no lado selecionado as linhas incrementais se evidenciam, no lado oposto o corte se dá numa superfície inclinada e ocasiona na visualização de cemento desorganizado.

Após a polimerização da resina incolor, os blocos foram marcados com a mesma numeração dos códigos identificadores, montados num suporte para

amostras irregulares Extec 10015® e fixados à cortadora de precisão de baixa rotação. Tomou-se o cuidado de se montar a amostra de maneira a ficar perpendicular (Figura 4.2) ao corte do disco diamantado. O compartimento lubrificante da cortadora foi abastecido com 150 ml de água e adicionado de 5 ml de solução detergente. A máquina foi regulada para atuar a 200 rpm.

As amostras foram fixadas pela porção apical e o primeiro corte foi feito no limite entre os terços cervical e médio das raízes (Figura 4.2), sendo descartado o remanescente da porção radicular cervical removido no primeiro corte. A máquina foi calibrada para avançar em direção apical cerca de 60 µm entre um corte e outro, o que resultou num corte radicular de aproximadamente 30 µm quando os 30 µm de espessura do disco diamantado são descontados. Experimentos piloto anteriores com espessuras maiores não permitiram uma adequada iluminação da amostra ao microscópio, com muito pouca nitidez e diferenciação entre as LC e dificuldades em focar as amostras.

Quando um corte transversal satisfatório era obtido (Figura 4.2), se procedia ao acabamento e polimento da amostra, usando-se a técnica adaptada de Frost (1958) (Maat et al., 2006). Ao longo do lado maior de uma folha de lixa d água de granulação 280 recortou-se tiras de aproximadamente 3 x 8 cm^2. O restante da folha foi dividido em quatro partes iguais. As tiras de lixa d água, em conjunto com uma lâmina de vidro, constituem o dispositivo fixador de amostras (Figura 4.3). A lâmina foi envolvida com a tira de lixa, que foi segurada pelos dedos polegar e médio e estabilizada pelo dedo indicador. Os dedos polegar e médio seguram a tira de lixa, enquanto o indicador estabiliza a lâmina aplicando leve pressão contra a primeira. Como a parte abrasiva do dispositivo fixador fica em contato com a amostra, sem ser submetida a contato direto com a superfície durante os movimentos e assim estabilizando-a, consegue-se acabamento e polimento satisfatórios.

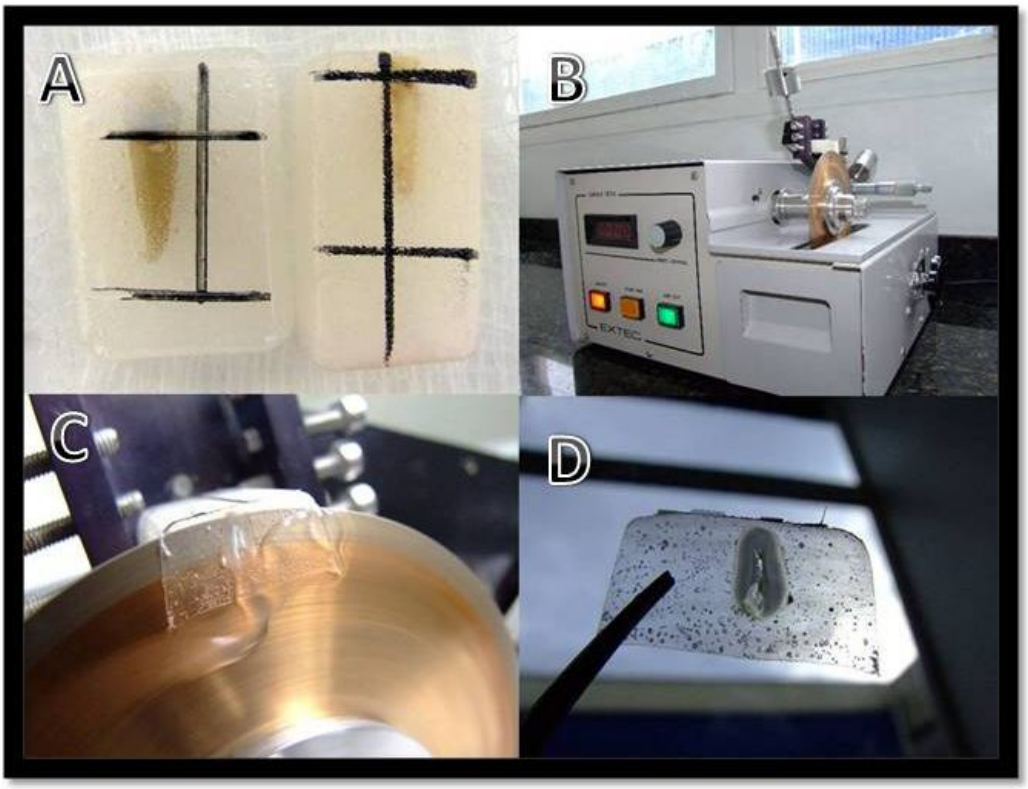

Figura 4.2 – Plano de corte paralelo à superfície externa radicular (A), raiz em posição de corte (B), corte em andamento (C) e corte obtido (D). Notar a fina espessura e a translucidez contra a luz

A folha cortada de lixa d água foi lubrificada com água em seu centro, e a amostra foi posicionada no mesmo local. Com o dispositivo fixador pressionando levemente a amostra, se iniciou o acabamento através de movimentos circulares que se iniciaram no meio da folha recortada. À medida que a amostra se desgastava e o abrasivo no centro da folha perdia granulação, movimentos mais amplos foram executados na direção da periferia da folha. Deve-se adicionar mais água na folha para manutenção de uma lubrificação satisfatória. Para isso, usa-se uma seringa para melhor controle da quantidade de água dispensada, já que excessos de água podem contribuir para soltar a amostra do dispositivo fixador e molhar o verso da lixa, causando seu dobramento e atrapalhando o processo.

O critério para interromper o desgaste é visual (Figura 4.3). Quando se observa que a amostra começa a perder transparência, adquirindo aspecto visual opaco, deve-se interromper o processo de desgaste e iniciar o polimento. Excessos

de desgaste podem originar lâminas histológicas de aparência rachada e com descolamento e fratura do cemento, impossibilitando a análise.

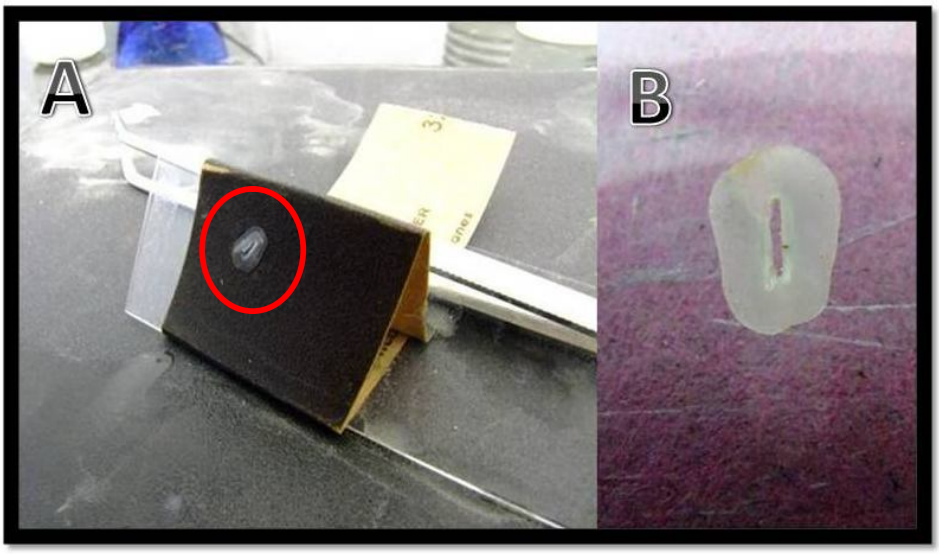

Figura 4.3 – O dispositivo fixador de amostras (A) é de simples manuseio. Quando a amostra se torna opaca (B), deve-se interromper o desgaste

Para execução do polimento, os movimentos circulares devem ser executados novamente no centro da folha, visto que a granulação nesta área reduz significativamente e constitui substrato apropriado para a etapa. É importante observar que neste estágio as amostras são frágeis devem ser manipuladas com cuidado, utilizando-se pincéis e pinças delicadas, a fim de se evitar fraturas e dobras.

A limpeza dos cortes é um fator crítico, que influencia diretamente a qualidade das lâminas. Sem limpeza adequada, detritos e lama de dentina (*smear layer*) comprometem a visualização do cemento e adjacências ao microscópio. Após o desgaste, as amostras foram imersas e agitadas suavemente em água destilada, para a remoção da maior parte dos detritos do processo de acabamento e polimento. Após, o mesmo processo é feito numa solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (Líquido de Dakin) para remoção de mais detritos. A amostra torna a ser lavada na água destilada e é transferida para um pote de Dapen com EDTA a 17% durante 05 minutos. Em ensaios preliminares, se obteve lâminas tão limpas utilizando-se este protocolo quanto com banho em cuba ultrassônica por 30 s. Após o descanso no EDTA, as amostras foram novamente lavadas com água destilada e imersas em álcool numa placa de Petri, para desidratação durante 05 min.

Desidratados, os cortes foram secos em papel filtro. É importante secar adequadamente a amostra, pois se a mesma ainda estiver impregnada com álcool e entrar em contato com o meio de montagem, a reação resultante dilui o último, causando bolhas de ar que podem comprometer a análise das LC. Para a finalização da lâmina, aplicou-se meio de montagem e posicionou-se a amostra fazendo com que a mesma ficasse completamente imersa na substância. A lamínula foi então baixada com cuidado para não permitir a formação de bolhas.

Caso haja formação de bolhas de ar, deve-se tentar removê-las inclinando-se a lâmina na vertical, para que a mesma seja expulsa para a periferia da lamínula. Também se pode tentar a remoção fazendo suave pressão na lamínula para direcionar as bolhas para a periferia. Caso haja formação de grandes bolhas de ar, que ocupam porção significativa do espaço e não possam ser removidas pelos processos anteriores, pode-se aplicar mais meio de montagem na periferia da lamínula. Este processo faz com que o meio de montagem preencha a bolha por capilaridade. Caso nenhuma destas medidas tenha êxito, deve-se remover a lamínula e realizar o processo original de montagem novamente, observando-se ainda se a amostra foi adequadamente seca (Maat et al., 2006). Cada lâmina foi identificada e armazenada em posição horizontal até a secagem completa do meio de montagem.

Para comparação entre cortes longitudinais e transversais, o mesmo processo foi realizado com todos os remanescentes das raízes dentárias, porém desta vez executando um corte longitudinal (do ápice ao limite cervical). Cada lâmina foi identificada da mesma maneira, acrescentando-se o sufixo L (longitudinal) para comparação posterior.

4.2.4 Registro e classificação das imagens

As lâminas foram observadas num microscópio com opção de polarização. Nesta fase, 24 lâminas, cada uma correspondente a um dente, de 17 indivíduos, foram excluídas da amostra pelos seguintes motivos: ausência de LC contáveis, presença de muitos artefatos de técnica que inviabilizam a contagem, presença de

cemento celular, fraturas e rachaduras de cemento (Figura 4.4). Os envelopes correspondentes às lâminas destes indivíduos também foram desconsiderados. Assim, restaram 31 lâminas, de 25 indivíduos.

