



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA

JULIANA NUNES BOTELHO

**EURO-COLLINS® COMO MEIO DE ESTOCAGEM DE DENTES AVULSIONADOS:
ESTUDO *IN VITRO* DA VIABILIDADE CELULAR**

MARINGÁ
2010

JULIANA NUNES BOTELHO

**EURO-COLLINS® COMO MEIO DE ESTOCAGEM DE DENTES AVULSIONADOS:
ESTUDO *IN VITRO* DA VIABILIDADE CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado.

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Sell

MARINGÁ
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B748e Botelho, Juliana Nunes
Euro-Collins® como meio de estocagem de dentes
avulsionados: estudo *in vitro* da viabilidade celular. /
Juliana Nunes Botelho. -- Maringá, 2010.
84 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador : Prof^a. Dr^a. Mirian Marubayashi Hidalgo.
Co-orientador : Prof^a. Dr^a. Ana Maria Sell.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Departamento de Odontologia, Programa de Pós-
Graduação em Odontologia Integrada, 2010.

1. Avulsão dentária. 2. Reimplante dentário. 3. Euro-
Collins® - Meio de estocagem. 4. Euro-Collins® -
Viabilidade celular - Azul de tripan. 5. Euro-Collins® -
Viabilidade celular - MTT. 6. Euro-Collins® - Viabilidade
celular - Células mononucleares do sangue periférico
humano. 7. Euro-Collins® - Viabilidade celular - Ligamento
periodontal - Dente humano extraído. 8. Euro-Collins® -
Viabilidade celular - Ligamento periodontal - Cultura
celular. I.Hidalgo, Mirian Marubayashi, orient. II. Sell,
Ana Maria, co-orient. III. Universidade Estadual de
Maringá. Departamento de Odontologia. Programa de Pós-
Graduação em Odontologia Integrada. IV. Título.

CDD 21.ed.617.6342

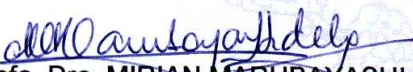


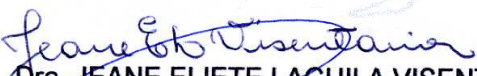
Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JULIANA NUNES BOTELHO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ (UEM).

Aos cinco dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dez, às nove horas, no Auditório do COMCAP da PPG (Câmpus UEM), reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. MIRIAN MARUBAYASHI HIDALGO, do Departamento de Odontologia/Universidade Estadual de Maringá (UEM); Prof^a. Dra. JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER, do Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Universidade Estadual de Maringá (UEM); e, Prof. Dr. WILSON ROBERTO POI, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba/Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), sob a presidência da primeira, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JULIANA NUNES BOTELHO, intitulada "EURO-COLLINS® COMO MEIO DE ESTOCAGEM DE DENTES AVULSIONADOS: ESTUDO *IN VITRO* DA VIABILIDADE CELULAR". Após a exposição, a discente foi argüida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. MIRIAN MARUBAYASHI HIDALGO


Profa. Dra. JEANE ELIETE LAGUILA VISENTAINER


Prof. Dr. WILSON ROBERTO POI

Juliana Nunes Botelho

28 de dezembro de 1983	Nascimento - Uberlândia - MG
Filiação	João José Botelho Maria Márcia Botelho
2002 - 2006	Curso de Graduação em Odontologia, na Universidade Estadual de Maringá, PR
2006 - 2007	Clínica Privada
2008 - 2010	Curso de Mestrado em Odontologia Integrada, no Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, PR
2010 -	Aprovação para cursar Doutorado em Cariologia, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, SP

***Dedico este trabalho aos meus pais, João e
Márcia; ao meu irmão, Jader; ao meu
namorado, Ricardo; e, à minha cunhada
Elaine, pelo incentivo, amor e carinho em
todos os momentos.***

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo**, pela oportunidade, amizade, paciência, dedicação, compreensão, perfeccionismo, preciosos ensinamentos que foram fundamentais para a minha formação profissional e pessoal.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Ana Maria Sell**, pela amizade, paciência, apoio em todos os momentos de dificuldades, experiências e conhecimentos ensinados, oportunidades concedidas e pelo exemplo profissional.

À doutoranda **Ana Regina Casaroto**, pela ajuda incondicional, pelos ensinamentos sobre cultura celular, mas principalmente pela lealdade, exemplo e amizade em todos os momentos.

À **Dra. Beatriz Dulcineia Mendes de Souza Kremer**, por tornar possível parte deste trabalho, pelo apoio e presteza em todos os momentos que precisei. Agradeço pelo companheirismo, confiança e amizade.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Tânia Ueda Nakamura e ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, por abrir-me as portas de seu laboratório e gentilmente me atenderem todas as vezes que foram necessárias.

À Profa. Dra. Renata Corrêa Pascotto e à Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, pela leitura criteriosa e por todas as sugestões no exame de qualificação.

A Fresenius-Kabi, na pessoa do Sr. Paulo Silva, pela disponibilidade do Euro-Collins[®] e de todas as informações e dados solicitados.

Aos pacientes e voluntários, que gentilmente doaram seus tecidos e dentes extraídos, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação e do Curso de Odontologia, pelos valiosos ensinamentos transmitidos contribuindo efetivamente para a minha formação profissional.

Aos funcionários do DOD e COD, pelo auxílio e atenção durante todos esses anos.

Às secretárias do DOD, Sônia e Anna, pela atenção, ajuda e apoio.

À Profa. Mitsue Fujimaki Hayacibara, pela amizade, incentivo, conselhos e auxílio.

Aos companheiros de Pós-Graduação, pela troca de conhecimentos e experiências, e pelos momentos importantes e inesquecíveis que passamos juntos.

À querida amiga Paula Cabrini Scheibel, pela amizade sincera, companheirismo, convívio e apoio sempre presentes.

Aos queridos amigos Marcos Sérgio Endo e Profa. Flávia Matarazzo, pela amizade e imprescindível contribuição.

Às alunas de iniciação científica, Christine e Cristiane, pela dedicação, ajuda e companheirismo.

Aos acadêmicos, hoje colegas, Rafael e Fernando, pelo auxílio durante a coleta do material para a pesquisa.

Às amigas do Laboratório de Imunologia Básica, Sheisa, Gláucia e Amanda, sempre prestativas, atenciosas e companheiras.

Aos técnicos do Laboratório de Imunologia Básica, Édina, Fabiano, Hélen, Marco, Sra. Neuza e Silvana pela colaboração, paciência e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia, Rodrigo, Karin, Milene, Patrícia e Phercyles, pela preciosa ajuda durante a parte experimental.

Ao Emílio Augusto Coelho Barros, pela amizade, análise estatística e orientação nos dados.

À Juliana Marie Abe, pelo apoio e pela fundamental ajuda na confecção dos fluxogramas.

Ao Ricardo Takeshi Saito, que me ensinou que tecnologia é fundamental.

Meu eterno reconhecimento a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Décio Sperandio;

Ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa da Chefe, Profa. Dra. Mirian Marubayashi Hidalgo;

Ao Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa da Chefe, Profa. Dra. Márcia Machado de Oliveira Dalalio;

À Pró-reitoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Maringá, na pessoa do Pró-reitor, Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, na pessoa do Coordenador, Prof. Dr. Adilson Luiz Ramos;

À CAPES, pelo apoio pecuniário.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

RESUMO

O sucesso do reimplante dentário pós avulsão é dependente, entre outros fatores, da condição do ligamento periodontal. Vários meios são indicados para estocagem de dentes avulsionados. O Euro-Collins® (EC) é uma solução para perfusão gravitacional e estocagem hipotérmica de órgãos para doação. Suas características despertaram o interesse na sua possível utilização como meio de estocagem de dentes avulsionados. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a efetividade do EC em relação a outros meios tradicionalmente utilizados para estocagem de dentes avulsionados. O estudo *in vitro* testou o EC comparando-o ao leite ultrapasteurizado integral, solução salina balanceada de Hank (HBSS) e Meio Essencial Mínimo (MEM), como controles positivos; e, água destilada, como controle negativo. A viabilidade celular foi analisada pelos métodos de exclusão pelo corante azul de tripan e colorimétrico à base de tetrazolato (MTT) utilizando células mononucleares do sangue periférico humano e as do ligamento periodontal de dentes extraídos e, mantidas em cultura que foram incubadas por 0h, 1h, 3h, 6h, 12h e 24h. Também foram testadas variações nas condições de uso do EC como dias depois de aberto e manipulado (EC0, EC30, EC120 ou EC180) e temperatura (25°C e 4°C). Pelo estudo com azul de tripan, as células mononucleares humanas incubadas em EC0, EC30 e EC120 apresentaram valores de viabilidade diferentes dos controles positivos apenas no tempo de 24h ($p < 0,05$). Para as células do ligamento periodontal de dentes extraídos, EC0, leite e HBSS foram superiores ($p < 0,05$) ao EC30 e EC180 a 25°C. Para a temperatura de 4°C, o EC0 apresentou resultados superiores ($p < 0,05$) aos EC30 e EC180. As células do ligamento periodontal em cultura incubadas em EC0, EC30 e EC180 apresentaram resultados inferiores ($p < 0,05$) em relação ao leite e à HBSS a 25°C, e somente ao leite a 4°C ($p < 0,05$), também no tempo de 24h. Pelo MTT, as células do ligamento periodontal em cultura incubadas em EC0, EC30 e EC180 apresentaram valores da absorvância inferiores aos controles positivos ($p < 0,05$) a partir de uma hora, e foram semelhantes à água destilada a partir de 12h a 25°C. A 4°C, os EC foram inferiores ao leite na primeira hora e à HBSS no tempo de 24h ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que, em nossas condições experimentais, o EC tem efetividade semelhante à HBSS,

tradicionalmente indicado como meio de estocagem de dentes avulsionados, por até 12h a 4°C.

Palavras-chave: Euro-Collins[®]. Viabilidade. Avulsão dentária. Reimplante dentário.

ABSTRACT

The success of post-avulsion dental reimplantation is dependent on, among other factors, the condition of the periodontal ligament. Several media are recommended for storage of avulsed teeth. Euro-Collins[®] (EC) is a solution for gravitational perfusion and hypothermic storage of organs for donation. Its characteristics called the attention for its possible use as avulsed teeth storage medium. Thus, the aim of this work was to verify the effectiveness of EC in relation to other media traditionally used to avulsed teeth storage. The *in vitro* study tested EC comparing it to ultra-pasteurized whole milk, Hank's balanced salt solution (HBSS) and Minimum Essential Medium (MEM) as positive controls; and distilled water as negative control. The cell viability was analyzed by both: the trypan blue staining exclusion method and the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT). Human peripheral blood mononuclear cells and human periodontal ligament (PDL) cells from extracted teeth and culture were incubated at 1, 3, 6, 12, and 24h. Also, variations in the conditions of EC use, such as temperature (25°C and 4°C) and days after opening and handling (EC0, EC30, EC120 or EC180) were tested. As for the trypan blue study, the human mononuclear cells incubated in EC0, EC30 and EC120 showed different cell viability values than positive controls ($p>0.05$) only at 24h time. For human PDL cells from extracted teeth, EC0, milk, and HBSS were higher ($p<0.05$) than EC30 and EC180 at 25°C. At 4°C, EC0 showed higher results ($p<0.05$) than EC30 and EC180. The cultured human PDL cells incubated in EC0, EC30, and EC180 showed lower results ($p<0.05$) than milk and HBSS at 25°C, and lower results ($p<0.05$) than milk at 4°C at 24h time. As for MTT, the cultured human PDL cells incubated in EC0, EC30, and EC180 showed lower values than positive controls ($p<0.05$) since 1h and similar values in relation to distilled water from 12h ($p>0.05$) on at 25°C. As for 4°C, the absorbance values of EC0, EC30 and EC180 were lower ($p<0.05$) than milk since 1h, and in relation to HBSS ($p<0.05$) at 24h. The EC0, EC30, EC180, and MEM became lower than HBSS at 24h time ($p<0.05$). The results suggest that, in our experimental conditions, the EC maintained the effectiveness similar to HBSS, traditionally used as avulsed teeth storage medium, until 12h at 4°C.

Key-Words: Euro-Collins[®]. Viability. Tooth avulsion. Tooth reimplantation.

LISTA DE E FLUXOGRAMAS E FIGURAS

Fluxograma 1	Obtenção das células mononucleares do sangue periférico humano.....	28
Fluxograma 2	Metodologia de exclusão pelo corante azul de tripan.....	32
Fluxograma 3	Metodologia colorimétrica à base de tetrazolato (MTT).....	34
Figura 1	Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 24h sob temperatura de 25°C.....	37
Figura 2	Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 24h sob diferentes temperaturas.....	39
Figura 3	Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 24h sob a temperatura de 25°C.....	45
Figura 4	Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 24h sob a temperatura de 4°C.....	47
Figura 5	Médias das densidades ópticas obtidas pelo método colorimétrico do MTT, representando a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, após incubação por 24h sob a temperatura de 25°C.....	49
Figura 6	Médias das densidades ópticas obtidas pelo método colorimétrico do MTT, representando a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, após incubação	

	por 24h sob a temperatura de 4°C.....	51
Figura 7	Médias das densidades ópticas obtidas pelo método colorimétrico do MTT, representando a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, após incubação em HBSS e MEM por 24h sob diferentes temperaturas.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Médias da viabilidade das células do ligamento periodontal de dentes humanos extraídos, analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 3h sob a temperatura de 25°C.....	41
Tabela 2	Médias da viabilidade das células do ligamento periodontal de dentes humanos extraídos, analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 3h sob diferentes temperaturas.....	43
Tabela 3	Médias da viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, analisadas pelas duas metodologias, após incubação por 24h sob diferentes temperaturas.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cél	Célula
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio-padrão
EC	Euro-Collins [®]
EC0	Euro-Collins [®] dia 0 (recém-aberto)
EC30	Euro-Collins [®] aberto há 30 dias
EC120	Euro-Collins [®] aberto há 120 dias
EC180	Euro-Collins [®] aberto há 180 dias
EDTA	Etileno diamino tetracetato dissódico
h	Hora
HBSS	Solução Salina Balanceada de Hank
L	Litro
MEM	Meio Essencial Mínimo com sais de Earle
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro

mM	Milimolar
mm	Milímetro
mOsm	Miliosmol
MTT	[3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo]
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
p	Nível de significância estatística
PBS	Solução tampão salina-fosfato
pH	Pressão hidrogeniônica
PSA	Solução de penicilina 10.000UI/mL, estreptomicina 20mg/mL e anfotericina B 2mg/L
rpm	Rotações por minuto
SAMU	Serviço de Atendimento Móvel de Urgência
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SFB	Soro fetal bovino
SIATE	Serviço Integrado de Atendimento ao Trauma em Emergência
UHT	Ultrapasteurizado
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO	20
2	INTRODUÇÃO	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Obtenção das células a serem utilizadas nos experimentos.....	27
4.1.1	Células mononucleares do sangue periférico humano.....	27
4.1.2	Células do ligamento periodontal de dente humano extraído.....	29
4.1.3	Células do ligamento periodontal humano mantidas em cultura.....	29
4.2	Metodologia de exclusão pelo corante azul de tripan.....	30
4.2.1	Viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano..	30
4.2.2	Viabilidade do ligamento periodontal de dente humano extraído.....	30
4.2.3	Viabilidade das células do ligamento periodontal humano mantidas em cultura.....	31
4.3	Metodologia colorimétrica à base de tetrazolato (MTT).....	33
4.4	Análise dos resultados.....	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Viabilidade celular verificada pelo método de exclusão pelo azul de tripan.....	36
5.1.1	Células mononucleares do sangue periférico humano.....	36
5.1.2	Células do ligamento periodontal de dente humano extraído.....	40
5.1.3	Células do ligamento periodontal humano mantidas em cultura.....	44
5.2	Viabilidade celular verificada pelo método colorimétrico à base de tetrazolato (MTT).....	48

6	DISCUSSÃO	56
6.1	Da concepção do trabalho.....	56
6.2	Das metodologias.....	57
6.3	Dos resultados.....	58
6.3.1	Pela metodologia de exclusão pelo azul de tripan.....	59
6.3.2	Pela metodologia colorimétrica à base de MTT.....	60
6.4	O Euro-Collins®.....	61
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXO A	70
	ANEXO B	71
	APÊNDICE A	73
	APÊNDICE B	75
	APÊNDICE C	77
	APÊNDICE D	80

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A avulsão dentária é um tipo de trauma complexo que leva ao deslocamento total do dente para fora do seu alvéolo, acometendo múltiplos tecidos como o ligamento periodontal, osso alveolar, cimento, polpa dentária e gengiva (BARRET; KENNY, 1997; CONSOLARO, 2005). E, pode representar até 16% de todos os traumatismos da dentição permanente (ANDREASEN, 1970), com predominância para os dentes anteriores (LOH et al., 2006). Acidentes automobilísticos e esportivos são as causas mais frequentes de ocorrência na faixa etária entre 7 e 11 anos (TROPE, 1995) e de prevalência do gênero masculino (TROPE, 1995; ANDERSSON et al., 2006).

Após ter sido avulsionado, o dente pode ser reimplantado, ou seja, reposicionado em seu alvéolo de modo a possibilitar sua reinserção. Este é um processo complexo que depende de fatores como a viabilidade de cada constituinte celular afetado, das condições do acidente, de como foi realizado o procedimento de reimplante e de fatores específicos do paciente. O melhor prognóstico para a manutenção da integridade do ligamento periodontal ocorre quando o reimplante é imediato e, parece estar diretamente relacionado ao tempo extra-alveolar, à temperatura, ao meio de estocagem do dente durante esse período, e a manipulação da porção radicular (ANDREASEN, 1981; RAPHAEL; GREGORY, 1990; TROPE, 1995; BARRET; KENNY, 1997; SCHWARTS et al., 2002; PEARSON et al., 2003; CONSOLARO, 2005; ANDERSSON et al., 2006; SOUSA et al., 2008; SANTOS et al., 2009).

Durante o período extra-alveolar do dente, as células aderidas à parede do alvéolo permanecem viáveis. Entretanto, as células aderidas à raiz, além do trauma mecânico, tendem a sofrer desidratação e também podem ser contaminadas. Com tudo isso, o comportamento do dente após seu reimplante poderá ser favorável ou não, sendo as reabsorções radiculares externa, inflamatória e/ou por substituição, subsequentes à anquilose alvéolo-dentária, as complicações mais sérias e comuns (BARRET; KENNY, 1997; CONSOLARO, 2005).

O armazenamento dos dentes avulsionados em um meio desfavorável compromete a manutenção do ligamento periodontal (BARRET; KENNY, 1997). Por isso, na literatura são propostos vários meios de estocagem a fim de se manter a viabilidade celular do ligamento periodontal e proporcionar um melhor prognóstico.

Dentre eles estão os meios tradicionais: água, leite, saliva, solução fisiológica e meios de cultura celular (COURTS et al., 1983; MELO et al., 2003; ANDERSSON et al., 2006); e outros inovadores, como: leite em pó, própolis, água de coco, soluções isotônicas, soluções para manutenção de lentes de contato e de órgãos para transplantes, entre outros (ASHKENAZI et al., 1999; MARTIN; PILEGGI, 2004; SIGALAS et al., 2004; GOPIKRISHNA et al., 2008; SANTOS et al., 2009).

O meio de estocagem, que idealmente preserva a viabilidade celular, deve estar livre ou com a menor contaminação microbiana possível, ser isotônico, apresentar pH neutro e osmolalidade fisiológica, além de estar disponível no momento do acidente (COURTS et al., 1983; LINDSKOG et al., 1983; HILTZ; TROPE, 1991; HUANG et al., 1996; BARRET; KENNY, 1997; MARINO et al., 2000; SCHWARTS et al., 2002; PEARSON et al., 2003; CHAMORRO et al., 2008).

A água, dentre os tradicionais, é um meio hipotônico que causa rápida lise das células, sendo desfavorável (MARINO et al., 2000; ANDERSSON et al., 2006), porém, mais conveniente que deixar o dente a seco (MARINO et al., 2000). Devido os resultados inadequados em relação à manutenção da viabilidade celular em níveis aceitáveis, a água vem sendo utilizada como controle negativo por diversos autores durante ensaios *in vitro* e *in vivo* (MARINO et al., 2000; PEARSON et al., 2003).

O leite, em estudos *in vitro*, manteve a viabilidade das células do ligamento periodontal humano em 60-70% de uma a três horas, e, em até 50% por 12 horas de estocagem (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF, 1981a e b). Já os estudos *in vivo* mostraram que ele é um excelente meio de estocagem por até seis horas (BLOMLÖF et al., 1981; BLOMLÖF et al., 1983; TROPE; FRIEDMAN, 1992). Esses efeitos benéficos advêm de características próprias do leite, tais como: conter pouco conteúdo bacteriano (LINDSKOG et al., 1983); ser um líquido isotônico (ANDERSSON et al., 2006); apresentar pH aproximadamente neutro e osmolalidade fisiológica (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; COURTS et al., 1983); e conter fatores de crescimento e nutrientes essenciais para as células (OLSON et al., 1997; PEARSON et al., 2003; SIGALAS et al., 2004). Pelos efeitos favoráveis e facilidade de acesso, o leite tem sido amplamente divulgado à população em geral como meio de escolha para estocagem dos dentes avulsionados (FLORES et al., 2007; SBTD, 2008, 2010; CASAROTO; HIDALGO, 2009a e b).

A saliva é um meio de estocagem com disponibilidade óbvia, seu pH é aproximadamente neutro, mas é um meio hipotônico (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980) e possui um grande potencial de contaminação microbiana (LINDSKOG et al., 1983; MARINO et al., 2000).

A solução fisiológica tem sido sugerida apenas como meio de estocagem temporário (entre duas a três horas) devido à sua osmolalidade e pH fisiológicos (MARINO et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2002), pois não apresenta íons essenciais e glicose, e esses são indispensáveis às células.

Embora menos acessíveis no momento do trauma, algumas substâncias foram estudadas em função de conterem nutrientes em formulações especificamente desenvolvidas para manutenção celular e assim, teoricamente, permitirem melhor conservação por longos períodos de tempo. A solução salina balanceada de Hank (HBSS) tem sido amplamente utilizada, possuindo como características a osmolalidade e o pH ideais, resultando ser mais favorável que o leite em períodos de até 72 horas (HILTZ; TROPE, 1991). Entretanto, o seu uso restrito a ambiente laboratorial e, conseqüentemente, a indisponibilidade no local do acidente, torna difícil a sua utilização como meio de conservação (HILTZ; TROPE, 1991; ASHKENAZI et al., 1999, SOUSA et al., 2008).

Dentre os inovadores, a própolis apresentou resultados favoráveis *in vitro* (MARTIN; PILEGGI, 2004; CASAROTO, 2009), porém, permitiu a ocorrência de processos de reabsorção radicular *in vivo* (CASAROTO, 2009).

A solução desenvolvida para manutenção de órgãos para transplante, o Viaspan[®], com osmolalidade e pH ideais, apresentou resultados favoráveis de preservação da viabilidade das células do ligamento periodontal por até 12 horas (HILTZ; TROPE, 1991; TROPE; FRIEDMAN, 1992) e diminuiu a incidência de reabsorção radicular após o reimplante (PETTIETTE et al., 1997). Entretanto, assim como ocorre com a HBSS, o uso do Viaspan[®] fica inviabilizado pelo seu alto custo (HILTZ; TROPE, 1991; ASHKENAZI et al., 1999), pequeno período de uso após abertura e dificuldade na sua obtenção (ASHKENAZI et al., 1999; SOUSA et al., 2008).

As respostas favoráveis do Viaspan[®] frente às pesquisas demonstram o potencial das soluções desenvolvidas para manter órgãos com a finalidade de transplante para seu provável uso como meios de estocagem para dentes avulsionados. O Euro-Collins[®] (EC), obtido por modificação do Viaspan[®], resultou

em menor custo e maior período de validade por apresentar duas soluções que devem ser misturadas no momento do uso. A solução resultante apresenta como principais características: o pH 7,4; eletrólitos que mimetizam a composição e concentração intracelular; tampão fosfato para controlar a acidose celular; e, alta concentração de potássio para reduzir a perda de cátions intracelulares (COLLINS, 1997). Ele possui baixa concentração de sódio e cloro, além de uma osmolaridade de 402 mOsm/L (RAUEN; GROOT, 2008).

Até o presente momento, apenas um estudo *in vivo* testou a manutenção de dentes de cães por oito horas no EC comparativamente ao leite bovino, ao deixá-lo seco por duas horas e ao reimplante imediato. Os resultados foram mais satisfatórios no EC do que em leite bovino e, quando avaliadas a reabsorção dentária presente e a reorganização do ligamento periodontal, os dentes mantidos em EC apresentaram resultados semelhantes aos dentes reimplantados imediatamente. Assim sendo, o EC foi considerado como adequado para uso como meio de conservação por até oito horas (SOTTOVIA et al., 2010).

2 INTRODUÇÃO

A avulsão dentária é um tipo de trauma que leva ao deslocamento total do dente para fora do seu alvéolo e o reimplante pode ser realizado a fim de se tentar obter sua reinserção (COHEN; HARGREAVES, 2007). A imediata reposição, ainda no local do acidente, é a conduta ideal para manutenção das células do ligamento periodontal, porém na maioria das vezes, isso não ocorre (PETROVIC et al., 2010). A integridade dessas células é dependente do tempo extra-alveolar, do meio de estocagem do dente e da não manipulação da porção radicular, determinando o prognóstico de sucesso do reimplante dentário (COURTS et al., 1983; RAPHAEL; GREGORY, 1990; MARINO et al., 2000; ANDERSSON et al., 2006).

A literatura indica o leite e os meios de cultura celular, em especial a HBSS, como as opções mais favoráveis para estocagem de dentes avulsionados a fim de se manter a viabilidade celular do ligamento periodontal e proporcionar um melhor prognóstico (COURTS et al., 1983; LINDSKOG et al., 1983; HILTZ; TROPE, 1991; HARKACZ et al., 1997; MELO et al., 2003; ANDERSSON et al., 2006). O leite, pela facilidade de acesso, tem sido amplamente divulgado à população em geral como meio de escolha (FLORES et al., 2007; SBTB, 2008, 2010; CASAROTO; HIDALGO, 2009a e b).

Nos últimos anos, diversas alternativas têm sido pesquisadas e a solução desenvolvida para manutenção de órgãos para transplante, o Viaspan[®], apresentou resultados favoráveis por até 12 horas de conservação (HILTZ; TROPE, 1991; TROPE; FRIEDMAN, 1992). O seu sucedâneo, EC, possui características (JASSEM et al., 2006) que podem justificar a sua utilização como um meio de estocagem para dentes avulsionados. Há apenas um estudo, em cães, até o momento, no qual se testou a manutenção de dentes no EC e o considerou como adequado para uso por até oito horas (SOTTOVIA et al., 2010).

Todavia, nenhum estudo *in vitro* foi realizado, e, portanto, não se têm dados sobre o comportamento das células do ligamento periodontal quando em contato com o EC por diferentes períodos de tempos e em diferentes temperaturas. Estes fatores podem ser relevantes, pois o uso hipotérmico é recomendado pelo fabricante, ou seja, a manutenção sob temperatura de 4°C após a mistura das soluções até seu uso. Para uma possível utilização como meio de estocagem de dentes avulsionados e, em especial, por socorristas do SIATE e do SAMU, por

exemplo, seria de extrema utilidade se o mesmo mantivesse suas propriedades em temperatura ambiente. Além disso, como é comercializado apenas em embalagens que totalizam um litro ao serem misturadas no momento do uso, é importante verificar a manutenção de sua atividade decorridos alguns períodos de tempo após a sua abertura e manipulação, tendo em vista a pequena quantidade necessária para imersão do dente avulsionado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a efetividade da solução de Euro-Collins[®] em relação a outros meios tradicionalmente utilizados para estocagem de dentes avulsionados.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano e das células do ligamento periodontal de dentes humanos extraídos, incubadas em EC em relação à HBSS, leite ultrapasteurizado integral e água destilada, pela metodologia de exclusão com azul de tripan;
- Comparar a viabilidade das células provenientes do ligamento periodontal humano, mantidas em cultura celular, incubadas em EC em relação à HBSS, MEM, leite ultrapasteurizado integral e água destilada, pelas metodologias de exclusão pelo azul de tripan e colorimétrica à base de tetrazolato (MTT);
- Verificar a efetividade do EC quando utilizado no momento da sua abertura e decorridos 30, 120 e 180 dias, pelas metodologias e células supracitadas;
- Verificar a efetividade do EC quando utilizado sob temperatura ambiente (25°C) e na temperatura recomendada pelo fabricante (4°C), pelas metodologias e células supracitadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