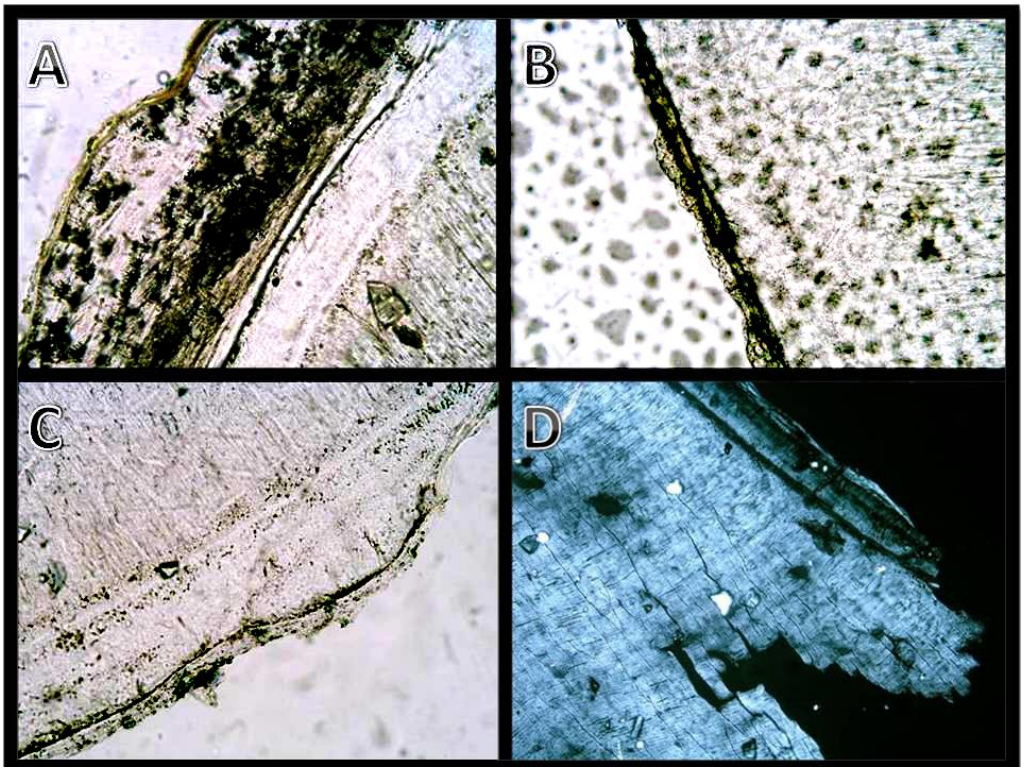

Figura 4.4 – Critérios para exclusão de imagens: presença de cemento celular (A), artefatos de técnica que inviabilizem a análise (B), ausência de LC contáveis e fratura de cemento(D)

A maior parte das lâminas cortadas no sentido longitudinal apresentou poucas ou nenhuma LC contável, ou cemento celular. Foram excluídas da amostra por não permitirem comparação adequada.

O restante das lâminas que apresentaram imagens adequadas para análise foi fotomicrografado com uma câmera digital com 5 megapixels de resolução. As imagens foram feitas nas regiões que apresentavam o máximo de LC visíveis, sendo salvas em formato JPEG.

Para avaliar a interferência que a qualidade das imagens pode ter sobre eventuais erros na contagem, as imagens foram classificadas numa escala de 1 a 3 (Figura 4.5), quanto à qualidade das LC observadas:

1) Qualidade baixa, com contraste baixo, muitos artefatos de técnica e aspecto irregular das LC.

2) Qualidade moderada, com contraste adequado, artefatos de técnica pontuais na imagem e linhas regulares.

3) Qualidade desejada, com quase nenhum artefato, bom contraste, LC regulares e bem definidas.

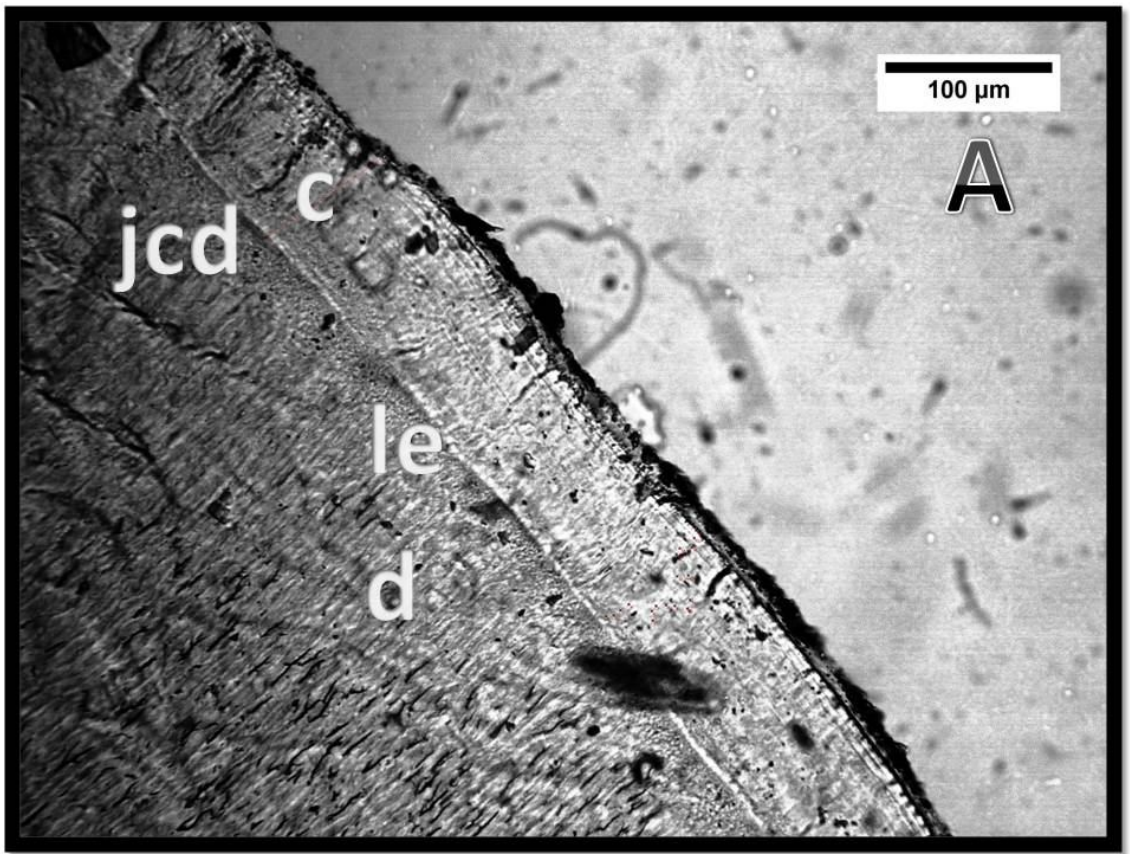

Figura 4.5a – Imagem nota 1. Cemento: (c), dentina (d), junção cementodentinária (jcd) e linha de erupção (le). Indivíduo 23, idade real 28,3 anos, idade estimada 29,5 anos

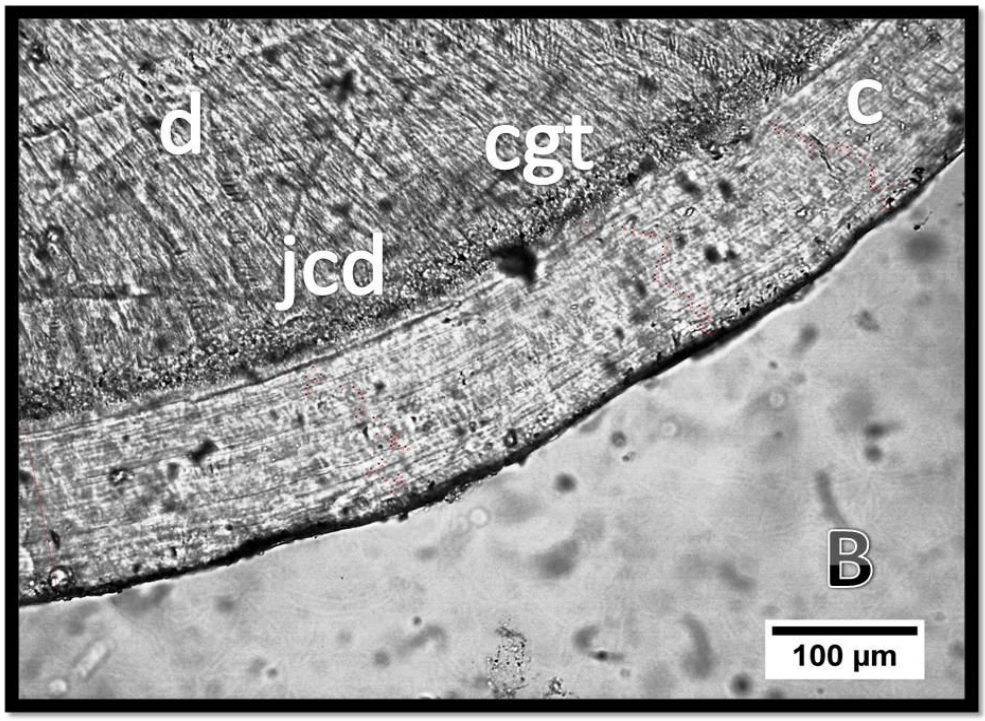

Figura 4.5b – Imagem nota 2. Cemento: (c), dentina (d), junção cementodentinária (jcd) e camada granular de Tomes (cgt). Indivíduo 18, idade real 62 anos, idade estimada 40,5 anos

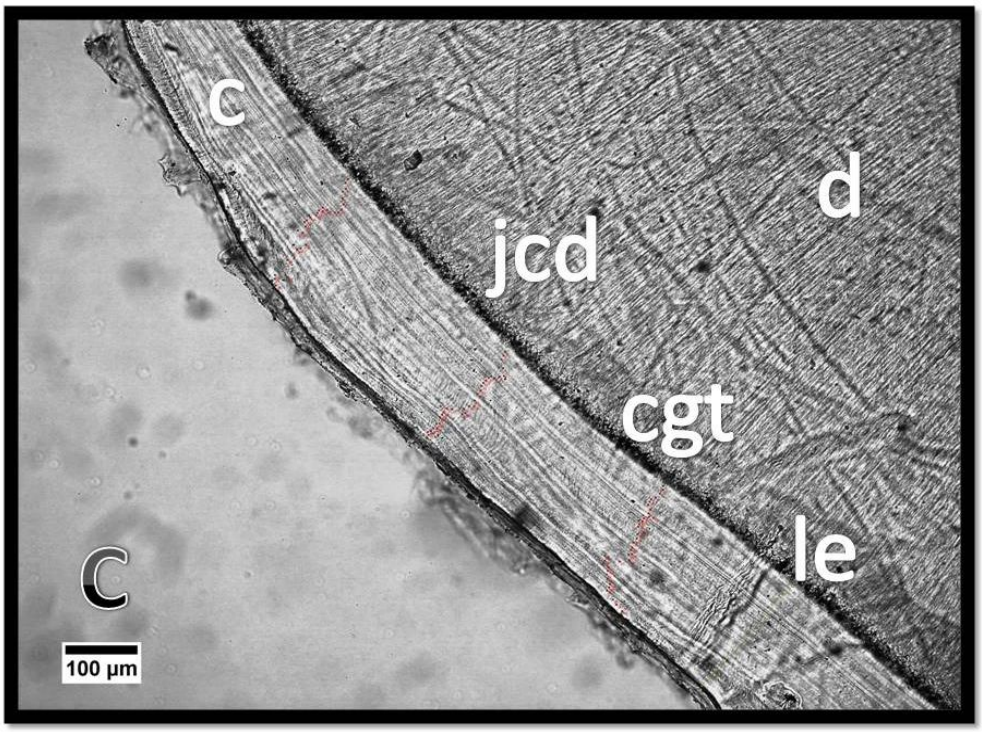

Figura 4.5c – Imagem nota 3. Cemento: (c), dentina (d), junção cementodentinária (jcd) e camada granular de Tomes (cgt). Indivíduo 2, idade real 77,3 anos, idade estimada 39,1 anos