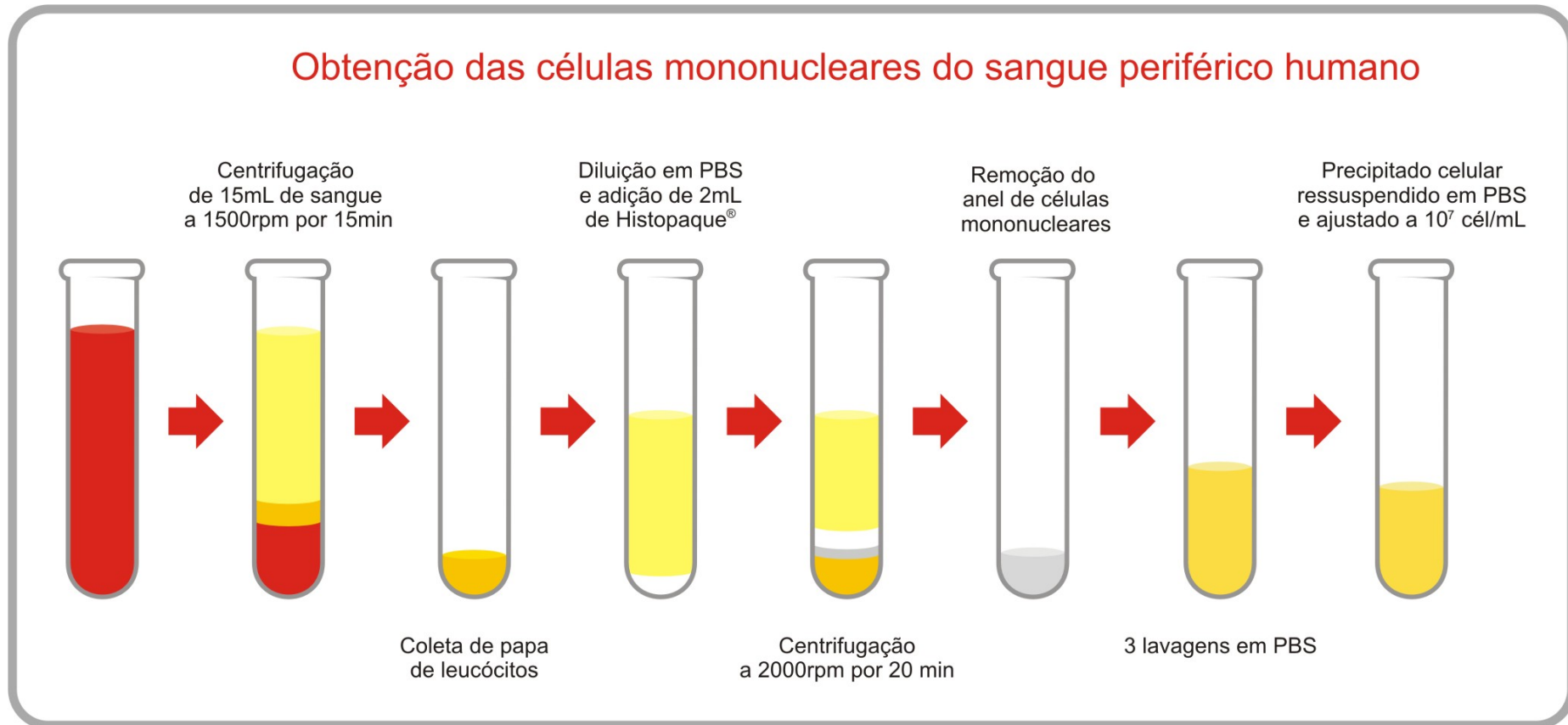
O Projeto foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá - UEM, CAAE nº 0158.0.093.000-08.

4.1 Obtenção das células a serem utilizadas nos experimentos

4.1.1 Células mononucleares do sangue periférico humano

Como apresentado no Fluxograma 1, para obtenção de células mononucleares, 15mL de sangue venoso de quatro doadores foram obtidos assepticamente em tubos heparinizados (2 gotas de Liquemine[®] (Roche, Suíça). As células foram isoladas pelo método descrito por Böyum (1968) modificado. Os tubos foram centrifugados a 1500rpm durante 15min à temperatura ambiente (25°C), sendo a papa de leucócitos colhida, diluída em 6mL de solução tampão salina-fosfato (PBS) estéril e depositada sobre 2mL de Histopaque[®] (Sigma Chemical Co., Estados Unidos). Após centrifugação a 2000rpm durante 20min à temperatura ambiente, o anel de células mononucleares formado foi removido com pipeta *Pasteur* e transferido para outro tubo. As células foram lavadas três vezes com PBS e o precipitado resultante foi ressuspendido a uma concentração de 1×10^7 cél/mL.

Obtenção das células mononucleares do sangue periférico humano



Fluxograma 1. Obtenção das células mononucleares do sangue periférico humano

4.1.2 Células do ligamento periodontal de dente humano extraído

Vinte e sete pré-molares uni ou birradiculados íntegros foram extraídos de pacientes por indicação ortodôntica de docentes da Clínica Odontológica da UEM, e imediatamente colocados em EC0, EC30, EC120 e nos controles: leite ultrapasteurizado integral, HBSS e água destilada. O tempo de incubação dos dentes foi de 3h, sob as temperaturas de 25°C para todos os meios e de 4°C para os EC0, EC30 e EC120.

4.1.3 Células do ligamento periodontal humano mantidas em cultura

As células, em cultura, do ligamento periodontal humano utilizadas nos experimentos foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina. A cultura celular foi mantida em estufa (5% CO₂/95% umidade, 37°C), em garrafas de cultura celular (TPP Techno Plastic Products, Suíça) contendo o Meio Essencial Mínimo (MEM - Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, Brasil) e 1% de uma associação de penicilina 10.000UI/mL, estreptomicina 20mg/mL e anfotericina B 2mg/L (PSA) (Cultilab, Brasil). As trocas sucessivas do meio de cultura foram realizadas a cada 48 ou 72h. Após ocorrer a confluência celular foi realizada a tripsinização, ou seja, as células foram lavadas duas vezes com PBS estéril e, posteriormente, com solução 0,25% tripsina EDTA (Sigma Chemical Co., Estados Unidos) durante alguns minutos para desprendimento das células. Após neutralização com MEM, o precipitado celular foi lavado, dissolvido em meio de cultura fresco e distribuído em alíquotas para as garrafas. Cada procedimento de tripsinização deu origem a uma nova passagem e durante todo o período experimental, quando em confluência, as células foram replicadas de modo a se manterem em ótimas condições de viabilidade em cultura.

4.2 Metodologia de exclusão pelo corante azul de tripan

A viabilidade foi determinada por observação microscópica das células excluídas pela coloração por azul de tripan, corante vital derivado da toluidina. Como apresentado no Fluxograma 2, uma alíquota de cada amostra a ser analisada foi colocada em câmara Neubauer e acrescentado igual volume do corante. As células foram consideradas não viáveis quando estavam impregnadas pelo corante ou apresentavam degeneração em forma de balão. Foram utilizados o leite ultrapasteurizado integral e a HBSS (Sigma Chemical Co., Estados Unidos), como controles positivos; e, a água destilada, como controle negativo. A leitura foi executada por três examinadores diferentes e os resultados foram expressos por porcentagem.

4.2.1 Viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano

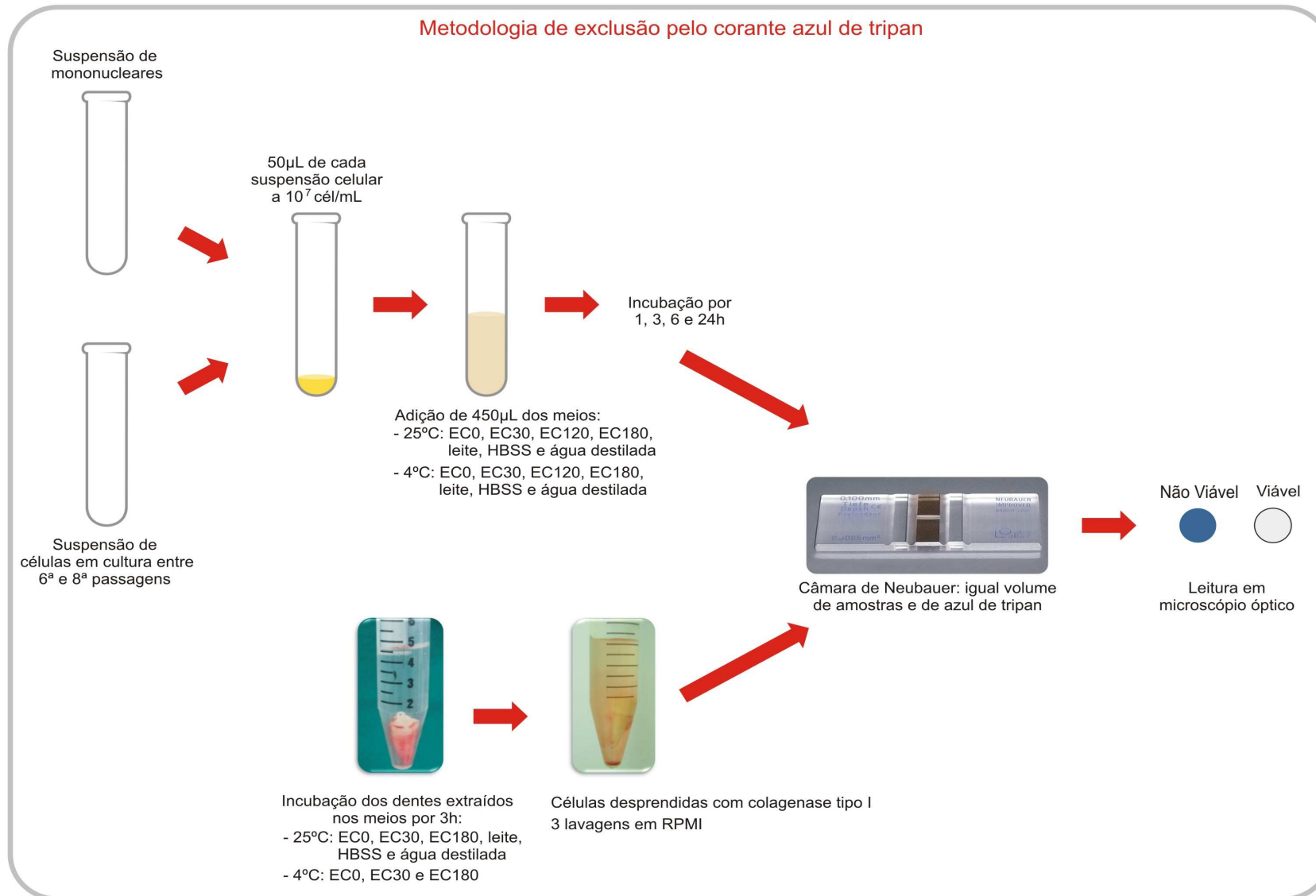
O meio de estocagem testado foi o EC, utilizado no momento da sua abertura (EC0) e decorridos 30 (EC30) e 120 (EC120) dias. Em cada tubo de ensaio, foram adicionados 450µL do meio teste e, em seguida, 50µL da suspensão celular. Os tubos foram incubados durante 1, 3, 6 e 24h sob as temperaturas de 25°C e de 4°C (Fluxograma 2). O ensaio foi repetido quatro vezes para cada meio de estocagem e temperatura. As amostras totalizaram 96 leituras para a temperatura de 25°C, considerando os controles positivos e negativo; e, 48 leituras para a temperatura de 4°C.

4.2.2 Viabilidade do ligamento periodontal de dente humano extraído

Após incubação dos dentes nos meios e nas temperaturas já mencionadas, as células foram desprendidas enzimaticamente (colagenase tipo I - 0,15%, Sigma Chemical Co., Estados Unidos), lavadas três vezes e ressuspensas com 500µL de RPMI 1.640 (Gibco Co., Estados Unidos), como mostrado no Fluxograma 2. O ensaio foi repetido três vezes para cada meio de estocagem e temperatura. As amostras totalizaram 18 dentes para a temperatura de 25°C e nove para 4°C.

4.2.3 Viabilidade das células do ligamento periodontal humano mantidas em cultura

Os experimentos foram realizados entre a sexta e a oitava passagem celular, seguindo a metodologia proposta pela ATCC (*American Type Culture Collection*, 2001) com modificações. As células foram ressuspensas com HBSS suplementado com 1% de PSA e a concentração celular foi ajustada para 1×10^7 células/mL. Os EC testados foram: EC0, EC30 e EC180. Em cada tubo contendo 450 μ L do meio a ser avaliado, foram adicionados 50 μ L da suspensão celular, os quais foram incubados durante 1, 3, 6 e 24h sob as temperaturas de 25°C ou 4°C. O ensaio foi repetido cinco vezes para cada meio de estocagem e temperatura, portanto, as amostras totalizaram 120 leituras tanto para a temperatura de 25°C como de 4°C (Fluxograma 2).

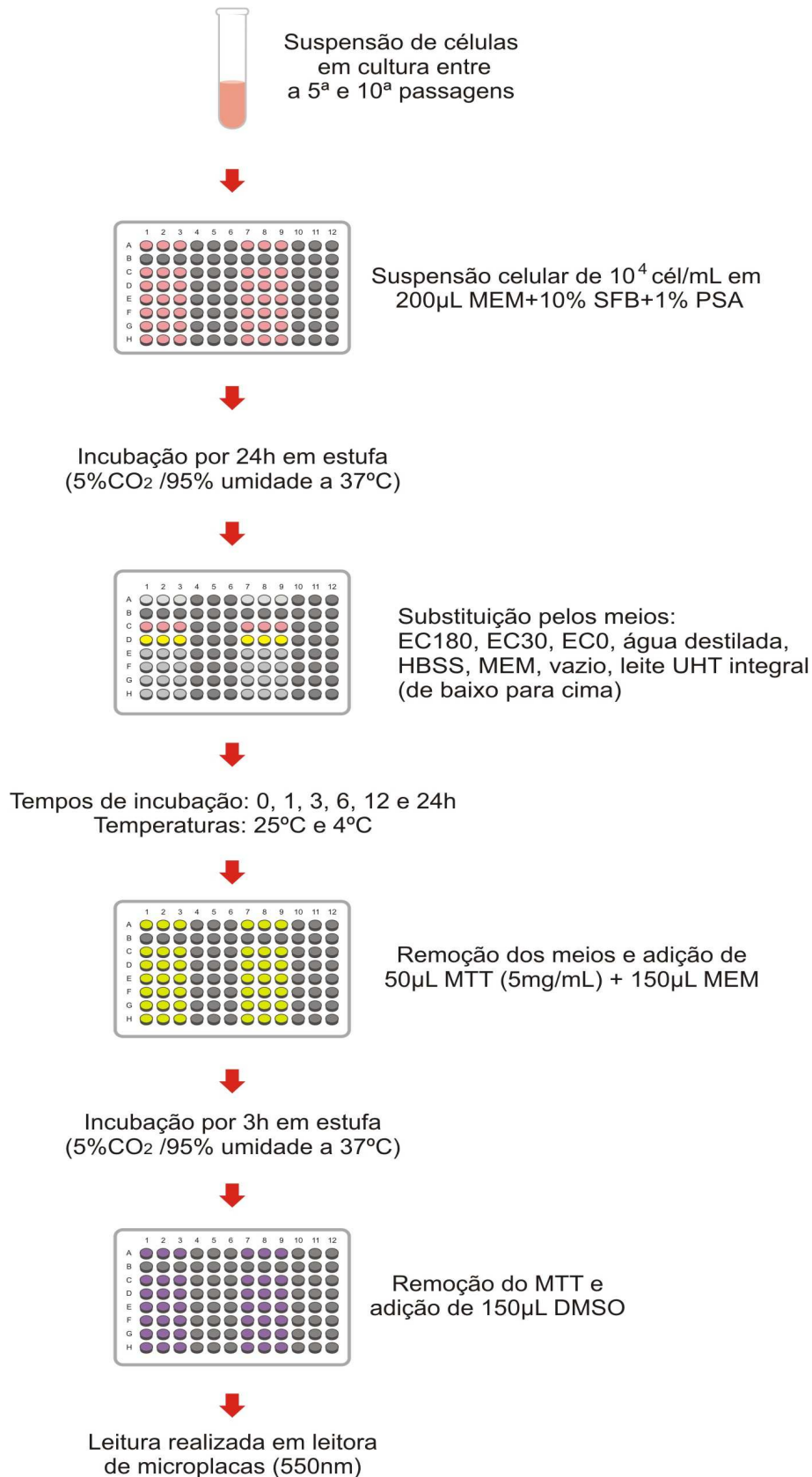


Fluxograma 2. Metodologia de exclusão pelo corante azul de tripan

4.3 Metodologia colorimétrica à base de tetrazolato [3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo]

Os experimentos de viabilidade das células do ligamento periodontal humano, mantidas em cultura foram realizados entre a quinta e a décima passagens, seguindo a metodologia proposta pela ATCC (2001) e Oh et al. (2005), com modificações. As células foram ressuspendidas, a concentração celular ajustada em 10^4 células/mL, diluídas em 200 µL de MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA e, semeadas em placas de 96 poços (TPP Techno Plastic Products, Suíça). Após incubação em estufa 5% CO₂/95% umidade a 37°C por 24h para adesão das células nas placas, o meio de cultura foi descartado e as células incubadas no meio a ser testado, o EC. O leite ultrapasteurizado integral, HBSS e MEM foram usados como controles positivos; e, a água destilada como controle negativo. Finalizados os tempos de incubação de 1, 3, 6, 12 e 24h, os meios de estocagem foram lentamente removidos e adicionou-se 50 µL de solução de MTT (5mg/mL, MTT-Azul de Tiazol, Sigma Chemical Co., Estados Unidos) para cada 150 µL de MEM. As placas de cultura foram incubadas em estufa por 3h. Em seguida, o meio de cultura com MTT foi removido e 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO - Merck, Brasil) foram adicionados para que os cristais de formazan fossem dissolvidos. A viabilidade celular foi determinada por meio da leitura da absorbância do conteúdo dos poços das placas, realizada em uma leitora de microplacas (ASYS Expert Plus Microplate Reader, Biochrom, Reino Unido) sob o comprimento de onda de 550nm. O teste foi realizado em triplicata, com sete repetições, nas diferentes condições de uso do EC (EC0, EC30 e EC180; 25°C e 4°C). As amostras totalizaram 147 leituras para cada temperatura, a 25°C e a 4°C (Fluxograma 3).

Metodologia colorimétrica à base de tetrazolato (MTT)



Fluxograma 3. Metodologia colorimétrica à base de tetrazolato (MTT).

4.4 Análise dos resultados

Os dados do percentual de células viáveis, obtidos pelo método de exclusão com azul de tripan para as células mononucleares e em cultura, foram coletados para os grupos de forma dependente ao longo do tempo. Para a análise desses resultados, utilizou-se Modelos Lineares de Efeitos Mistos com o procedimento PROC NL MIXED do software SAS versão 9. Os percentuais de células do ligamento periodontal viáveis obtidas a partir dos dentes humanos extraídos foram coletados, para os grupos, de forma independente. Por isso, utilizou-se o software Statistica versão 7.0, para a análise de variância (ANOVA), no qual a diferença média entre os grupos foi avaliada pelo Teste de Tukey. Para analisar o(s) grupo(s) diferente(s) do controle HBSS foi aplicado o Teste de Dunnett.

Os resultados obtidos nos testes de viabilidade das células em cultura pela metodologia MTT foram submetidos à análise de variância ANOVA Fatorial, seguida da análise comparativa pelo Teste de Contraste, por meio do software Statistica versão 7.0.

O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular verificada pelo método de exclusão pelo azul de tripan

5.1.1 Células mononucleares do sangue periférico humano

A viabilidade das células mononucleares humanas mantidas nos meios de estocagem por um período de 24h pode ser observada na Figura 1. Todos os EC (EC0, EC30 e EC120) apresentaram viabilidade semelhante aos controles positivos, leite e HBSS ($p > 0,05$), até a sexta hora, mas no tempo de 24h, houve uma redução na viabilidade celular com valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Desde a primeira hora, os meios mostraram-se estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) do controle negativo, a água destilada.

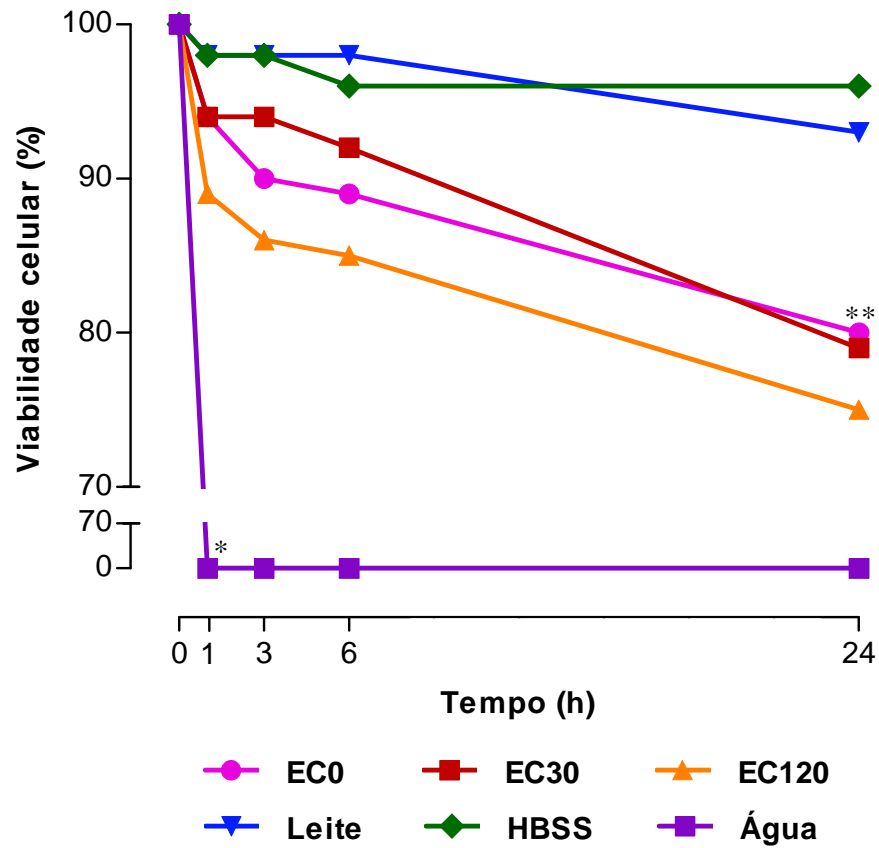


Figura 1. Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 24h sob temperatura de 25°C. O valor de n=4, em triplicata. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a água destilada e os demais meios. **Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os EC (EC0, EC30 e EC120) e os controles positivos (leite e HBSS). Modelos lineares de efeitos mistos.

Para análise da possível influência da baixa temperatura de conservação do EC após sua manipulação, como recomendado pelo fabricante, na viabilidade celular, os experimentos foram repetidos sob a temperatura de 4°C (Figura 2). Nessa temperatura, os EC0, EC30 e EC120 obtiveram resultados superiores, porém, sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$).

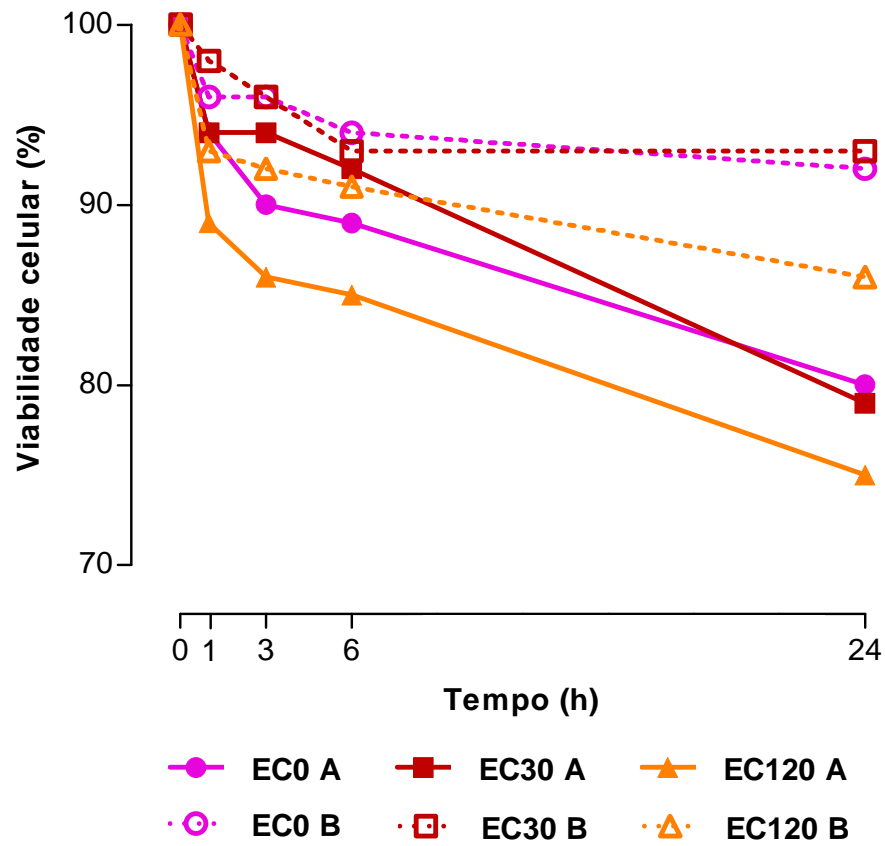


Figura 2. Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 24h sob diferentes temperaturas. A. 25°C e B. 4°C. O valor de n=4, em triplicata. Modelos lineares de efeitos mistos.

5.1.2 Células do ligamento periodontal de dente humano extraído

Os valores médios da viabilidade das células do ligamento periodontal sob a temperatura de 25°C podem ser observados na Tabela 1. O EC0 e os controles positivos, leite e HBSS, foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) do EC30 e do EC180. O EC0 apresentou uma viabilidade muito próxima àquela apresentada pelo leite ($p > 0,05$). Todos os meios testados apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à água destilada ($p < 0,05$), o controle negativo.

Tabela 1. Médias da viabilidade das células do ligamento periodontal de dentes humanos extraídos, analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 3h sob a temperatura de 25°C. O valor de n=3, em triplicata.

Meios de estocagem	Média da viabilidade (% relativa)	DP	CV
EC0 ^{a, b}	71	8	0,10
EC30 ^a	51	1	0,02
EC180 ^a	51	5	0,10
Leite ^{a, b}	72	4	0,06
HBSS ^{a, b}	77	6	0,07
Água destilada	28	3	0,09

DP desvio-padrão; **CV** coeficiente de variação.

a. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação à água destilada. **b.** Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao EC30 e ao EC180. ANOVA, Testes de Tukey e Dunnett.

Na Tabela 2, pode-se observar as médias da viabilidade das células do ligamento periodontal de dentes extraídos após estocagem nos EC0, EC30 e EC180, sob as temperaturas de 25°C e de 4°C. O EC0 resultou em um desempenho estatisticamente diferente ($p < 0,05$) que os EC30 e EC180, tanto para a temperatura de 25°C como de 4°C. Entretanto, os valores das médias da viabilidade do EC0, EC30 e EC180 a 25°C não diferiram ($p > 0,05$) daqueles encontrados para a temperatura de 4°C.

Tabela 2. Médias da viabilidade das células do ligamento periodontal de dentes humanos extraídos, analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 3h sob diferentes temperaturas. O valor de n=3, em triplicata.

Meios de estocagem	Média (DP) da viabilidade (% relativa)	
	25°C	4°C
EC0	71 (8) ^a	75 (2) ^a
EC30	51 (1)	53 (7)
EC180	51(5)	54 (6)

DP desvio-padrão.

a. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do EC0 em relação aos EC30 e EC180. Teste de Tukey.

5.1.3 Células do ligamento periodontal humano mantidas em cultura

A Figura 3 representa a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura e testadas nos diferentes meios de estocagem à 25°C. A partir de seis horas ocorre uma queda na viabilidade celular dos EC0, EC30 e EC180, passando a apresentar diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao leite e à HBSS no tempo de 24h. A partir da primeira hora, todos os meios estudados foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) da água destilada.