4.2.5 Protocolo para análise de imagens

As LC foram realçadas no software Image J 1.43s, seguindo os procedimentos:

1) Conversão da imagem para preto e branco

2) Aumento de contraste com normalização e equalização de histograma (funções executadas automaticamente pelo software, sem ajustes manuais dos observadores)

Foram consideradas para contagem as LC escuras à microscopia óptica, que foram contadas na direção da junção cementodentinária até a superfície externa do cemento. A referência para iniciar a contagem foi a “linha de erupção”, a primeira LC clara e mais espessa localizada mais próxima à junção cementodentinária. Esta LC é tida como a primeira camada de cemento formada após a erupção dentária (Kagerer; Grupe, 2001). Quando a qualidade da imagem não permitia identificar a linha de erupção, iniciou-se a contagem pela primeira LC escura após a camada granular de Tomes (de aparência escura à microscopia óptica).

A melhor imagem de cada lâmina foi escolhida para a contagem. Foram feitas três contagens na mesma imagem, em regiões distintas que apresentassem visualização do maior número possível de LC. Para esta etapa, a ferramenta de pontos múltiplos do software foi selecionada, e cada LC escura reconhecida foi marcada e sua numeração correspondente ficou registrada na imagem, que foi salva. Foi considerada como contagem final a média entre as três contagens. As lâminas foram fotografadas nos mesmos locais, em microscopia óptica e polarizada.

Para as medidas de espessura do cemento nas imagens digitais, a conversão de pixels para µm foram feitas seguindo a escala fornecida pelo fabricante do microscópio e da câmera. De acordo com a escala, uma imagem vista em aumento de 10 x, com fator de aumento 1 ou 2, tem o lado maior da fotografia digital de aproximadamente 1300 ou 650 µm, aproximadamente. Foram feitas cinco medições da junção cementodentinária até a superfície externa, sendo a média entre elas considerada a espessura do cemento para aquela lâmina.

As contagens foram feitas de acordo com Kagerer e Grupe (2001): um examinador fez as contagens em todas as imagens, que foram confrontadas com as contagens feitas por outros dois membros independentes do grupo de pesquisa (observadores-controle), em cego. Após calibração, cinco imagens foram contadas duas vezes pelo observador e os observadores-controle, com 03 dias de intervalo entre uma contagem e outra. A variação intraobservador foi medida aplicando-se o teste de correlação intraclasse dos resultados obtidos entre as duas contagens para cada observador.

Os dois observadores-controle contaram as mesmas imagens usadas para as estimativas, simultânea e independentemente do observador. Com isso se objetivou avaliar a subjetividade das contagens, avaliando o número de LC escuras visualizadas para as mesmas imagens. A variação interobservador foi medida pela aplicação do teste de correlação intraclasse entre os resultados dos três observadores.

4.2.6 Tabela de cronologia de erupção dentária

Os escores das contagens foram adicionados à idade máxima de erupção dentária específica para a região geográfica da pesquisa, São Paulo (Marques et al., 1978). A tabela de Marques (Tabela 4.1) apresenta as idades mínimas e máximas de erupção dentária, de acordo com gênero, arcada dentária e tipo de dente. A idade de erupção dos terceiros molares não consta na tabela, de maneira que a adição das idades de erupção destes dentes (Logan; Kronfeld, 1933) constitui uma adaptação.

Tabela 4.1 – Tabela de Marques (1978) adaptada. Idades mínimas e máximas de erupção dentária em anos. I1: incisivo central; I2: incisivo lateral; C: canino; P1: primeiro premolar; P2: segundo premolar; M1: primeiro molar; M2: segundo molar; M3: terceiro molar

		Masculino		**Feminino**	
Arco	**Dente**	**mín.**	**máx.**	**mín.**	**máx.**
Superior	I1	7	7,5	6,5	7
	I2	8	8,5	7,5	8,5
	C	11,5	12	10,5	11
	P1	9,5	10	9	9,5
	P2	10,5	11	10	10,5
	M1	6	6,5	6	6,5
	M2	12	12,5	12	12,5
	M3	17	21	17	21
Inferior	I1	6	6,5	5,5	6
	I2	7	7,5	6,5	7,5
	C	10	10,5	9	9,5
	P1	9,5	10,5	9,5	10,5
	P2	11	12	10,5	11
	M1	6	6,5	5,5	6,5
	M2	11,5	12	11	11,5
	M3	17	21	17	21

Como os intervalos para erupção dentária nesta tabela são curtos (variando entre seis meses a um ano), adicionou-se a idade máxima de erupção dentária por razões práticas. Assim, os erros nas estimativas de idade ocasionados por variação na época de erupção dentária sempre compreenderão entre seis meses a um ano a menos, de acordo com a tabela. A única exceção são os terceiros molares, onde se considerará um intervalo de até quatro anos a menos. As idades reais em anos foram calculadas dividindo-se o total de meses de vida do indivíduo por 12.

As estimativas e as espessuras médias para as imagens analisadas foram registradas e confrontadas com o conteúdo dos envelopes. O conjunto das lâminas, imagens e questionários para cada doador foi reunido e um código numérico foi atribuído a cada indivíduo. A correlação entre as estimativas de idade e a idade real foram medidas pelo coeficiente de correlação de Pearson.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Dentre os 25 indivíduos que doaram dentes analisados na pesquisa, oito são do sexo masculino e 17 são do sexo feminino. As idades da amostra variam entre 17 a 77 anos, com uma idade média de 44,2 anos. As proporções entre gênero, faixa etária e sua distribuição são representadas no quadro 5.1 e no gráfico 5.1.

Faixa etária	Masculino	%	Feminino	%	Ambos	%
17 - 30	1	4	8	32	9	36
31 - 40	2	8	2	8	4	16
41 - 50	1	4	1	4	2	8
51 - 60	1	4	4	16	5	20
61 - 70	1	4	2	8	3	12
71 - 80	2	8	0	0	2	8
Total	**8**	**32**	**17**	**68**	**25**	**100**

Quadro 5.1 – Divisão da amostra por faixas etárias, número de indivíduos e porcentagens correspondentes

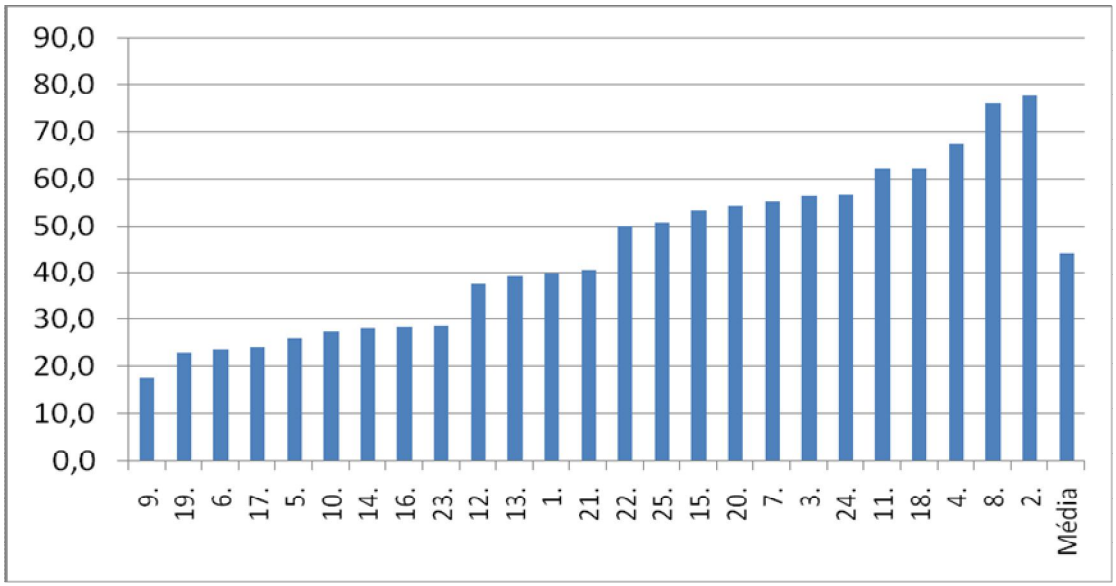

Gráfico 5.1 – Distribuição da amostra de acordo com número do indivíduo (eixo x) e idade real em anos (eixo y)

Os 25 indivíduos doaram 31 dentes, sendo 19 superiores e 12 inferiores. Dentes molares são a maioria (n=14), seguidos por premolares (n=7) e caninos (n=6). A maior parte dos dentes foi extraída por destruição profunda causada por cárie (n=13) e perda irreversível de inserção periodontal (n=12). O número, tipo e porcentagem correspondente para cada dente é representado no quadro 5.2.

superior	N	%
I1	1	3,2
I2	1	3,2
C	3	9,7
P1	3	9,7
P2	2	6,5
M1	3	9,7
M2	2	6,5
M3	4	12,9
Total	**19**	**61,3**

inferior	n	%
I1	1	3,2
I2	1	3,2
C	3	9,7
P1	1	3,2
P2	1	3,2
M1	1	3,2
M2	1	3,2
M3	3	9,7
Total	**12**	**38,7**

Motivo	n	%
a	13	41,9
b	12	38,7
c	3	9,7
d	2	6,5
e	1	3,2
Total	**31**	100

Quadro 5.2 – Distribuição da amostra de acordo com grupo dentário e motivo de extração: destruição profunda causada por cárie (a), perda irreversível de inserção periodontal (b), destruição causada por cárie associada a periapicopatias (c), impactação (d) e indicação ortodôntica, com dente hígido (e). I1: incisivo central; I2: incisivo lateral; C: canino; P1: primeiro premolar; P2: segundo premolar; M1: primeiro molar; M2: segundo molar; M3: terceiro molar

Houve quatro casos de extrações múltiplas, onde foram obtidos 10 dentes. O indivíduo 02 doou quatro dentes perdidos por problemas periodontais, enquanto os indivíduos 01, 03 e 05 doaram dois dentes cada (Quadro 5.3).