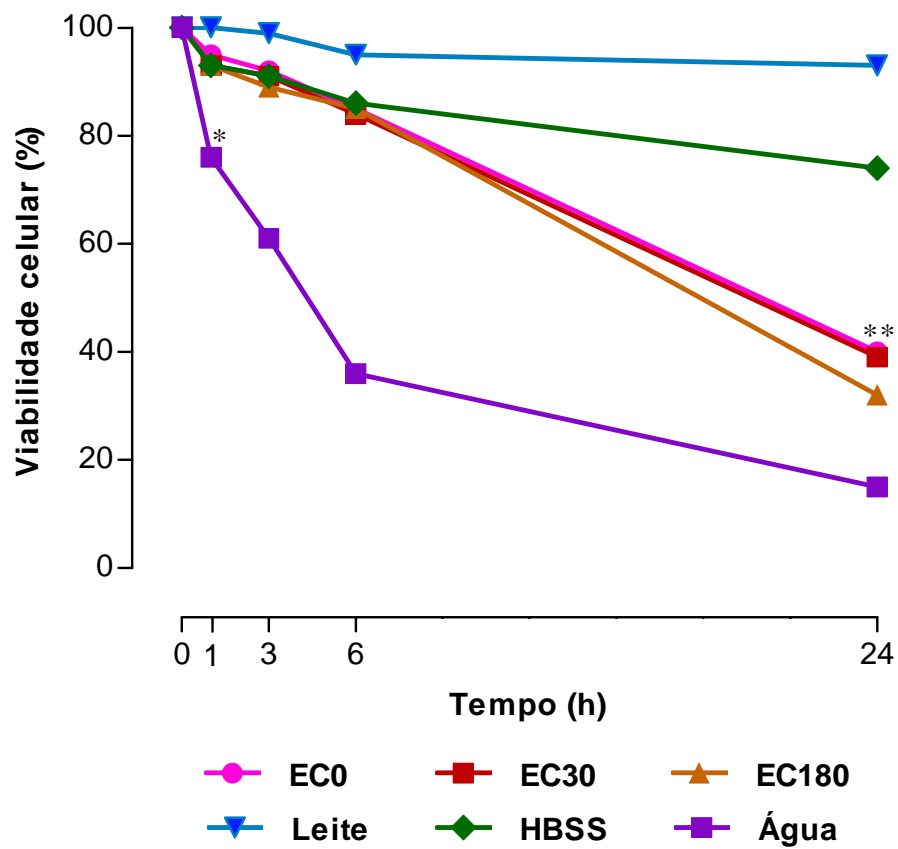


Figura 3. Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 24h sob a temperatura de 25°C. O valor de n=5, em triplicata. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a água destilada e os demais meios. **Diferença estatisticamente significativa entre os EC em relação ao leite e à HBSS ($p < 0,05$). Modelos lineares de efeitos mistos.

A viabilidade das células do ligamento periodontal mantidos nos diferentes meios de estocagem a 4°C está representada na Figura 4. No tempo de 24h, os EC0, EC30 e EC180 apresentaram valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) quando comparados ao leite na mesma temperatura. Com relação à água destilada, foi observada diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) a partir das três horas para todos os meios estudados.

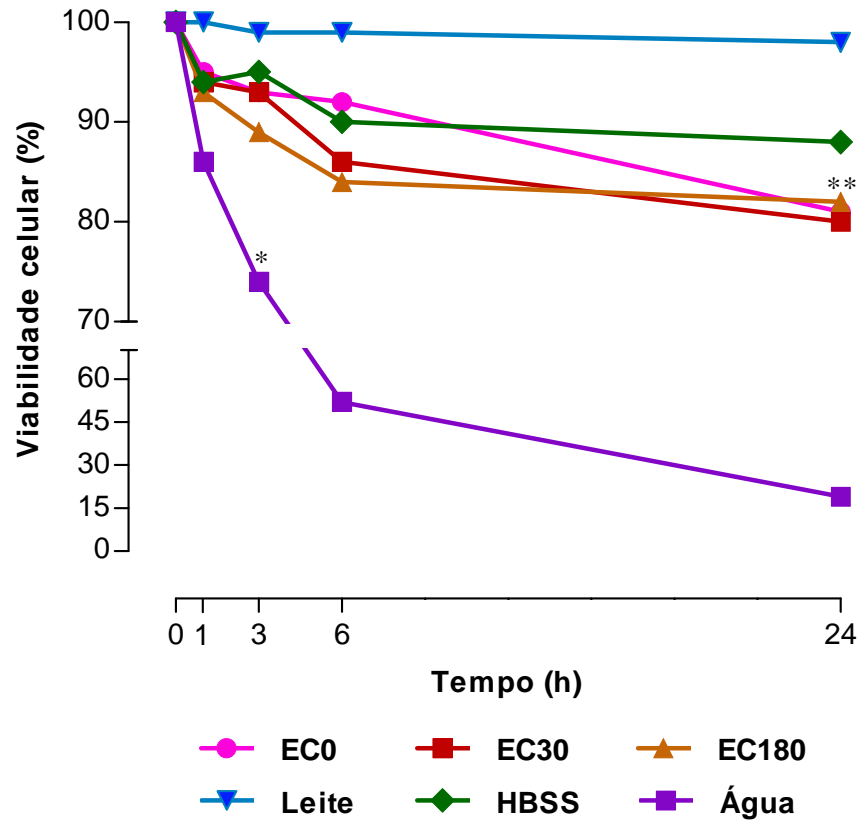


Figura 4. Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, analisadas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação por 24h sob a temperatura de 4°C. O valor de n=5, em triplicata. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a água destilada e os demais meios. **Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os EC e o leite. Modelos lineares de efeitos mistos.

5.2 Viabilidade celular verificada pelo método colorimétrico à base de tetrazolato (MTT)

Os resultados da viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura e testadas nos diferentes meios de estocagem por um período de 24h sob a temperatura de 25°C podem ser observados na Figura 5. Os EC apresentaram redução drástica nos valores da densidade óptica (absorbância), tornando-se estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) dos controles positivos a partir da primeira hora, e semelhantes ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo, água destilada, a partir do tempo de 12h. Deve ser mencionado que, entre os diferentes controles positivos utilizados, o leite manteve uma viabilidade elevada ao longo do período estudado, apresentando os resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação à HBSS e ao MEM, a partir da primeira hora.

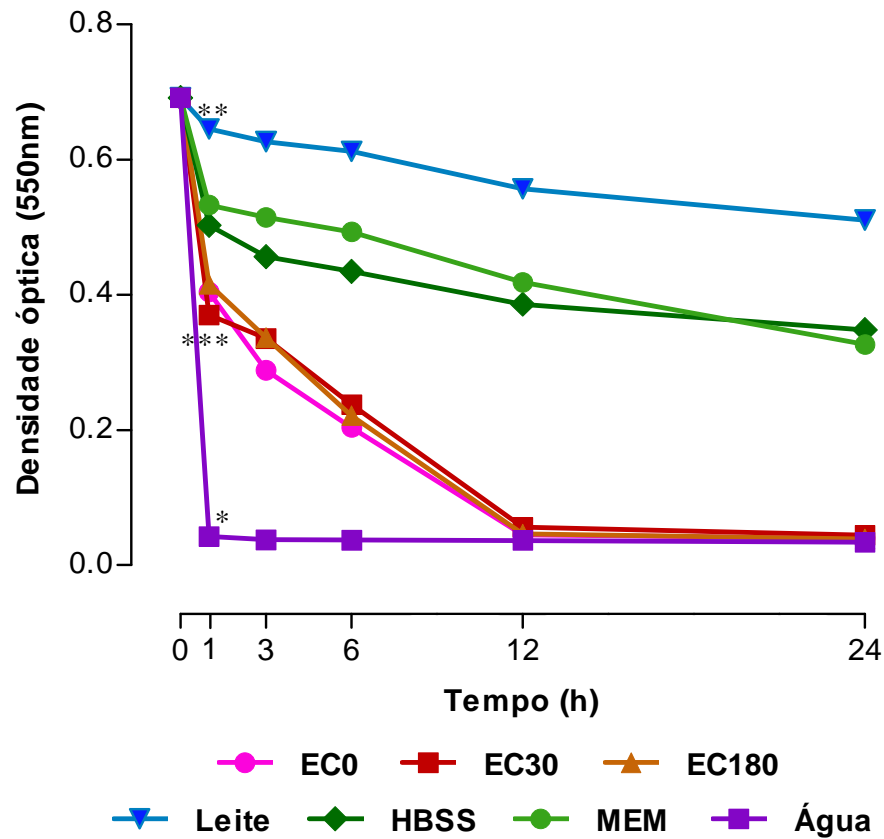


Figura 5. Médias das densidades ópticas obtidas pelo método colorimétrico do MTT, representando a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, após incubação por 24h sob a temperatura de 25°C. O valor de n=7, em triplicata. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a água destilada e os demais meios. **Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre o leite e os demais meios. *Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre os EC em relação à HBSS e ao MEM. ANOVA Fatorial, Teste de contraste.**

A Figura 6 apresenta as médias das densidades ópticas que representam a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura e incubadas sob a temperatura de 4°C nos diferentes meios de estocagem por um período de 24h. A partir da primeira hora, os EC foram diferentes ($p < 0,05$) do controle leite, mas não em relação à HBSS e ao MEM ($p > 0,05$), também considerados controles positivos. Os meios EC0, EC30, EC180 e MEM se diferenciaram estatisticamente do controle HBSS no tempo de 24h ($p < 0,05$). A partir da primeira hora todos os meios estudados foram estatisticamente diferentes da água destilada ($p < 0,05$).

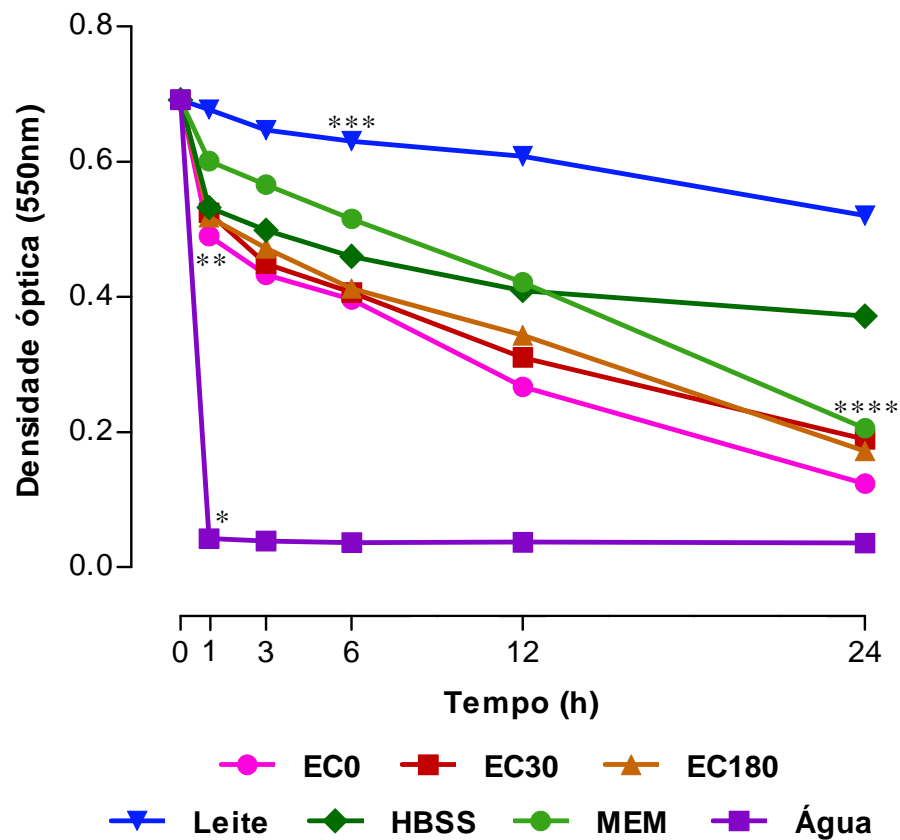


Figura 6. Médias das densidades ópticas obtidas pelo método colorimétrico do MTT, representando a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, após incubação por 24h sob a temperatura de 4°C. O valor de n=7, em triplicata. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a água destilada e os demais meios. **Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os EC e a HBSS em relação ao leite. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o leite e o MEM. ****Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os EC e o MEM em relação à HBSS. ANOVA Fatorial, Teste de contraste.**

Adicionalmente, para a análise da possível influência da temperatura na viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, durante a incubação com os meios considerados controles, os experimentos foram repetidos com a HBSS e o MEM, os quais foram mantidos em estufa sob condições ideais de ambiente e temperatura de 37°C. Observou-se que os meios se comportaram de forma diferente frente às mudanças da temperatura (Figura 7), em especial a viabilidade no MEM. Este, no tempo de 24h, foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) da HBSS, sob as temperaturas de 37°C e 4°C.

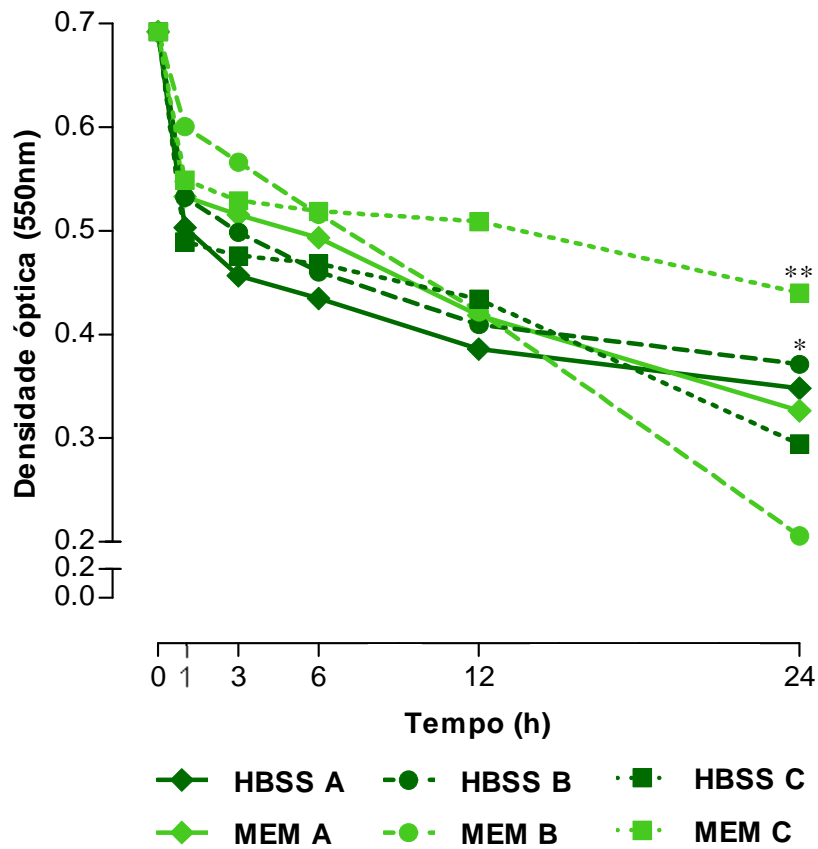


Figura 7. Médias das densidades ópticas obtidas pelo método colorimétrico do MTT, representando a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, após incubação em HBSS e MEM por 24h sob diferentes temperaturas. A. 25°C, B. 4°C e C. 37°C. O valor de n=7 para A e B; n= 3 para C; todos em triplicata. *Diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre HBSS e MEM a 4°C. **Diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre HBSS e MEM a 37°C. ANOVA Fatorial, Teste de contraste.

Um resumo com os valores das médias da viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, analisadas pelas duas metodologias e comparando-se as diferentes temperaturas, são apresentados na Tabela 3. Observa-se que para a metodologia de exclusão por azul de tripan, os EC0, EC30 e EC180 apresentaram valores médios da viabilidade estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre as temperaturas de 25°C e 4°C apenas para o tempo de incubação de 24h. Já para a metodologia do MTT, os EC30 e EC180 apresentaram valores médios da densidade óptica estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre as temperaturas de 25°C e 4°C para o período de incubação de 1h a 24h. O EC0 se diferenciou estatisticamente ($p < 0,05$) entre as temperaturas de 25°C e 4°C apenas para os tempos de incubação de 3h, 6h e 12h.

Tabela 3. Médias da viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura, analisadas pelas duas metodologias, após incubação por 24h sob diferentes temperaturas. O valor de n=7, em triplicata para MTT; n=5, em triplicata para tripan.

EC0					EC30					EC180				
Tempo (h)	25°C		4°C		Tempo (h)	25°C		4°C		Tempo (h)	25°C		4°C	
	Tripan	MTT	tripan	MTT		tripan	MTT	tripan	MTT		tripan	MTT	tripan	MTT
0	100(0) ¹	0,692(0,051) ²	100(0)	0,692(0,051)	0	100(0)	0,692(0,051)	100(0)	0,692(0,051)	0	100(0)	0,692(0,051)	100(0)	0,692(0,051)
1	95(2)	0,404(0,092)	95(2)	0,490(0,098)	1	93(2)	0,370(0,083)*	94(3)	0,525(0,083)*	1	93(2)	0,416(0,106)*	93(5)	0,518(0,100)*
3	92(3)	0,289(0,065)*	93(1)	0,433(0,093)*	3	91(5)	0,336(0,084)*	93(2)	0,449(0,095)*	3	89(5)	0,337(0,085)*	89(6)	0,472(0,110)*
6	85(6)	0,204(0,067)*	92(4)	0,397(0,086)*	6	84(10)	0,238(0,069)*	86(9)	0,406(0,090)*	6	85(6)	0,221(0,068)*	84(11)	0,413(0,096)*
12	-	0,045(0,008)*	-	0,267(0,053)*	12	-	0,056(0,012)*	-	0,310(0,072)*	12	-	0,046(0,007)*	-	0,344(0,106)*
24	40(12)*	0,040(0,009)	81(11)*	0,123(0,019)	24	39(12)*	0,044(0,010)*	80(5)*	0,189(0,033)*	24	32(10)*	0,039(0,008)*	82(13)*	0,172(0,030)*

1 Média (DP) da viabilidade (% relativa). Modelos lineares de efeitos mistos.

2 Média (DP) da densidade óptica. ANOVA Fatorial, Teste de contraste.

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as temperaturas de 25°C e 4°C.

6 DISCUSSÃO

6.1 Da concepção do trabalho

Neste trabalho, o EC, que é uma solução para estocagem hipotérmica de órgãos, foi testado devido ao interesse na sua possível utilização como um meio de estocagem para dentes avulsionados e, por isso, ele foi comparado aos meios tradicionalmente utilizados para esse fim.

O EC é comercializado apenas em embalagens que totalizam um litro ao serem misturadas para o uso. Devido à pequena quantidade necessária para imersão do dente avulsionado, tornou-se importante a verificação de sua atividade por alguns períodos de tempo após a abertura e manipulação. Inicialmente, o estudo foi delineado para os tempos EC0, EC30 e EC120. No entanto, as respostas alcançadas em 120 dias não foram muito diferentes daquelas obtidas em 30 dias e, por isso, ampliou-se o tempo para EC180, por ser este considerado um período razoável de estocagem.

Outro fator relevante considerado foi a recomendação, pelo fabricante, da manutenção do EC sob hipotermia após ser misturado. Visando sua possível utilização como meio de estocagem de dentes avulsionados, optou-se por testá-lo na temperatura ambiente (25°C), pois seria de extrema utilidade se mantivesse suas propriedades nessa temperatura, viabilizando o seu uso por socorristas. Os resultados obtidos foram comparados com o desempenho na temperatura ideal de uso (4°C). Essas duas temperaturas refletem as condições geralmente encontradas nos ambientes onde são mantidos os dentes pós avulsões acidentais, como podem ser o ambiente e a geladeira, respectivamente (LEKIC et al., 1996). Na literatura se relata experimentos realizados à temperatura ambiente (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF, 1981a e b; HILTZ; TROPE, 1991; HUANG et al., 1996; LEKIC et al., 1996; OLSON et al., 1997; ASHKENAZI et al., 2000, 2001; SCHWARTZ et al., 2002; CHAMORRO et al., 2006) e à temperatura de 4°C (BLOMLÖF, 1981a; HUANG et al., 1996; LEKIC et al., 1996; ASHKENAZI et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2002; CHAMORRO et al., 2008).

6.2 Das metodologias

O método de exclusão pelo corante azul de tripan é comumente utilizado para avaliar a viabilidade celular (SÖDER et al., 1977; BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF, 1981a e b; COURTS et al., 1983; GOPIKRISHNA et al., 2008). Optou-se por utilizá-lo por ser rápido, fácil e claramente diferenciar as células vivas das mortas (HILTZ; TROPE, 1991; SIGALAS et al., 2004). Consiste na avaliação da integridade física da membrana celular, porém não fornece resultados sobre a sua capacidade metabólica, que pode ser um dos fatores críticos na prevenção da reabsorção dentária após o reimplante de um dente avulsionado (MARTIN; PILEGGI, 2004).

Para superar essa lacuna, realizou-se o teste de viabilidade das células a partir da metodologia colorimétrica à base de tetrazolato, também conhecida como MTT. O sal de tetrazolato é um composto hidrossolúvel facilmente incorporado e reduzido pelas mitocôndrias das células viáveis, sendo convertido em cristais de formazan que ficam armazenados no citoplasma celular e são, depois, solubilizados pelo DMSO. Os valores de absorbância ou de densidade óptica são proporcionais à quantidade de formazan produzido, e conseqüentemente, ao número de células funcionalmente viáveis (MOSMANN, 1983; PARTOVI et al., 2002; KIM et al., 2006, 2007).

A literatura indica o leite e os meios de cultura celular como as opções mais adequadas para estocagem de dentes avulsionados a fim de se manter a viabilidade celular do ligamento periodontal e proporcionar um melhor prognóstico (COURTS et al., 1983; MELO et al., 2003; ANDERSSON et al., 2006; FLORES et al., 2007; SBTD 2008, 2010; CASAROTO; HIDALGO, 2009a e b). Por isso, neste estudo, o leite UHT integral, a HBSS e o MEM foram empregados como controles positivos, uma vez que forneceriam condições favoráveis às células durante todo o período experimental.

Em contrapartida, a água, no caso, destilada, é considerada desfavorável à manutenção das células por ser um meio hipotônico que causa rápida lise (MARINO et al., 2000; ANDERSSON et al., 2006) e tem apresentado resultados inadequados em ensaios *in vitro* e *in vivo* (HARKACZ et al. 1997, MARINO et al., 2000; PEARSON et al., 2003, SIGALAS et al. 2004), sendo utilizada neste trabalho como controle negativo.

Estudos *in vitro* demonstraram que o tempo extra-alveolar e as condições de estocagem afetam a viabilidade das células do ligamento periodontal (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; PATIL et al., 1994; LEKIC et al., 1996). O reimplante tardio após estocagem em condições desfavoráveis pode resultar em altas taxas de reabsorção e perda dentária (PETROVIC et al., 2010). Por isso, a efetividade do EC foi avaliada em períodos de tempo variando de 1h a 24h. Esse intervalo foi considerado clinicamente relevante (ASHKENAZI et al., 1999, 2000, 2001), uma vez que nem sempre o reimplante dentário pode ser realizado rapidamente após a avulsão. Os tempos de incubação inicialmente propostos foram de 1h, 3h, 6h e 24h. Contudo, alguns resultados obtidos pelo EC nos tempos de 6h e 24h justificaram uma avaliação intermediária às 12h.

Para a realização deste estudo, células de diferentes tipos e origens foram obtidas. Os primeiros experimentos foram realizados com células mononucleares de sangue periférico humano devido à facilidade e rapidez de obtenção (MELO et al., 2003). Em seguida, foram testadas células do ligamento periodontal de dentes extraídos, e estas simularam uma condição mais próxima ao que ocorre quando o dente é avulsionado. Finalmente, experimentos também foram executados com células do ligamento periodontal mantidas em cultura, uma vez que permitem trabalhar com concentração ideal e conhecida; no intervalo de passagens em que se encontram estabilizadas e no seu esplendor metabólico e funcional; além de possibilitar a realização de quantas repetições experimentais forem necessárias.

6.3 Dos resultados

O prognóstico dos dentes avulsionados tanto a curto, como em longo prazo, depende de um tratamento adequado e imediato (KARGUL; WELBURY, 2009). A viabilidade das células do ligamento periodontal é essencial para a cicatrização clínica dos dentes reimplantados (ASHKENAZI et al., 2000). Se o reimplante não pode ser realizado imediatamente, a viabilidade das células do ligamento periodontal pode ser mantida em um meio de estocagem favorável, e esse procedimento poderá diminuir a incidência de reabsorção radicular (BLOMLÖF, 1981a).

6.3.1 Pela metodologia de exclusão pelo azul de tripan

As células mononucleares humanas mantidas nos meios EC0, EC30 e EC120 não apresentaram diferenças na viabilidade entre si, sendo semelhantes aos controles positivos, diferindo apenas no tempo de 24h sob a temperatura de 25°C. Comparadas com o controle negativo, a viabilidade foi estatisticamente diferente (Figura 1). Para a temperatura de 4°C, a viabilidade das células estocadas nos EC0, EC30 e EC120 também não foi diferente, nem se comparada às duas temperaturas testadas (Figura 2). No entanto, em ambiente, os valores para EC estavam em torno de 78% e de 90% na geladeira, no tempo de 24h (Figuras 1 e 2), o que sugere uma tendência a um melhor desempenho quando mantidas à temperatura recomendada pelo fabricante.

Para as células do ligamento periodontal de dentes extraídos, o EC0 apresentou uma viabilidade (71%) semelhante ao leite (72%) e próximo à HBSS (77%) e diferente dos EC30 e EC180, demonstrando que recém aberto seu comportamento pode ser mais adequado sob a temperatura de 25°C (Tabela 1). Quando testados a 4°C e comparados, os EC propiciaram resultados semelhantes aos de 25°C (Tabela 2), evidenciando a vantagem de uso do produto novo, mas que a temperatura não teve influência na viabilidade celular.

Os experimentos com as células do ligamento periodontal mantidas em cultura mostraram um desempenho do EC semelhante ao observado com as mononucleares: valores próximos aos controles positivos, diferindo apenas no tempo de 24h sob a temperatura de 25°C; e, estatisticamente diferentes também do controle negativo (Figura 3). Para a temperatura de 4°C, a viabilidade dos EC não foi diferente entre si, mas em 24h, se distinguiu do leite e da água destilada (Figura 4). Com isso, constata-se que o tempo decorrido após a abertura e manipulação do EC não interfere na sua efetividade, mas sim a temperatura que, para um resultado satisfatório em 24h, deve ser aquela preconizada pelo fabricante. Quando comparados os EC nas duas temperaturas, é nítida a influência favorável da hipotermia sobre as células incubadas por maior período (24h – Tabela 3).

6.3.2 Pela metodologia colorimétrica à base de MTT

Sob a temperatura de 25°C, o desempenho das células do ligamento periodontal mantidas em cultura e incubadas com os EC foram semelhantes ao longo do tempo e já na primeira hora, as três soluções diferiram dos controles positivos ao sofreram uma queda acentuada alcançando, aproximadamente, metade do valor de densidade óptica inicial. Os EC igualaram-se à água destilada em 12h (Figura 5).

Quando mantidas a 4°C, as células incubadas nos EC0, EC30 e EC180 igualmente não diferiram entre si, mas sim em relação ao leite após uma hora e foram semelhantes ao MEM durante todo o período estudado. Entretanto, é pertinente lembrar que o MEM, utilizado habitualmente em culturas celulares, foi testado a 25°C e 4°C, e não em suas condições ideais de temperatura, CO₂ e umidade em estufa (CASAROTO, 2009), o que pode justificar o declínio na viabilidade celular observado para este meio, de forma menos pronunciada a 25°C e mais acentuada a 4°C, após seis horas (Figura 6). Quando mantido em estufa com 5% CO₂/95% umidade, a 37°C, a viabilidade destas células tiveram valores praticamente constantes durante o período de 24h (Figura 7). Um fato importante observado é que a HBSS apresentou uma queda acentuada em relação ao MEM para a temperatura de 37°C, e este comportamento poderia ser explicado pela constatação que a HBSS não é meio mais indicado para a manutenção de cultura de células do ligamento periodontal, já que nada mais é que uma solução salina com indicador de pH.

Vários estudos mostraram que a temperatura do meio de estocagem afeta a viabilidade das células do ligamento periodontal (BLOMLÖF, OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF, 1981a; LEKIC et al., 1998; SCHWARTZ et al., 2002), mais precisamente, as baixas temperaturas foram confirmadas em estudos *in vitro* como responsáveis por permitirem que um maior número de células permaneçam viáveis (BLOMLÖF, OTTESKOG, 1980; HUANG et al., 1996; LEKIC et al., 1996; SIGALAS et al., 2004). Blomlöf e Otteskog (1980) verificaram que a estocagem sob temperatura de 4°C foi ligeiramente melhor para a viabilidade das células do que sob temperaturas elevadas (20°C e 37°C). Corroborando esses achados, os resultados apresentados na Tabela 3 demonstraram que quando comparados os EC nas duas temperaturas, o material mantido em hipotermia recém aberto foi estatisticamente melhor que o

mantido em ambiente para os tempos de incubação de uma e 24h, e aqueles abertos há 30 ou 180 dias tiveram desempenho mais favorável em todos os tempos. Contrapondo-se, outro estudo *in vitro* constatou que a viabilidade e a capacidade clonogênica das células do ligamento periodontal foram melhores quando estocadas em temperatura ambiente (22°C) do que a temperatura de 4°C (ASHKENAZI et al., 2000) e Andreasen et al. (1995) demonstraram não haver melhora clínica para os dentes reimplantados após serem estocados na geladeira, resultando em extensa reabsorção radicular após o reimplante. Essas aparentes contradições podem ser explicadas por diferenças na técnica de cultura e nos métodos de avaliação da viabilidade celular ou pelo comportamento dos diferentes meios de estocagem.