Indivíduo	**Dentes doados**	**Dentes**	**Motivo**
1	2	25, 14	a
2	4	33, 32, 31,43	b
3	2	22, 23	b
5	2	46, 47	c
Total	**10**		

Quadro 5.3 – Extrações múltiplas e motivos: destruição profunda causada por cárie (a), perda irreversível de inserção periodontal (b), destruição causada por cárie associada a periapicopatias (c). Numeração dos dentes de acordo com a ISO 3950 da FDI World Dental Association

5.2 CONFRONTO ENTRE ESTIMATIVAS E IDADE REAL

5.2.1 Variação intraobservador

Os resultados para variação intraobservador, em número médio de LC contadas, são apresentados na tabela 5.1. A replicabilidade das contagens para uma mesma imagem foi considerada excelente para os três observadores, de acordo com o teste de correlação intraclasse (Fleiss, 1986).

Tabela 5.1 – Variação intraobservador para duas contagens de cinco imagens diferentes, sendo uma delas nota 1 e as quatro restantes nota 2. O: observador; OCA: observador-controle A; OCB: observador controle B; c: coeficiente de correlação intraclasse, considerado do excelente para os valores encontrados, de acordo com Fleiss (1986)

O1	O2	OCA1	OCA2	OCB1	OCB2
31	34	36,6	37	36,3	35,3
31,3	32	31	32	36	34
28,6	27,3	26,6	27,6	33	32,3
37	32,6	40,6	40,3	43,6	53,6
23,6	23,3	27,6	26,6	29,6	32
c= 0.89		**c= 0.98**		**c= 0.83**	

5.2.2 Estimativas de idade e idade real

As estimativas de idade e idade real e outras informações individuais são mostradas na tabela 5.2. Houve correlação positiva de (r)= 0.59 entre as idades reais e as estimadas, quando consideradas todas as imagens de todos os indivíduos. A diferença entre a média das idades reais e das idades estimadas, denominada neste estudo erro médio, foi de 9,7 anos. As imagens contadas foram as de microscopia óptica convencional, que mostraram diferenciação das LC superior às das imagens polarizadas. Quando a amostra é dividida entre dentes extraídos por qualquer razão que não seja periodontal (n=19) e dentes extraídos por

problemas periodontais (n=12), a correlação aumenta para o primeiro grupo (r)=0.74 e o erro médio cai para 1,6 anos nas imagens do primeiro grupo. Para o segundo grupo, a correlação cai (r)=0.06, conforme as tabelas 5.3 e 5.4. Para indivíduos acima de 50 anos (n= 13), a correlação entre idade estimada foi de (r)= 0.03, enquanto em indivíduos abaixo de 50 anos (n=12), o valor foi de (r)= 0.51 (Tabela 5.5).

Tabela 5.2 – Resultados divididos por indivíduo, lâmina analisada, imagem selecionada, nota da imagem, motivo de extração, idade real e idade estimada em anos. Motivos para extração: destruição profunda causada por cárie (a), perda irreversível de inserção periodontal (b), destruição causada por cárie associada a periapicopatias (c), impactação (d) e indicação ortodôntica, com dente hígido (e). Coeficiente de correlação de Pearson (r)= 0.59, p<0,001

Indivíduo	Lâmina	Imagem	Nota	Dente	Motivo	Idade real	Idade estimada
1	2	3	2	25	a	40,6	39,1
	11	35	2	14	a	40,6	35,8
2	32	18	2	33	b	77,3	45,8
	33	24	3	32	b	77,3	39,1
	34	34	2	31	b	77,3	41,8
	35	43	1	43	b	77,3	55,5
3	39	52	2	22	b	56,4	33,5
	40	59	2	23	b	56,4	24
4	15	47	1	34	b	67,3	50,5
5	16	54	1	47	c	26,1	24,8
	17	63	2	46	c	26,1	27,1
6	F004	96	1	23	d	23,7	21,3
7	F005	101	1	35	a	55,2	42
8	F002	138	1	11	b	75,8	26,8
9	F003	94	1	48	e	17,6	29,3
10	5	15	1	18	a	27,4	38
11	24	84	2	38	b	62,2	63,3
12	3	5	1	17	a	37,8	43,1
13	28	94	2	24	a	39,3	35,1
14	37	44	1	24	a	28,2	28,1
15	C002	70	1	13	a	53,2	44
16	C003	76	1	43	c	28,5	33,8
17	C009	88	1	38	d	24,3	27,6
18	C004	83	2	26	a	62,1	40,5
19	C005	86	1	18	a	22,9	33,3
20	006c	18	2	14	b	54,2	47
21	19	68	1	16	a	40	25,8
22	8	28	1	23	a	50,8	46,3
23	12	40	1	25	a	28,3	29,5
24	4	7	3	16	b	56,3	45,5
25	1	p1010003	2	27	b	50	43,1
média	-	-	-	-	-	*47,1*	*37,4*

Tabela 5.3 – Estimativas de idade para dentes extraídos por qualquer motivo que não seja periodontal. Coeficiente de correlação de Pearson (r)= 0.74, p<0,001

Indivíduo	Dente	Idade real	Idade estimada
1	25	40,6	39,1
	14	40,6	35,8
5	47	26,1	24,8
	46	26,1	27,1
6	23	23,7	21,3
7	35	55,2	42
9	48	17,6	29,3
10	18	27,4	38
12	17	37,8	43,1
13	24	39,3	35,1
14	24	28,2	28,1
15	13	53,2	44
16	43	28,5	33,8
17	38	24,3	27,6
18	26	62,1	40,5
19	18	22,9	33,3
21	16	40	25,8
22	23	50,8	46,3
23	25	28,3	29,5
média	-	*35,4*	*33,8*

Tabela 5.4 – Estimativas de idade para dentes com extraídos por perda irreversível de inserção periodontal. Coeficiente de correlação de Pearson (r)= 0.06

Indivíduo	Dente	Idade real	Idade estimada
2	33	77,3	45,8
	32	77,3	39,1
	31	77,3	41,8
	43	77,3	55,5
3	22	56,4	33,5
	23	56,4	24
4	34	67,3	50,5
8	11	75,8	26,8
11	38	62,2	63,3
20	14	54,2	47
24	16	56,3	45,5
25	27	50	43,1
média	-	*65,7*	*43,1*

A correlação entre qualidade das imagens, idade estimada e idade real é demonstrada na tabela 5.5, juntamente com a correlação para a amostra dividida em menores e maiores de 50 anos:

Tabela 5.5 – Coeficiente de correlação de Pearson entre idade estimada e idade real, de acordo com qualidade de imagem (esq.) e idade (dir.). As imagens de nota 3 não foram incluídas na tabela devido à sua menor quantidade na amostra (n=2). *p<0,001; **p<0,05

Nota	Imagens	Correlação
1	17	0.79*
2	12	0.59**

Idade (i)	Indivíduos	Correlação
i > 50	13	0.03
i < 50	12	0.51*

5.2.3 Variação interobservador

As contagens feitas pelo observador e observadores-controle, adicionadas às idades máximas de erupção correspondentes são apresentadas na tabela 5.6. A concordância interobservador (O x OCA x OCB), calculada pelo teste de correlação intraclasse (c= 0.70) foi considerada boa (Fleiss, 1986) para os resultados das 31 imagens analisadas.

Tabela 5.6 – Estimativas de idade do observador (O) e observadores-controle (OCA e OCB), em anos.

Indivíduo	Idade real	O	OCA	OCB	Indivíduo	Idade real	O	OCA	OCB
1	40,6	39,1	37,1	43,5	*11*	62,2	63,3	42,3	70,3
	40,6	35,8	35,8	37,1	*12*	37,8	43,1	45,8	44,1
2	77,3	45,8	41,8	48,1	*13*	39,3	35,1	35,1	35,1
	77,3	39,1	26,8	40,1	*14*	28,2	28,1	27,5	26,8
	77,3	41,8	41,8	36,1	*15*	53,2	44	34	57
	77,3	55,5	52,5	63,5	*16*	28,5	33,8	44,1	44,8
3	56,4	33,5	36,1	38,5	*17*	24,3	27,6	31	29
	56,4	24	30,6	26	*18*	62,1	40,5	30,5	41,5
4	67,3	50,5	48,8	57,5	*19*	22,9	33,3	33	40,3
5	26,1	24,8	27,1	32,1	*20*	54,2	47	50	53,6
	26,1	27,1	27,5	31,1	*21*	40,0	25,8	28,8	29,8
6	23,7	21,3	36	47	*22*	50,8	46,3	42,6	57
7	55,2	42	47,6	47,3	*23*	28,3	29,5	35,5	37,5
8	75,8	26,8	27,5	30,1	*24*	56,3	45,5	42,5	51,1
9	17,6	29,3	32,6	36,3	25	50,0	43,1	43,1	45,1
10	27,4	38	39,6	41,6	**média**	**47,1**	**37,4**	**37,3**	**42,5**

As diferenças das médias das idades estimadas por cada observador, em anos, foram de 0,1 ano para O x OCA, 5,1 anos para O x OCB e 5,2 anos para OCA x OCB. O erro médio (diferença entre média das idades reais e média das idades estimadas) e a correlação entre idade real e idades estimadas para O, OCA e OCB também são mostradas na tabela 5.7:

Tabela 5.7 – Erro médio, em anos, e coeficiente de correlação de Pearson, em relação à média das idades reais. *p<0,001; **p<0,05

	O	**OCA**	**OCB**
erro médio (anos)	9,7	9,8	4,6
correlação	0.59*	0.33	0.39**

Tabela 5.8 – Replicabilidade (c) entre as contagens do observador e observadores-controle, consideradas médias a boas. *p<0,001; **p= 0,01; ¤: replicabilidade considerada excelente; DEM: diferença entre idades médias estimadas, em anos.

	Toda amostra			**Não perio**			**Perio**		
	O x OCA	**O x OCB**	**OCA x OCB**	**O x OCA**	**O x OCB**	**OCA x OCB**	**O x OCA**	**O x OCB**	**OCA x OCB**
c*	0.71	0.72	0.64	0.60	0.46**	0.58	0.75 ¤	0.93 ¤	0.66
DEM	0,1	5,1	5,2	1,5	6,3	4,8	2,7	3,7	6,4

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE ESPESSURA DE CEMENTO E IDADE REAL

Os valores de espessura média de cemento e idade para cada indivíduo são apresentados na tabela 5.9: A correlação para toda a amostra foi de (r)= 0.69, p<0,001 (r)= 0.25 para dentes comprometidos periodontalmente e (r)= 0.75, p<0,001 para dentes sem problemas periodontais

Tabela 5.9 – Espessura média em µm e idade em anos, para dentes extraídos por motivos periodontais (esq.) e motivos não periodontais (dir.)

Indivíduo não perio	Idade real	Espessura
1	40,6	111,7
	40,6	100,0
5	26,1	57,5
	26,1	70,0
6	23,7	65,9
7	55,2	124,9
9	17,6	60,9
10	27,4	48,9
12	37,8	94,1
13	39,3	129,2
14	28,2	57,5
15	53,2	175,5
16	28,5	110,9
17	24,3	65,7
18	62,1	180,2
19	22,9	152,6
21	40,0	82,4
22	50,8	175,6
23	28,3	84,7

Indivíduo perio	Idade real	Espessura
2	77,3	144,2
	77,3	114,1
	77,3	122,6
	77,3	202,0
3	56,4	103,6
	56,4	120,9
4	67,3	219,0
8	75,8	138,0
11	62,2	191,2
20	54,2	113,0
24	56,3	153,7
25	50,0	123,1

As espessuras médias de cemento e idade real, para todos os dentes, para dentes extraídos por motivos não periodontais e para dentes extraídos por motivos exclusivamente periodontais são apresentadas nos gráficos de regressão linear 5.2, 5.3 e 5.4, respectivamente:

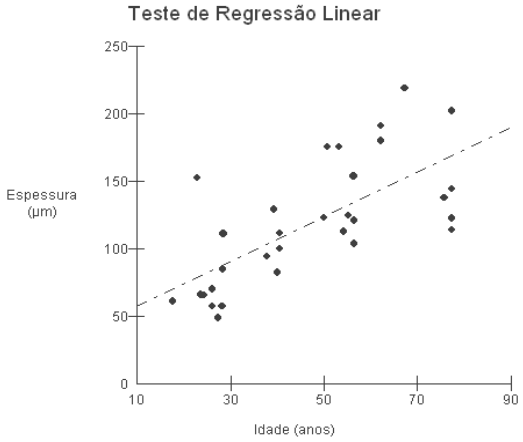

Gráfico 5.2 – Espessuras de cemento e idade real, para todas as imagens (n=31) analisadas. Coeficiente de correlação de Pearson (r)= 0.69, p<0,001

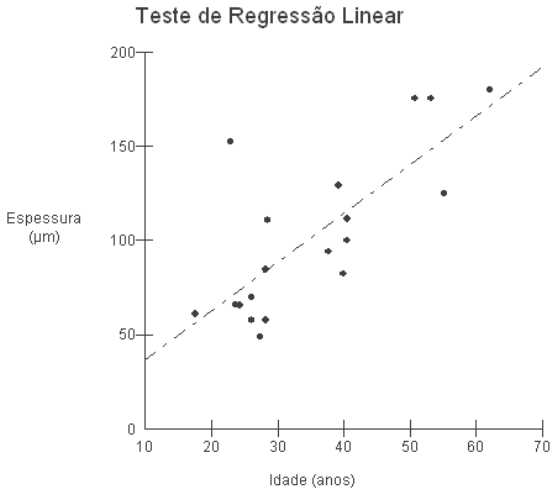

Gráfico 5.2 – Espessuras de cemento e idade real, para as imagens de dentes extraídos por motivos não periodontais (n=19). Coeficiente de correlação de Pearson (r)= 0.75, p<0,001

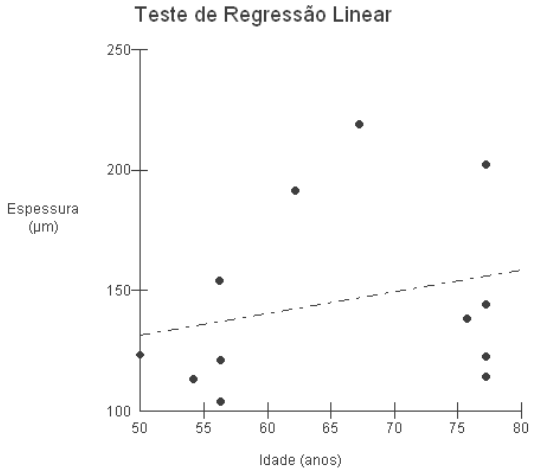

Gráfico 5.3 – Espessuras de cemento e idade real, para as imagens de dentes extraídos por motivos periodontais (n=12). Coeficiente de correlação de Pearson (r)= 0.25

6 DISCUSSÃO

A técnica das LC, quando aplicada em cortes histológicos desmineralizados e corados com substâncias de uso na rotina histológica, pode gerar custos elevados e procedimentos laboratoriais complexos, de difícil execução em serviços de odontologia forense que não estejam equipados e treinados para este tipo de preparação. Embora alguns autores tenham alcançado resultados melhores com o uso de cortes desmineralizados e corados (Charles et al., 1986; Condon et al., 1986; Lipsinic et al., 1986; Kvaal; Solheim, 1995), a relação custo-benefício entre procedimentos para preparo e resultados para lâminas mineralizadas foi vantajosa e escolhida para este estudo, assim como para boa parte dos estudos consultados (Stott et al., 1982; Cipriano, 2001; Jankauskas et al., 2001; Kagerer; Grupe, 2001; Maat et al., 2001; Maat et al., 2006; Wedel, 2007; Aggarwal et al., 2008). Mesmo quando não haja cortadora de precisão disponível, os cortes podem ser feitos com serras “tico-tico” e depois desgastados, de acordo com a técnica modificada de Frost (Maat et al., 2006), embora o manuseio de dentes incluídos, de menor dimensão, possa dificultar o processo.

Os materiais usados no preparo são facilmente encontrados em lojas de suprimentos laboratoriais, odontológicos ou mesmo em lojas de materiais de construção (no caso das lixas d água), a custos muito acessíveis. Entretanto, é necessário treinamento antes da aplicação da técnica em casos forenses ou arqueológicos, dada a fragilidade das secções e risco de rasgamentos e fraturas. Todas as etapas manuais, desde a seleção dos dentes à montagem da lâmina, são minuciosas e erros podem ocasionar lâminas sem anéis visíveis ou com artefatos de técnica. Como reflexo desta condição, observa-se o grande número de lâminas

rejeitadas (n=24) neste e em outros trabalhos (Wittwer-Backofen et al., 2004; Wedel, 2007). Os resultados com menor correlação relatados na literatura (Lipsinic et al., 1986; Lucas; Loh, 1986; Miller et al., 1988; Renz; Radlanski, 2006) são em parte explicados por fatores histotécnicos, que podem ter influência direta sobre a acurácia das estimativas de idade (Wittwer-Backofen et al., 2004; Maat et al., 2006).

Os cortes, iniciados no limite entre terços cervical e médio, causam o descarte de todo remanescente radicular cervical. Caso o primeiro corte não seja satisfatório, a cada avanço da cortadora em direção apical, as chances de se obter cortes com cemento celular aumentam (Ten Cate, 2001). Este fato pode ter contribuído para que as lâminas longitudinais não tenham exibido LC adequadas para contagem, já que não exibiram os terços médio e cervical em sua totalidade. Se os cortes fossem feitos em direção apicocervical, as chances de se encontrar cemento celular seriam menores. Além disso, o remanescente radicular apical poderia ser utilizado em outras técnicas de estimativa de idade, como as de Solheim (1990) e Gustafson (1950).

Mesmo em casos onde não haja presença de cementócitos na lâmina, é preciso cautela para não analisar equivocadamente áreas de cemento celular secundário misto, que apresenta LC bem definidas, mas que não são adequadas para análise por exibirem grande número de LC que resultam em superestimativas de idade (Figura 6.1).

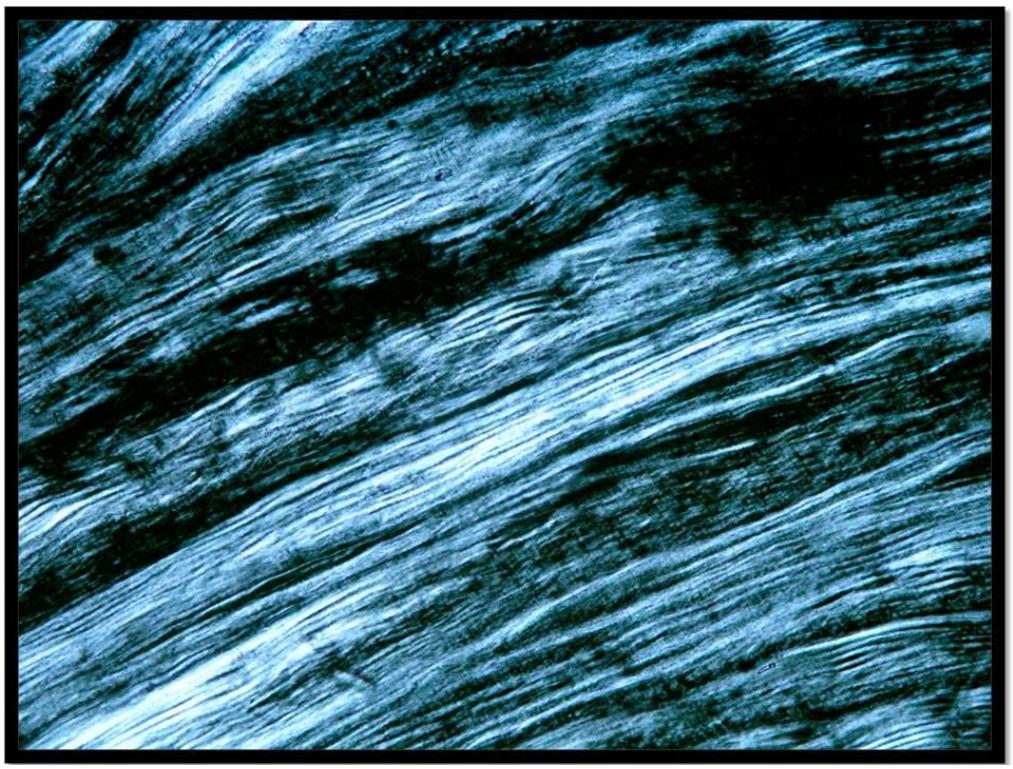

Figura 6.1 – Cemento secundário celular misto, com muitas LC organizadas, em luz polarizada. Fotomicrografia feita no mesmo aumento (20x) das lâminas analisadas. Notar a espessa camada de cemento e as numerosas LC que ocasionariam em estimativas de idade inadequadas

A observação das lâminas em microscopia polarizada não mostrou boa diferenciação entre as LC, ao contrário de outros estudos (Lieberman, 1994; Wedel, 2007; Aggarwal et al, 2008; Kasetty et al., 2010). De acordo com Lieberman (1994), as causas primárias para a formação das LC são duas: variação na direção e quantidade das fibras colágenas (que são birrefringentes à luz polarizada) da matriz orgânica do cemento e mineralização relativa das fibras. Foram observadas regiões amplas, que abrangiam muitas LC, que ora se apresentavam claras à luz polarizada, ora escuras. Este fenômeno foi observado (Figura 6.2) em lâminas de indivíduos com e sem ocorrência de eventos sistêmicos que poderiam alterar a qualidade das LC formadas. A imprecisão em datar estas áreas adequadamente e correlacioná-las

com eventos *in vivo* (como demonstrado em Kagerer e Grupe (2001)) fez com que esta análise não fosse conduzida neste trabalho.