6.4 O Euro-Collins®

Os resultados do estudo *in vivo* realizado em cães demonstraram que a solução de EC foi considerada adequada como meio de estocagem por até 8h, a 4°C, quando analisadas histologicamente após três meses dos reimplantes (SOTTOVIA et al., 2010). No presente trabalho, os achados utilizando a metodologia de exclusão pelo azul de tripan com as células mononucleares e do ligamento periodontal de dentes extraídos ou mantidas em cultura corroboram parcialmente esses dados, pois apontaram o EC como meio de estocagem apropriado por até seis horas, quando a viabilidade celular começa a decrescer até 24h. As células continuam com sua membrana íntegra, entretanto já se encontram metabolicamente inativas, considerando o resultado obtido pelo MTT. E, como já esperado, por ser recomendação do fabricante, a estocagem hipotérmica propiciou resultados superiores aos obtidos sob a temperatura de 25°C.

Diferenças entre resultados *in vivo* e *in vitro* têm sido relatadas na literatura e o melhor desempenho daqueles, provavelmente se deve ao dinâmico processo de reparo e/ou cicatrização, assim como a interação entre as diversas células e mediadores envolvidos *in vivo* e que não podem ser adequadamente reproduzidas *in vitro*. (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF, 1981a e b; BLOMLÖF et al., 1983; TROPE; FRIEDMAN, 1992).

A análise de alguns meios de estocagem demonstrou que a composição química tem menor influência do que a osmolalidade na capacidade de manter as células do ligamento periodontal viáveis (ANDREASEN, 1981; LINDSKOG;

BLOMLÖF, 1982). O crescimento celular pode ocorrer em uma osmolalidade de 230 a 400 mOsm/kg, sendo mais favorável na faixa de 290 a 330 mOsm/kg (WAYMOUTH, 1970; LINDSKOG; BLOMLÖF, 1982). Uma combinação de osmolalidade e pH fisiológicos pode ser um fator crítico para a sobrevivência celular nos meios de estocagem (MARINO et al., 2000). Um ótimo crescimento celular é obtido em pH entre 7,2 a 7,4; mas, as células podem sobreviver em um pH entre 6,6 a 7,8 (PAUL, 1970). Assim, alguns resultados desfavoráveis aqui relatados podem ser devido à composição de eletrólitos ou à hiperosmolaridade das soluções que atuaram em contato íntimo e direto com as células e não ao pH das diferentes soluções de EC utilizadas que se mantiveram dentro dos limites fisiológicos (7,3 a 7,4 – dados não apresentados). A osmolaridade do EC encontra-se entre 402 (RAUEN; GROOT, 2008) e 420 mOsm/L (JASSEM et al., 2006), muito acima da fisiológica descrita (FRESHNEY, 2005).

7 CONCLUSÕES

Com base nas metodologias utilizadas e nos resultados obtidos, constata-se que:

- para a metodologia de exclusão pelo azul de tripan, os EC apresentaram valores de viabilidade semelhantes aos controles positivos, leite e HBSS, até 6h para as células mononucleares de sangue periférico humano; e, para as células do ligamento periodontal de dentes humanos extraídos, EC30 e EC180 foram inferiores aos controles supracitados;
- para as células do ligamento periodontal humano em cultura celular os EC apresentaram resultados semelhantes ao controle positivo, leite, até 6h para as temperaturas de 25°C e a e 4°C, quando analisadas pelo azul de tripan e diferentes já na primeira hora, pela metodologia colorimétrica à base de MTT;
- o EC pode ser mantido assepticamente por até 180 dias conservando os mesmos efeitos do produto recém-aberto, como atestam os ensaios com células mononucleares e do ligamento periodontal em cultura para as duas metodologias analisadas;
- a utilização do EC, sob a temperatura recomendada pelo fabricante (4°C), promove a obtenção de resultados mais favoráveis que os obtidos sob a temperatura de 25°C, como demonstrado com a metodologia à base do MTT, utilizando células do ligamento periodontal em cultura.

Assim sendo, pode-se afirmar que:

- o EC poderia ser utilizado até 180 dias depois de aberto e sob temperatura de 4°C pela semelhança de resultados com o controle positivo HBSS por 12h, porém, apesar de apresentarem integridade da membrana celular, as células estão funcionalmente inativas;
- estudos *in vivo* apresentam resultados mais satisfatórios para o uso do EC que *in vitro*;
- o leite, tradicionalmente utilizado para estocagem de dentes avulsionados, continua sendo a opção mais efetiva, prática e acessível.

E, finalmente, concluir que:

O Euro-Collins® tem efetividade semelhante à HBSS, tradicionalmente indicada, por até 12h a 4°C. No entanto, para sua recomendação como meio de estocagem de dentes avulsionados, estudos *in vivo* adicionais devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

American Type Culture Collection. MTT Cell Proliferation Assay Instructions. *Catalog Number 30-1010K*, 2001.

ANDERSSON, L; AL-ASFOUR, A; AL-JAME, Q. Knowledge of first-aid measures of avulsion and replantation of teeth: an interview of 221 Kuwaiti schoolchildren. *Dent Traumatol*, v. 22, p. 57-65, 2006.

ANDREASEN, J.O. Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. A clinical study of 1298 cases. *Scand J Dent Res*, v. 78, p. 329-342, 1970.

ANDREASEN, J.O. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg*, v. 10, p. 43-53, 1981.

ANDREASEN, J.O.; BORUM, M.K.; JACOBSEN, H.L.; ANDREASEN, F.M. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol*, v. 11, p. 76-89, 1995.

ASHKENAZI, M.; MAROUNI, M.; SARNAT, H. *In vitro* viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature. *Endod Dent Traumatol*, v. 16, p. 63-70, 2000.

ASHKENAZI, M.; MAROUNI, M.; SARNAT, H. *In vitro* viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament fibroblasts after storage in four media supplemented with growth factors. *Dent Traumatol*, v. 17, p. 27-35, 2001.

ASHKENAZI, M.; SARNAT, H.; KEILA, S. *In vitro* viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. *Endod Dent Traumatol*, v. 15, p. 149-156, 1999.

BARRET, E.J.; KENNY, D.J. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod Dent Traumatol*, v. 13, p. 153-163, 1997.

BLOMLÖF, L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed Dent J*, suppl. 8, p. 1-26, 1981a.

BLOMLÖF, L. Storage of human periodontal ligament cells in a combination of different media. *J Dent Res*, v. 60, p. 1904-1906, 1981b.

BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S.; ANDERSSON, L.; HEDSTROM, K.G.; HAMMARSTRÖM, L. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to reimplantation. *J Dent Res*, v. 89, p. 251-259, 1983.

BLOMLÖF, L.; OTTESKOG, P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res*, v. 88, p. 436-440, 1980.

BLOMLÖF, L.; OTTESKOG, P.; HAMMARSTRÖM, L. Effect of storage in media with different ion strenghts and osmolalities on human periodontal ligament cells. *Scand. J Dent Res*, v. 89, p. 180-187, 1981.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, v. 97, p. 77-89, 1968.

CASAROTO, A.R. *Estudo da eficácia do extrato de própolis como meio de estocagem de dentes avulsionados*. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

CASAROTO, A.R.; HIDALGO, M.M. *Traumatismos dentários: saiba como agir corretamente*. Secretaria da Saúde do município de Maringá. 2009a. 8p.

CASAROTO, A.R.; HIDALGO, M.M. *Guia Prático - Traumatismos dentários: saiba como agir corretamente*. Secretaria da Saúde do município de Maringá. 2009b. 6p.

CHAMORRO, M.M.; REGAN, J.D.; OPPERMAN, L.A.; KRAMER, P.R. Effect of storage media on human periodontal ligament cell apoptosis. *Dent Traumatol*, v. 24, p. 11–16, 2008.

COHEN, S.; HARGREAVES, K.M. *Caminhos da polpa*. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007. 1104p.

COLLINS, G.M. What solutions are best? Overview of flush solutions, *Transplant Proc*, v. 29, p. 3543-3544, 1997.

CONSOLARO, A. *Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas*. 2ed. Maringá: Dental Press. 2005.

COURTS, F.J.; MUELLER, W.A.; TABELING, H.J. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. *Pediatr Dent*, v. 5, p.183-186, 1983.

FLORES, M. T.; ANDERSSON, L.; ANDREASEN, J.O.; BAKLAND, L. K.; MALMGREN, B.; BARNETT, F.; BOURGUIGNON, C.; DIANGELIS, A.; HICKS, L.; SIGURDSSON, A.; TROPE, M.; TSUKIBOSHI, M.; VON ARX, T. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol*, v. 23, p.130-136, 2007.

FRESHNEY,RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 4th ed. Hoboken: John Wiley & Sons. 2000. 577p.

GOPIKRISHNA, V.; BAWEJA, P.S.; VENKATESHBABU, N.; THOMAS, T.; KANDASWAMY, D. Comparison of coconut water, propolis, HBSS, and milk on PDL cell survival. *J Endod*, v. 34, p. 587-589, 2008.

HARKACZ, O.M.; CARNES, D.L.; WALKER, W.A. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* v. 23, p. 687-690, 1997.

HILTZ, J.; TROPE; M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hanks balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod Dent Traumatol*, v. 7, p. 69–72, 1991.

HUANG, S.C.; REMEIKIS, N.A.; DANIEL, J.C. Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endod*, v. 22, p. 30-33, 1996.

JASSEM, W.; ARMENI, T.; QUILES, J.L.; BOMPADRE, S.; PRINCIPATO, G.; BATTINO, M. Protection of mitochondria during cold storage of liver and following transplantation: comparison of the two solutions, University of Wisconsin and EuroCollins. *J Bioenerg Biomembr*, v. 38, p. 49-55, 2006.

KARGUL, B.; WELBURY, R. An audit of the time to initial treatment in avulsion injuries. *Dent Traumatol*, v. 25, p.123-125, 2009.

KIM, E.; JEON, I.S.; KIM, J.W.; KIM, J.; JUNG, H-S.; LEE, S.J. An MTT-based method for quantification of periodontal ligament cell viability. *Oral Dis*, v. 13, p. 495-499, 2007.

KIM, H.S.; PARK, J.W.; YEO, S.I.; CHOI, B.J.; SUH, J.Y. Effects of high glucose on cellular activity of periodontal ligament cells *in vitro*. *Diabetes Res Clin Pract*, v. 74, p. 41-47, 2006.

LEKIC, P.C.; KENNY, D.J.; BARRET, E.J. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *Int Endod J*, v. 31, p. 137-140, 1998.

LEKIC, P.C.; KENNY, D.J.; MOE, H.K.; BARRET, E.J. McCULLOCH, C.A.G. Relationship of clonogenic capacity to plating efficiency and vital dye staining of human periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *J Periodont Res*, v. 31, p. 294-300, 1996.

LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L. Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. *Acta Odontol Scand*, v. 40, p. 435-441, 1982.

LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L.; HAMMARSTRÖM, L. Mitoses and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res*, v. 91, p. 465-472, 1983.

LOH T, SAE-LIM V, YIAN TB, LIANG S. Dental therapists' experience in the immediate management of traumatized teeth. *Dent Traumatol*, v. 22, p. 66-70, 2006.

MARINO, T.; WEST, L.A.; LIEWEHR, F.R.; MAILHOT, J.M.; BUXTON, T.B.; RUNNER, R.R.; McPHERSON, J.C. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. *J Endod*, v. 26, p. 699-702, 2000.

MARTIN, M.P.; PILEGGI, R. A quantitative analysis of propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol*, v. 20, p.85-89, 2004.

MELO, D.F.; SELL, A.M.; LOPES, C.M.; HIDALGO, M.M. Viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados. *Acta Sci*, v. 25, p.69-74, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, v. 65, p. 55-63, 1983.

OH, Y.H.; CHE, Z.M.; HONG, J.C.; LEE, E.J.; LEE, S.J.; KIM, J. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank – A preliminary study. *Cryobiology*, v. 51, p. 322-329, 2005.

OLSON, B.D.; MAILHOT, J.M.; ANDERSON, R.W.; SCHUSTER, G.S.; WELLER, R.N. Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. *J Endod*, v. 23, p. 676-679, 1997.

PARTOVI, M.; SADEGHEIN, A.; AZIZI, E.; OSTAD, S.N. Mitogenic effect of L-dopa on human periodontal ligament fibroblast cells. *J Endod*, v. 28, p. 193-196, 2002.

PATIL, S.; DUMSHA, TC.; SYDISKIS, RJ. Determining periodontal ligament (PDL) cell viability from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. *Int Endod J*, v. 27, p. 1-5, 1994.

PAUL, J. The cell and its environment. Media for culturing cells and tissues. Part I. Natural media. II. Defined media in *Cell and Tissue Culture*. 4th ed. London: E & S Livingstone, 1970, p. 52-119.

PEARSON, R.M.; LIEWEHR, F.R.; WEST, L.A.; PATTON, W.R.; McPHERSON, J.C.; RUNNER, R.R. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. *J Endod*, v. 29, p. 184-186, 2003.

PETROVIC, B.; MARKOVIC, D.; PERIC, T.; BLAGOJEVIC, D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol*, v. 26, p. 52-59, 2010.

PETTIETTE, M.; HUPP, J.; MESAROS, S.; TROPE, M. Periodontal healing of extracted dogs' teeth air-dried for extended periods and soaked in various media. *Endod Dent Traumatol*, v. 13, p. 113-118, 1997.

RAPHAEL, S.L.; GREGORY, P.J. Parenteral awareness of the emergency management of avulsed teeth in children. *Aust Dent J*, v. 35, p. 130–133, 1990.

RAUEN, U; GROOT, H. Inherent toxicity of organ preservation solutions to cultured hepatocytes. *Cryobiology*, v. 56, p. 88-92, 2008.

SANTOS, C.L.V.; SONODA, C. K.; POI, W.R.; PANZARINI, S.R.; SUNDEFELD, M.L.M.M.; NEGRI, M.R. Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dent Traumatol*, v. 25, p. 51-57, 2009.

SBTD. Disponível em: <<http://www.sbtbd.org.br/>> Acessos em: 08 de abril de 2008 e 10 de janeiro de 2010.

SCHWARTZ, O.; ANDREASEN, F.M.; ANDREASEN, J.O. Effects of temperature, storage time and media on periodontal and pulpal healing after replantation of incisors in monkeys. *Dent Traumatol*, v. 18, p. 190-195, 2002.

SIGALAS, E.; REGAN, J.D.; KRAMER, P.R.; WITHERSPOON, D.E.; OPPERMAN, L.A. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dent Traumatol*, v. 20, p. 21-28, 2004.

SÖDER, P.Ö.; OTTESKOG, P.; ANDREASEN, J.O.; MODÉER, T. Effect of drying on viability of periodontal membrane. *Scand J Dent Res*, v. 85, p. 164-168, 1977.