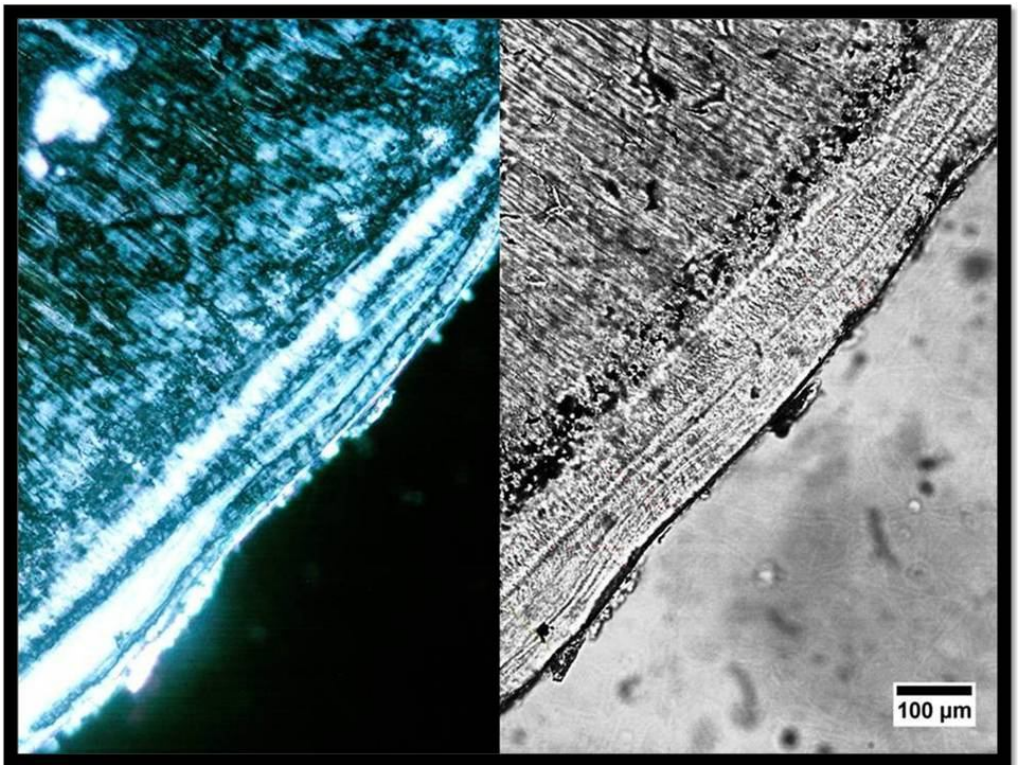

Figura 6.2 – Lâmina 006 (indivíduo 20, sem relato de eventos sistêmicos; dente perdido por motivos periodontais. Idade real 54,2 anos; Idade estimada 47 anos). A visualização em microscopia polarizada (esq.) mostra regiões claras que poderiam ser interpretadas como regiões com mudança na direção das fibras colágenas ou variação na mineralização relativa, mas que não refletem necessariamente eventos de envolvimento sistêmico. Na imagem pós aplicação do protocolo (dir.), feita no mesmo lugar, em microscopia óptica, nota-se melhor diferenciação entre as LC. As LC mais espessas também poderiam ser interpretadas erroneamente como eventos sistêmicos, em caso de indivíduo de histórico desconhecido

As dificuldades nas contagens foram as mesmas de Kasetty et. al (2010): variação de espessura das LC, falta de nitidez, sobreposição da mesma linha em planos diferentes que pode ser interpretada como duas linhas, falta de definição da junção cementodentinária e reabsorções de cemento que diminuem a espessura do cemento. Em alguns casos, discretas mudanças nos tons alternantes de cinza, realçadas pelo protocolo de análise de imagens, foram o critério usado pelos observadores para a contagem de um determinado anel. Apesar da correlação

positiva encontrada entre LC e idade estimada, estas dificuldades podem ter contribuído para que o coeficiente de correlação não tenha sido maior. Por melhor calibrado que um observador esteja, o componente subjetivo sempre estará presente nas contagens, mesmo nas lâminas com qualidade superior.

A escolha do modelo de análise 1 lâmina, 1 observador e 1 contagem pode ser até 799% menos eficiente que o modelo 8 lâminas, 1 observador e 1 contagem (Charles et al., 1986), ainda que para lâminas desmineralizadas e coradas, considerando variações de contagem não relacionadas com idade real. Todavia, preparar mais lâminas não significa que necessariamente secções com LC bem diferenciadas serão obtidas, além de consumir mais tempo (aproximadamente quatro horas para a preparação e análise de um único dente, de acordo com os autores e com a prática adquirida neste trabalho) e recursos. De acordo com os mesmos autores, um aumento de eficiência de 215% pode ser alcançado caso o modelo adotado seja 2 lâminas, 2 observadores e 2 contagens. Se neste estudo foi usado o modelo menos eficiente, e ainda assim foi encontrada correlação positiva entre LC e idade real, acredita-se que melhoras significativas possam ser alcançadas aumentando-se o número de lâminas, observadores e contagens.

Os resultados para a variação intraobservador demonstram que a replicabilidade das contagens é excelente (c variando entre 0.83 a 0.98) para o observador e para os observadores-controle, de acordo com Fleiss (1986). Logo, os resultados sugerem que as diferenças entre contagens feitas na mesma imagem, pelo mesmo observador, em ocasiões diferentes não tiveram influência significativa nos erros encontrados, como relatado também por outros autores (Naylor et al., 1985; Charles et al., 1986; Jankauskas et al., 2001).

Os resultados para a variação interobservador demonstram uma influência significativa da subjetividade das contagens, com as diferenças das médias das idades estimadas pelos observadores variando entre 5,2 a 5,3 anos para toda a amostra, 2,7 a 6,4 anos para os indivíduos com problemas periodontais e 1,5 a 6,3 anos para os indivíduos sem problemas periodontais. Mesmo assim, o coeficiente de correlação intraclasse calculado para as contagens variou entre 0.46 a 0.93, resultados considerados médios/bons a excelentes (Fleiss, 1986), demonstrando concordância adequada entre os observadores.

Para os erros médios de todos os observadores, a variação foi de 4,6 a 9,7 anos para toda a amostra, com coeficientes de correlação de Pearson variando entre 0.33 a 0.59, com $p<0,001$. Estes resultados, em associação com os coeficientes de correlação intraclasse encontrados, sugerem que as contagens feitas pelo observador e observadores-controle, variam significativamente em relação à idade real, mas que esta variação não é predominantemente devida à inconsistências entre os observadores.

Quando a amostra é dividida em imagens de nota 1 e nota 2 (excluiu-se as imagens de nota 3 por seu número (n=2) reduzido), ao contrário do esperado, os resultados demonstram que a correlação menos positiva entre idade estimada e idade real se dá para as imagens de melhor qualidade ((r)= 0.59), e não para as de pior qualidade ((r)= 0.79). Assim, a qualidade das imagens não pode ser considerada um critério definitivo para explicar estimativas de idade imprecisas. Um achado semelhante também foi reportado por Wittwer-Backofen et al. (2004).

Aparentemente, os problemas periodontais são a maior fonte de erro entre idade estimada e idade real. A correlação para toda a amostra ((r)= 0.59, $p<0,001$) aumenta quando se exclui os dentes com problemas periodontais ((r)= 0.74;

p<0,001) e cai sensivelmente quando se analisa somente os dentes com problemas periodontais ((r)= 0.03). O mesmo acontece com o erro médio, de 9,7 anos para toda a amostra, 1,6 anos para os dentes sem problemas periodontais e 22,6 anos para os dentes com problemas periodontais. Estes achados concordam com outros estudos (Condon et al., 1986; Kagerer; Grupe, 2001), mas ao se analisar a idade real dos indivíduos com problemas periodontais (n=12), nota-se que todos têm 50 anos ou mais. Este fato, aliado ao decréscimo de acurácia da técnica com o aumento da idade, conforme relatado por outros estudos (Lipsinic et al., 1986; Miller et al., 1988; Stein; Corcoran, 1994; Bojarun et al., 2003; Pilloud, 2004; Obertová; Francken, 2009), pode ter contribuído para o erro médio extremamente alto encontrado. Além disso, eventuais tratamentos periodontais podem ter causado remoção de LC (Moreinos, 1975), causando estimativas de idade muito imprecisas.

As alterações patológicas do cemento na periodontite podem ajudar a explicar os resultados para o grupo com periodontite. Na periodontite, o arranjo espacial das fibras colágenas pode ser alterado (Yamamoto et al., 1966; Barton; Van Swol, 1987) e a destruição das mesmas pode ocasionar em cemento menos espesso (Selvig, 1966; Sottosanti; Garret, 1975) e, consequentemente, com menos LC (Kagerer; Grupe, 2001).

Os indivíduos 11, 20 e 25 são os que tiveram suas estimativas de idade mais próximas da real, dentre os 12 analisados. Talvez nestes casos, a seleção de áreas radiculares sem tártaro evidente possa ter ocasionado na análise de uma superfície menos afetada por periodontite, ou até mesmo saudável. A presença de cemento normal, mesmo em áreas com alterações patológicas também não é descartada, conforme Jones (1972). Já os indivíduos 2, 3 e 8 (77,3, 56,4, e 75,8 anos, respectivamente), além de portadores de periodontite, com mais de 50 anos, sujeitos

às alterações supracitadas, também são diabéticos, o que pode ocasionar em menor espessura de cemento e possivelmente menos LC (Gokhan et al., 2004). As estimativas para estes indivíduos foram extremamente imprecisas, com até 49 anos de diferença.

Para os valores de espessura do cemento, também nota-se pouca correlação ((r)= 0.25) com a idade real, para os indivíduos portadores de periodontite. A maior parte dos dentes analisados (n=8) apresentou espessura de cemento menor que o esperado (segundo coeficiente de correlação linear) de acordo com o gráfico 5.3. Os indivíduos 2, 3 e 8, diabéticos, tiveram espessuras de cemento menores que o esperado. Estes valores, cinco de um total de oito abaixo do esperado, concordam com os achados de Gokhan et al. (2004).

Para os indivíduos sem problemas periodontais, a distribuição dos valores de espessura está mais próxima da reta com os valores esperados (Gráfico 5.2) e a correlação é maior que no grupo com problemas periodontais ((r)= 0.76, p<0,001). Já para a amostra total, a correlação cai e a distribuição dos valores se torna um pouco mais dispersa. Estes resultados sugerem que há correlação entre espessura de cemento e idade real, assim como há entre LC e idade real, que entretanto pode diminuir a medida que os indivíduos estudados apresentem problemas periodontais, diabetes e idades mais avançadas.

Os dentes dos indivíduos 9, 10 e 19 tiveram suas idades superestimadas em muitos anos em relação à idade real (11,7, 10,6 e 10,4 anos, respectivamente). Este fato não parece ter uma explicação aparente. Todos estes dentes são terceiros molares, sendo que o do indivíduo nove foi extraído por motivo de impactação. Quando o grupo dos dentes extraídos por motivos não periodontais é analisado sem estes três indivíduos, a correlação de Pearson sobe para (r)= 0.80, p<0,001, o que

reforça ainda mais a hipótese de que dentes sem problemas periodontais podem fornecer estimativas de idade confiáveis pelo método da contagem das LC.

7 CONCLUSÕES

- A estimativa de idade pela contagem das LC pode ser um método confiável para dentes sem alterações periodontais, com erro médio de -1,6 anos para a amostra estudada.

- Quando se analisa dentes com patologias periodontais, os resultados fornecem subestimativas de idade, com erro médio de -22,6 anos para a amostra analisada.

- A correlação para toda a amostra foi de (r)= 0.58, p<0,001, sendo menor ((r)= 0.06) para dentes com patologias periodontais e maior ((r) = 0.74, p<0,001) para dentes sem patologias periodontais. A precisão da técnica tendeu a baixar com o aumento da idade dos indivíduos analisados.

- A qualidade da imagem, e as variações intra e interobservador não constituíram as maiores fontes de erro.

- Houve correlação entre espessura de cemento e idade real, sendo que a correlação para os mesmos parâmetros, em dentes com problemas periodontais foi menor e, em dentes sem problemas periodontais, foi maior.

REFERÊNCIAS[1]

Aggarwal P, Saxena S, Bansal P. Incremental lines in root cementum of human teeth: An approach to their role in age estimation using polarizing microscopy. Indian J Dent Res. 2008;19(4):326-31.

Armitage GC, Christie TM. Structural changes in exposed human cementum. II Electron microscopic observations. J Periodont Res. 1973 Nov.;8(6):356-65.

Avadhani A, Tupkari J V, Khambati A, Sardar M. Cementum annulations and age determination. J For Dent Sci. 2009 Jul-Dec.;1(2):73-6.

Bang G, Ramm E. Determinations of age in humans from root dentin transparency. Acta Odontol Scand. 1970;28:3-35.

Barton N S, Van Swol R L. Periodontally diseased versus normal roots as evaluated by scanning electron microscopy and electron probe analysis. J Periodont Res. 1987 Sep.;58(9):634-8.

Bojarun R, Garmus A, Jankauskas R. Dantų cemento mikrostruktūra ir individo biologinio amžiaus nustatymas. Medicina. [abstract]. 2003; 39(10):960-4.

Charles DK, Condon K, Cheverud JM, Buikstra JE. Cementum annulation and age determination in *Homo sapiens*. I. Tooth variability and observer error. Am J Phys Anthrop. 1986;71(3):311-20.

Cipriano A. Cold stress in captive great apes recorded in incremental lines of dental cementum. Folia Primatol. 2001;73:21-31.

Condon K, Charles D K, Cheverud, J M, , Buikstra J E. Cementum annulation and age determination in *Homo sapiens*. II. Estimates and accuracy. Am J Phys Anthrop. 1986;71(3):321 - 30.

Czermak A, Czermak A, Ernst H, Grupe G. A new method for the automated age-at-death evaluation by tooth-cementum annulation (TCA). Anthropol Anz. 2006;64(1):25-40.

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Douglas MJW. Dental cement layers as criteria of age for deer in New Zealand with emphasis on red deer, *Cervus elaphus*. NZ J Sci. 1970;13:352-8.

Fleiss J L. The design and analysis of clinical experiments. New York: Wiley; 1986.

Fogl JG, Mosby HS. Aging grey squirrels by cementum annuli in razor sectioned teeth. J Wldlf Mngmt. 1978;42:444-8.

Free S, Sauer PR. Cementum layering in the canine tooth of a 28-year-old captive black bear. New York Fish Game J. 1966;13:233-4.

Frost H M. Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid manual method. Biotech Histochem. 1958;33(6):273-7.

Gasaway WC, Harkness DB, Rausch RA. Accuracy of moose age determinations from incisor cementum layers. J Wldlf Mngmt. 1978;42:558-63.

Gokhan K, Keklikoglu N, Buyukertan M. The comparison of the thickness of the cementum layer in type 2 diabetic and non-diabetic patients. J Contemp Dent Pract. 2004 May 15;5(2):124-33.

Grosskopf B Incremental lines in prehistoric cremated teeth. Z Morpho Anthro. 1989;77:309-11.

Grosskopf B. Individual age determination using growth rings in the cementum of buried human teeth. Z Rechtsmed. 1990;103(5):351-9.

Gustafson G. Age determinatin of teeth. J Am Dent Assoc. 1950;41:45-54.

Jankauskas R, Barakauskas S, Bojarun R. Incremental lines of dental cementum in biological age estimation. Homo. 2001;52(1):59-71.

Jones SJ. The surface of the tooth in periodontal disease. Dent Practit 1972 Aug.;22(12):462-73.

Junqueira LC, J Carneiro. Histologia Básica. 11 ed. Koogan G, editor. Rio de Janeiro2008.

Kagerer P, Grupe G. Age-at-death diagnosis and life-history parameters by incremental lines in human dental cementum as an identification aid. Forensic Sci Int. 2001;118:75-82.

Karadzov O, Sedlecki S, Dukanovic D. La parodontopathie et les changements quantitatifs du cement dentaire. Rev Stomatol Chir Maxillofac. 1981 Jul.;82(3):183-9.

Kasetty S, Rammanohar M, Ragavendra T R. Dental cementum in age estimation: a polarized light and stereomicroscopic study J For Sci. 2010 May;55(3):778-83.

Katchburian E, Arana-Chavez VE. Histologia e Embriologia Oral: Texto, Atlas, Correlações Clínicas. 2 ed. Rio de Janeiro: Panamericana & Guanabara Koogan; 2004.

Kato S, Nakagaki H, Kunisaki H, Sugihara N, Noguchi T, Ito F, Yoshioka I, Weatherell JA, Robinson C. The thickness of the sound and periodontally diseased human cementum. Arch Oral Biol. 1992 Aug;37(8):675-6.

Kay RF, Rasmussen T, Beard C. Cementum annulus counts provide a means for age determination in *Macaca mulatta (Primates, Anthropoidea*). Folia Primatol. 1984;42:85-95.

Klauenberg K, Lagona F. Hidden Markov random field models for TCA image analysis. Comput Stat Data An. 2007;52:855 -8.

Klevezal GA, Kleinenberg SE Age determination of mammals from annual layers in teeth and bones (translated from Russian by J. Salkind, 1969) Springfield: U.S. Department of Commerce, Springfield, VA 22151, 1967, 128 pp.

Kvaal SI, Solheim T, Bjerketvedt D. Evaluation of preparation, staining and microscopic techniques for counting incremental lines in cementum of human teeth. Biotech Histochem. 1996 Jul;71(4):165-72.

Kvaal SI, Solheim, T. Incremental lines in human dental cementum in relation to age. Eur J Oral Sci 1995;103:225-30.

Lamendin H, Baccino E, Humbert JF, Tavernier JC, Nossintchouk RM, Zerilli A A simple technique for age estimation in adult corpses: the two criteria dental method. J Forensic Sci. 1992;37:1373-9.

Laws RM. A new method for age determination on mammals. Nature. 1952 June;169(7):972-3.

Lieberman D E. The biological basis for seasonal increments in dental cementum and their application to archaeological research. J Archaeol Sci. 1994;21:525-39.

Lieberman D E, Deacon T W, Meadow R H. Computer image enhancement and analysis of cementum increments as applied to the teeth of *Gazella gazella*. J Archaeol Sci. 1990;17:519-33.

Linhart SB, Knowlton FF. Determining age of coyotes by tooth cementum layers. J Wldlf Mngmt. 1967;31:362-5.

Lipsinic F E, Paunovich E, Houston D G, Robison S F. Correlation of age and incremental lines in the cementum of human teeth. J Forensic Sci. 1986;31:982-9.

Lockard GR. Further studies of dental annuli for aging white-tailed deer. J Wldlf Mngmt. 1972;36:46-55.

Logan W, Kronfeld R. Development of the human jaws and Surrounding Structures from to the Age of Fifteen Year. J Am Dent Assoc. 1933;20(3):379.

Lucas PW, Loh HS. Are the incremental lines in human cementum laid down annually?. Ann Acad Med Singapore. 1986 Jul;15(3):384-6.

Maat GJR, Gerretsen RRR, Aarents MJ. Improving the visibility of tooth cementum annulations by adjustment of the cutting angle of microscopic sections. Forensic Sci Int. [Short communication]. 2006;159S:S95-S9.

Maat GJR, Van den Bos RPM, Aarents MJ. Manual preparation of ground sections for the microscopy of natural bone tissue: update and modification of Frost's 'rapid manual method'. Int J Osteoarchaeol. 2001;11:366-74.

Marks SA, Erickson AW. Age determination in the black bear. J Wldlf Mngmt. 1966;30(389-410).

Marques GD, Guedes-Pinto AC, Abramowicz M. Estudo da cronologia de erupção dos dentes permanentes em crianças da cidade de São Paulo. Rev Fac Odont S Paulo. 1978;16(2):177-86.

McEwan EH. Seasonal annuli in the cementum of the teeth of barren ground caribou. Canad J Zool. 1963;41:111-3.

Meinl A, Huber CD, Tangl C, Gruber GM, Teschler-Nicola M, Watzek G. Comparison of the validity of three dental methods for the estimation of age at death. Forensic Sci Int. 2008;178:96-105.

Miller CS, Dove SB, Cottone JA. Failure of use of cemental annulations in teeth to determine the age of humans. J Forensic Sci. 1988 Jan;33(1):137-43.

Monson RA., Stone WB, Parks E. Aging red foxes (*Vulpes falva*) by counting the annular cementum rings of their teeth. New York Fish Game J. 1973;20:54-61.

Moreinos M. Contribuição ao estudo da superfície do cemento dentário humano, após raspagem subgengival [Tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense; 1975.

Nakanishi N, Ichinose F, Higa G, Izawa M. Age determination of the Iriomote cat by using cementum annuli. J Zool 2009;279 338-48.

Naylor JW, Miller GW, Stokes GN, Stott GG. Cementum annulation enhancement: a technique for age determination in man. Am J Phys Anthrop. 1985;68:197-200.

Nolla C M. The development of the permanent teeth. J Dent Child. 1960;27:254.

Novakowski MS. Cemental deposition as an age criterion in bison, and the relation of incisor wear, eye-lens weight, and dressed bison carcass weight to age. Canad J Zool 1965;43:173-8.

Obertová Z, Francken M. Tooth cementum annulation method: accuracy and applicability. Front Oral Biol. 2009;13:184-9.

Pilloud S. Can there be age determination on the basis of the dental cementum also in older individuals as a significant context between histological and real age determination. Anthropol Anz. 2004 Jun;62(2):231-9.

Pinchi V, Forestieri AL, Calvitti M. Thickness of the dental (radicular) cementum: a parameter for estimating age. J Forensic Odontostomatol. 2007 Jun;25(1):1-6.

Ransom AB. Determining age of white-tailed deer from layers in cementum of molars. J Wldlf Mngmt. 1966;30:197-9.

Rao N G, Rao N N. CCTV study of cemental annulations in determining the age from a single tooth. Indian J Dent Res. 1998;9:41-5.

Renz H, Radlanski R J. Incremental lines in root cementum of human teeth — A reliable age marker? Homo. 2006;57:29-50.

Renz H, Radlanski RJ, Schaefer V, Duschner H. Incremental lines in root cementum of human teeth: an approach to their ultrastructural nature by microscopy. Adv Dent Res. 1997;11(4):472-7.

Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ, Waite ER, Schütz HW, Kaatsch HJ, Borrman HIM. Age estimation: the state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. Int J Legal Med. 2000;113:129-36.

Roksandic M, Vlak D, Schillaci MA, Voicu D. Technical note: applicability of tooth cementum annulation to an archaeological population. Am J Phys Anthrop. [Technical note]. 2009.

Sauer PR; Free S, Browne S. Age determination in black bears from canine tooth sections. New York Fish Game J. 1966;13:125-39.

Scheffer V B. Growth layers on the teeth of Pinnipedia as an indication of age. Science. 1950;112:309-11.

Selvig KA. Ultrastructural changes in cementum and ajacent conective tissue in periodontal disease. Acta Odontol Scand. 1966 Dec.;24(4):459-500.

Sergeant DE, Pimlott DH. Age determination in moose from sectioned incisor teeth. J Wldlf Mngmt. 1959;23:(315-21).

Solheim T. Dental cementum apposition as an indicator of age. Scand J Dent Res. 1990;98:510-9.

Soomer H, Ranta H, Lincoln M J, Penttilä A, Leibur E. Reliability and validity of eight dental age estimation methods for adults. J For Sci. 2003 Jan;48(1):149-52.

Sottosanti J R, Garret J R. A mannual for root preparation - a scanning electron microscopic study of deseased cementum. J Periodont Res. [Abstract]. 1975 Oct;46(10):628-9.

Sousa E M D, Stott G G, B Alves J. Determination of age from cemental incremental lines for forensic dentistry. Biotech Histochem. 1999;74(4):185-93.

Stein TJ, Corcoran JF. Pararadicular cementum deposition as a criterion for age estimation in human beings. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994 Mar;77(3):266-70.

Stoneberg RP, Jonkel CJ. Age determination of black bears by cementum layers. J Wldlf Mngmt. 1966;30:411-4.

Stott G G, Sis RF, Levy BM. Cemental annulation as an age criterion in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). J Med Primatol. 1980;9:274-85.

Stott G G, Sis RF, Levy BM. Cemental annulation as an age criterion in forensic dentistry. J Dent Res. 1982;61(6):814-7.

Tabor JE, Wright HM. Population status of river otter in Western Oregon. J Wldlf Mngmt. 1977;41:692-99.

Ten Cate R. Oral Histology: Development, Structure and Function. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Wada K, Ohtaishi N, Hachiya N. Determination of age in the Japanese monkey from growth layers in the dental cementum. Primates. 1978;19:775-84.

Wedel V L. Determination of season at death using dental cementum increment analysis. J Forensic Sci. [Technical Note]. 2007;52(6):1334-7.

Wittwer-Backofen U, Buckberry J, Czarnetzki A, Doppler S, Grupe G, Hotz G, Kemkes A, Larsen C S, Prince D, Wahl J, Fabig A, Weise A. Basics in Paleodemography: a comparison of age indicators applied to the early medieval skeletal sample of Lauchheim. Am J Phys Anthrop. 2006;137:384-96.

Wittwer-Backofen U, Gampe J, Vaupel J W. Tooth cementum annulation for age estimation: results from a large known-age validation study. Am J Phys Anthrop. 2004;123:119-29.

Yamamoto H, Sugahara N, Yamada N. Histopathological and microradiographical study of the exposed cementum from periodontally diseased human teeth. Bull Tokio Med Dent Univ. 1966;13:407-21.

Young L L. Scanning electron microscopy of cementum in the pocket area. Presented at the 51th International Association for Dental Research Conference; (J Dent Res 1973: 250).

Zander H A, Hürzeler B. Continuous cementum apposition. J Dent Res. 1958;37:1035-44.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido e questionário

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: Estimativa da idade através dos linhas incrementais de cemento Acelular

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. Rodolfo Francisco Haltenhoff Melani e Paulo Eduardo Miamoto Dias

Instituição/Departamento: Faculdade de Odontologia da USP. Departamento de Odontologia Social. Av. Lineu Prestes, 2227, Cidade Universitária.

Telefone para contato: 11 3091-7891 / 11 3091-7717 / 11 7607-8889

Email para contato: dr.miamoto@gmail.com ou miamoto@usp.br

Local da coleta de dados: Clínica de Cirurgia Bucomaxilofacial da Graduação FOUSP e consultórios partculares

Prezado(a) Senhor(a):

- Você está sendo **convidado(a)** a doar seu dente extraído e responder às perguntas deste questionário de forma totalmente **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa, doar seu dente e responder este questionário é muito importante que você **compreenda** as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder **todas** as suas dúvidas antes que você decida participar.
- Você tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Objetivo do estudo: estudar a estimativa de idade de seres humanos a partir das raízes dos dentes extraídos e ocorrência de eventos como gravidez, doença renal, etc.

Procedimentos: sua participação nesta pesquisa consistirá no preenchimento deste questionário e doação de seu(s) dente(s) extraído(s).

Benefícios. Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre o tema abordado, sem benefício direto para você.

Riscos. O preenchimento deste questionário não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica para você.

Sigilo. As informações fornecidas por você serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

ATENÇÃO:

A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária e o participante terá uma cópia deste TCLE. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva ao Comitê de Ética em Pesquisa da FO-USP - Av. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo SP. Tel.: (11) 3091.3871 Fax: (11) 3091.7842. Ou se comunique com o pesquisador Paulo Eduardo Miamoto Dias, pelo telefone (11) 7607 8889, email dr.miamoto@gmail.com, em horário comercial.

Eu _____ declaro ter lido na integra e entendido os termos e a finalidade da presente pesquisa e aceito participar da mesma,

_____/_____/2008

_____

Assinatura

_____

RG

Questionário – Indivíduo nº_____

1. Identificação

Sexo □ masculino □ feminino

Idade _____ anos

Data de nascimento ____/____/____

2. História médica e odontológica

Para mulheres: você já ficou ou está grávida? □ sim □não

Em caso positivo, quantas vezes você já ficou grávida? _____ veze(s)

Com quantos anos você estava na(s) sua(s) gravidez(es)? ___,___,___,___,__ anos

Você teve ou tem alguma destas alterações ou doenças? Caso positivo marque com um X o campo correspondente, e escreva quantos anos você tinha na época. Caso não se lembre exatamente sua idade, escreva a sua idade aproximada na época.

□ nefrite – Aos ____ anos

□ insuficiência renal – Aos ___ anos

□ raquitismo – Aos ___ anos

□ osteomalácia – Aos ___ anos

□ anemia – Aos ____ anos

□ hipo ou □ hipertiroidismo (problema de tireóide) – Aos __anos

□ hipo ou □ hiperparatiroidismo (problema de paratireóide) – Aos __anos

□ desnutrição – Aos ___ anos

□ osteoporose – Aos ___ anos

□ diabetes – Desde os ___ anos

□ hepatite – Aos ___ anos

□ febre reumática – Aos ___ anos

Você já fez hemodiálise? □ sim □ não

Por quê?_____ Quantos anos você tinha?_____ anos

Você já teve que tomar cálcio como suplemento alimentar? □ sim □ não

Por quê?_____ Quantos anos você tinha?_____ anos

Você toma algum remédio regularmente? □ sim □ não

Por quê? _____ Há quanto tempo?_____ anos

Você já quebrou algum osso? □ sim □ não

Quantas vezes? _____ Quantos anos você tinha? _____ anos

Você já teve que tomar vitamina D como suplemento alimentar? □ sim □ não

Por quê?_____ Quantos anos você tinha?_____ anos

Você já teve ou tem alguma doença infecciosa? □ sim □ não

Qual?_____ Com quantos anos?_____

Você já teve ou tem alguma alteração ou doença que não tenha sido perguntada? □ sim □ não

Qual?_____ Com quantos anos?_____ anos

Você já teve muitos problemas dentários? □ sim □ não

Você tem ou teve algum problema dentário de nascença? □ sim □ não

Qual?_____

3. Hábitos individuais

Você fuma? □ sim □ não Há quanto tempo?_____ anos

Você costuma fazer viagens longas? □ sim □ não Há quanto tempo? __ anos

Você bebe? □ sim □ não Há quanto tempo? _____ anos

Você toma suplementos alimentares? □ sim □ não Qual(is)?_____

Há quanto tempo?___anos

Muito Obrigado por sua colaboração!

PARA USO DO PESQUISADOR (não preencher):

Elemento dentário _____

Motivo da extração:

□ destruição coronária profunda

□ extensa destruição associada a periapicopatias

□ impactação

□ perda irreversível de inserção periodontal

□ lesão endo-perio

□ indicação protética

□ indicação ortodôntica

Extração por via □ alveolar □ não alveolar

Odontosecção? □ sim □ não Osteotomia/ostectomia? □ sim □ não

Hipercementite? □ sim □ não Anquilose? □ sim □ não DTM? □ sim □ não

Tratamentos anteriores? □ sim □ não

Relatar_____

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 279384
Protocolo 118/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Estimativa da idade através dos anéis de cemento acelular**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Paulo Eduardo Miamoto Dias**,** de responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a.) Rodolfo Francisco Haltenhoff Melani.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 22 de outubro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 –Telef./FAX (0XX11) 3091-7887

ANEXO B – Autorização para coleta de dentes na Clínica Odontológica FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

São Paulo, 30 de abril de 2009

A/C Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha

Supervisor Técnico Científico da Clínica Odontológica

Prezado Professor,

Venho através desta, solicitar autorização para que Paulo Eduardo Miamoto Dias, aluno do Programa de Mestrado em Ciências Odontológicas, área de concentração Odontologia Social, RG 43.557.593-4, número USP 6585199, orientado por mim, possa acessar as Clínicas de Cirurgia Bucomaxilofacial da Graduação e Pós-Graduação FO-USP, para o desenvolvimento da pesquisa intitulada "Estimativa da idade através dos anéis de cemento acelular: um estudo em brasileiros", **DESDE QUE APROVADA PELO CEP FO-USP**. A pesquisa objetiva coletar diretamente dos pacientes dentes extraídos por motivos terapêuticos após assinatura de TCLE e preenchimento de questionário. Não serão usados espécimes do banco de dentes FOUSP, pois é necessário haver informações precisas (idade, história médica, etc.) acerca dos doadores para confronto com a análise histológica dos dentes obtidos. Sem mais para o momento, reitero protestos de elevada estima.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Francsisco Haltenhoff Melani
Departamento de Odontologia Social

Autorizado desde que aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP.
São, 10/05/09

Prof. Rodney Garcia Rocha
Superv. de Seção T. Científica
Clínica Odontológica - FOUSP

ANEXO C – Autorização para uso do Laboratório de Microscopia do Departamento de Estomatologia FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Autorização para uso de infra-estrutura e laboratório

Autorizo o aluno do Programa de Mestrado em Ciências Odontológicas, área de concentração Odontologia Social, Paulo Eduardo Miamoto Dias, RG 43.557.593-4, número USP 6585199, orientado pelo Prof. Dr. Rodolfo Francisco Haltenhoff Melani, a utilizar o Laboratório de Microscopia do Departamento de Patologia Bucal da FO-USP, para o desenvolvimento da pesquisa intitulada "Estimativa da idade através dos anéis de cemento acelular: um estudo em brasileiros", contanto que haja disponibilidade de tempo do Laboratório e pessoal autorizado para acompanhar os trabalhos do aluno. O aluno ficará responsável por quaisquer danos causados pelo mesmo às dependências do Laboratório e seus equipamentos.

São Paulo, 07 de maio de 2009.

Profa. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Souza
Professora Titular do Departamento de Estomatologia
Disciplina de Patologia Bucal

ANEXO D – Autorização para uso do Laboratório de Microscopia do Departamento de Mineralogia e Geotectônica IGC USP

GEOCIÊNCIAS

USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS

Departamento de Mineralogia e Geotectônica

Autorização

Autorizo o aluno da Faculdade de Odontologia, Paulo Eduardo Miamoto Dias, nº USP 6585199, orientado do Prof. Dr. Rodolfo Francisco Haltenhoff Melani, do Departamento de Odontologia Social, a usar as dependências do Laboratório de Microscopia Petrográfica para o registro das imagens do trabalho intitulado "Estimativa da idade através dos anéis de cemento", aprovado pelo CEP-FOUSP, parecer 118/2009.

São Paulo, 03 de março de 2010.

Prof. Dr. Gergely A. S. Szabó

Departamento de Mineralogia e Geotectônica

Instituto de Geociências

Universidade de São Paulo