SOTTOVIA, A.D. *Reimplante tardio após a manutenção do dente em solução de Euro-Collins® ou leite bovino: Análise histomorfométrica em cães*. 2007. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2007.

SOTTOVIA, A.D.; SOTTOVIA FILHO, D.; POI, W.R.; PANZARINI, S.R.; LUIZE, D.S.; SONODA, C.K. Tooth replantation after use of Euro-Collins solution or bovine milk as storage medium: a histomorphometric analysis in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 68, p. 111-119, 2010.

SOUSA, H.A.; ALENCAR, H.G.; BRUNO, K.F.; BATISTA, A.C.; CARVALHO, A.C.P. Microscopic evaluation of the effect of different storage media on the periodontal ligament of surgically extracted human teeth. *Dent Traumatol*, v. 24, p. 628-632, 2008.

TROPE, M. Clinical management of the avulsed tooth. *Dent Clin North Am*, v. 39, p. 93-112, 1995.

TROPE, M.; FRIEDMAN, S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol*, v. 8, p. 183-188, 1992.

WAYMOUTH C. Osmolarity of mammalian blood ad media for culture of mammalian cells. *In Vitro*, v. 6, p. 109-127, 1970.

ANEXO A


Universidade Estadual de Maringá

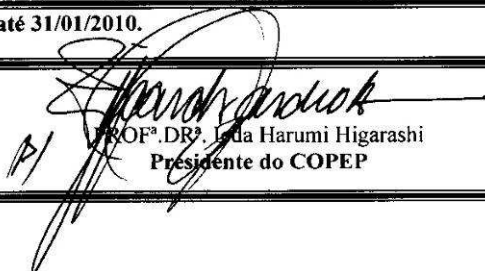
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Registrado na CONEP em 10/02/1998

CAAE Nº. 0158.0.093.000-08

PARECER Nº. 351/2008

Pesquisador (a) Responsável: Mirian Marubayashi Hidalgo	
Centro/Departamento: CCS/DOD	
Título do projeto: Euro-Collins como meio de conservação de dentes avulsionados.	
Considerações: <p>O projeto em questão havia ficado pendente por falta de detalhamento de aspecto metodológico, quanto a coleta de material de estudo, no projeto. Também havia a necessidade de apresentação de autorização do Departamento de Análises Clínicas quanto ao uso de suas instalações, bem como de materiais (reagentes), no valor de R\$ 1.254,00, conforme indicado no orçamento do projeto. E, ainda, declaração de inexistência de conflitos de interesse por parte da fabricante, Fresenius Kabi, pois consta no orçamento a doação do material a ser pesquisado, no valor de R\$ 1.050,00.</p> <p>Considerando que as pendências foram atendidas, conforme documentos em anexo (projeto com metodologia readequada, declaração do fabricante do Euro Collins de inexistência de conflito de interesses e do Departamento de Análises Clínicas da UEM para uso de instalações/material), somos de parecer favorável a aprovação do projeto.</p>	
Situação: APROVADO	
A pesquisadora deverá apresentar o relatório final até 31/01/2010.	
O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução nº. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 156ª reunião do COPEP em 18/07/2008.	 PROF. DR. Tada Harumi Higarashi Presidente do COPEP

ANEXO B**INFORMAÇÕES SOBRE O EURO-COLLINS®¹****Euro-Collins®****Para perfusão de órgãos em transplante**

A embalagem contém:

- 1 frasco com 1000 ml de solução de Glicose 3,57%
- 1 frasco-ampola com 20 ml de solução de Eletrólitos

Indicações

Perfusão gravitacional hipotérmica e estocagem hipotérmica de rins para doação.

Contraindicações, efeitos colaterais e reações adversas

Não são conhecidas contraindicações. Se usado conforme o recomendado, não são esperados efeitos colaterais ou reações adversas.

Observações

Não usar para infusão intravenosa.

Manter em temperatura ambiente.

Usar somente se as soluções estiverem límpidas e seus recipientes intactos.

Solução I

Glicose monoidratada para injeção.....	39,27 g
= glicose anidra para injeção (35,70 g)	
Água para injeção q.s.p.	1000 ml

Solução II

Fosfato monobásico de potássio.....	2,09 g
Fosfato bibásico de potássio.....	7,55 g
Cloreto de potássio.....	1,14 g
Bicarbonato de sódio.....	0,86 g
Água para injeção q.s.p.	20 ml

Composição da solução pronta para uso em perfusão (Solução I e II)

Antes do uso, misturar 1000 ml de solução de glicose 3,57% com 20 ml de solução de eletrólitos, em condições estéreis.

Isto perfaz 1020 ml de solução, dos quais, 1000 ml contêm:

Fosfato monobásico de potássio.....	2,05 g
Fosfato bibásico de potássio.....	7,40 g
Cloreto de potássio.....	1,12 g
Bicarbonato de sódio.....	0,84 g
Glicose monoidratada para injeção.....	38,50 g
= glicose anidra para injeção (35,00 g)	
Água para injeção q.s.p.	1000 ml

¹ Informações obtidas no rótulo, na bula do produto e na tese de Sottovia (2007).

Conteúdo Eletrolítico:

K ⁺	115 mEq/l
Na ⁺	10 mEq/l
Cl ⁻	15 mEq/l
HCO ₃ ⁻	10 mEq/l
H ₂ PO ₄ ⁻	15 mEq/l
HPO ₄ ⁻	85 mEq/l
Osmolaridade teórica.....	529mosm/l

Método de esterilização

Sol. glicose: temperatura de 106°C por 40 minutos. 1 kg pressão

Ampola: temperatura de 121°C por 10 minutos. 1,7 kg pressão

Esterilização em autoclave de contrapressão.

Vias de administração e / ou modo de usar

Retirar a tampa flip-off do frasco de vidro

Fazer a assepsia da ampola de eletrólitos

Retirar com a seringa o conteúdo de 20 ml da ampola e injetar pela rolha do frasco de plástico contendo a solução de glicose 3,57%.

Agitar bem o frasco para homogeneizar o conteúdo.

Conectar equipo estéril para perfusão com a tampa do frasco, colocar o equipo no adaptador e ligar na respectiva artéria do órgão a ser perfundido conforme técnica adotada pela equipe médica.

Advertências e / ou precauções**Restrições ou cuidados que devem ser considerados**

A solução de Euro-Collins[®] é uma solução para perfusão de órgãos a serem transplantados.

Não deve ser usada depois de expirado o prazo de validade.

Cuidados de armazenagem e transporte:

O transporte deve ser feito de modo que não ocorra modificação brusca de temperatura em relação ao produto.

O acondicionamento deverá ser o melhor possível durante o transporte para evitar danos físicos ao produto.

Registro Ministério da Saúde: 1.00041.00066

Farm. Resp.: Jean Gomes de Souza CRF SP – 6023

Fresenius Kabi Brasil Ltda.

Rua Francisco P. Coutinho, 347

Campinas – SP Ind. Brasileira

C.N.P.J. 49.324.221./0001-04

SAC 0800 707 38 55

APÊNDICE A

Células mononucleares provenientes do sangue periférico humano

Porcentagem relativa das médias da viabilidade celular obtidas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação das células mononucleares do sangue periférico humano nos diferentes meios de estocagem para dentes avulsionados por um período de 24h, sob temperatura de 25°C (n= 4, em triplicata).

EC0		0h	1h	3h	6h	24h
	Rep.1	100	89	82	82	71
	Rep.2	100	96	93	93	83
	Rep.3	100	95	91	91	85
	Rep.4	100	94	93	90	82
	Média	100	94	90	89	80
DP	0	3	5	5	6	
EC30		0h	1h	3h	6h	24h
	Rep.1	100	95	95	94	77
	Rep.2	100	92	92	91	93
	Rep.3	100	94	94	89	62
	Rep.4	100	96	94	93	82
	Média	100	94	94	92	79
DP	0	2	1	2	13	
EC120		0h	1h	3h	6h	24h
	Rep.1	100	89	86	86	84
	Rep.2	100	87	86	86	68
	Rep.3	100	90	87	87	70
	Rep.4	100	91	85	79	76
	Média	100	89	86	85	75
DP	0	2	1	4	7	
Leite		0h	1h	3h	6h	24h
	Rep.1	100	99	98	99	92
	Rep.2	100	99	99	98	91
	Rep.3	100	98	97	98	97
	Rep.4	100	97	98	100	93
	Média	100	98	98	99	93
DP	0	1	1	1	3	

		0h	1h	3h	6h	24h
HBSS	Rep.1	100	95	95	92	90
	Rep.2	100	100	98	98	97
	Rep.3	100	99	100	99	100
	Rep.4	100	99	97	96	95
	Média	100	98	98	96	96
	DP	0	2	2	3	4

		0h	1h	3h	6h	24h
Água	Rep.1	100	0	0	0	0
	Rep.2	100	0	0	0	0
	Rep.3	100	0	0	0	0
	Rep.4	100	0	0	0	0
	Média	100	0	0	0	0
	DP	0	0	0	0	0

Porcentagem relativa das médias da viabilidade celular obtidas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação das células mononucleares do sangue periférico humano nos diferentes meios de estocagem para dentes avulsionados por um período de 24h, sob temperatura de 4°C (n= 4, em triplicata).

		0h	1h	3h	6h	24h
EC0	Rep.1	100	91	90	89	86
	Rep.2	100	96	97	96	96
	Rep.3	100	100	97	96	96
	Rep.4	100	97	98	94	88
	Média	100	96	96	94	92
	DP	0	4	4	3	5

		0h	1h	3h	6h	24h
EC30	Rep.1	100	100	97	97	97
	Rep.2	100	95	92	92	93
	Rep.3	100	97	96	94	91
	Rep.4	100	98	97	90	91
	Média	100	98	96	93	93
	DP	0	2	2	3	3

		0h	1h	3h	6h	24h
EC120	Rep.1	100	92	91	91	87
	Rep.2	100	92	89	89	83
	Rep.3	100	91	96	93	83
	Rep.4	100	96	90	90	90
	Média	100	93	92	91	86
	DP	0	2	3	2	3

APÊNDICE B

Células provenientes de dente humano extraído

Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células do ligamento periodontal de dentes extraídos obtidas pelo método de exclusão por azul de tripan, mantidas nos diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados por um período de 3h, sob a temperatura de 25°C (n= 3, em triplicata).

EC0		3h
	Rep. 1	75
	Rep. 2	76
	Rep. 3	63
	Média	71
	DP	8
<hr/>		
EC30		3h
	Rep. 1	51
	Rep. 2	52
	Rep. 3	49
	Média	51
	DP	1
<hr/>		
EC180		3h
	Rep. 1	57
	Rep. 2	48
	Rep. 3	49
	Média	51
	DP	5
<hr/>		
Leite		3h
	Rep. 1	69
	Rep. 2	77
	Rep. 3	69
	Média	72
	DP	4
<hr/>		
HBSS		3h
	Rep. 1	82
	Rep. 2	70
	Rep. 3	78
	Média	77
	DP	6

Água		3h
	Rep. 1	30
	Rep. 2	25
	Rep. 3	29
	Média	28
	DP	3

Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células do ligamento periodontal de dentes extraídos obtidas pelo método de exclusão por azul de tripan, mantidas nos diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados por um período de 3h, sob a temperatura de 4°C (n= 3, em triplicata).

EC0		3h
	Rep. 1	78
	Rep. 2	74
	Rep. 3	74
	Média	75
	DP	2

EC30		3h
	Rep. 1	60
	Rep. 2	53
	Rep. 3	46
	Média	53
	DP	7

EC180		3h
	Rep. 1	56
	Rep. 2	48
	Rep. 3	60
	Média	54
	DP	6

APÊNDICE C

Células provenientes do ligamento periodontal humano mantidas em cultura

Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células mantidas em cultura, obtidas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação nos diferentes meios de estocagem para dentes avulsionados por um período de 24h sob a temperatura de 25°C (n= 5, em triplicata).

		0h	1h	3h	6h	24h
EC0	Rep.1	100	98	96	88	49
	Rep.2	100	93	92	90	49
	Rep.3	100	93	92	88	49
	Rep.4	100	96	92	81	28
	Rep.5	100	94	88	77	27
	Média	100	95	92	85	40
	DP	0	2	3	6	12

		0h	1h	3h	6h	24h
EC30	Rep.1	100	95	94	86	47
	Rep.2	100	92	98	96	47
	Rep.3	100	92	88	84	47
	Rep.4	100	94	93	86	32
	Rep.5	100	91	84	69	21
	Média	100	93	91	84	39
	DP	0	2	5	10	12

		0h	1h	3h	6h	24h
EC180	Rep.1	100	95	94	89	39
	Rep.2	100	93	95	91	39
	Rep.3	100	90	87	80	39
	Rep.4	100	93	89	88	25
	Rep.5	100	92	82	77	19
	Média	100	93	89	85	32
	DP	0	2	5	6	10

		0h	1h	3h	6h	24h
Leite	Rep.1	100	100	99	95	93
	Rep.2	100	99	100	100	100
	Rep.3	100	99	98	92	90
	Rep.4	100	100	100	98	91
	Rep.5	100	100	97	88	92
	Média	100	100	99	95	93
	DP	0	1	2	6	5

HBSS		0h	1h	3h	6h	24h
	Rep.1	100	97	96	90	72
	Rep.2	100	96	95	92	84
	Rep.3	100	89	89	86	74
	Rep.4	100	97	95	89	79
	Rep.5	100	87	78	71	61
	Média	100	93	91	86	74
DP	0	5	8	8	9	

Água		0h	1h	3h	6h	24h
	Rep.1	100	85	73	47	24
	Rep.2	100	85	73	47	30
	Rep.3	100	80	73	42	6
	Rep.4	100	62	45	21	8
	Rep.5	100	70	42	22	6
	Média	100	76	61	36	15
DP	0	10	16	13	11	

Porcentagem relativa das médias da viabilidade das células mantidas em cultura, obtidas pelo método de exclusão por azul de tripan, após incubação nos diferentes meios de estocagem para dentes avulsionados por um período de 24h sob a temperatura de 4°C (n= 5, em triplicata).

EC 0		0h	1h	3h	6h	24h
	Rep.1	100	98	93	95	64
	Rep.2	100	95	95	97	93
	Rep.3	100	96	93	88	82
	Rep.4	100	93	92	91	81
	Rep.5	100	95	91	87	85
	Média	100	95	93	92	81
DP	0	2	1	4	11	

EC 30		0h	1h	3h	6h	24h
	Rep.1	100	98	95	92	78
	Rep.2	100	93	95	95	86
	Rep.3	100	90	91	82	79
	Rep.4	100	92	91	90	73
	Rep.5	100	95	91	73	85
	Média	100	94	93	86	80
DP	0	3	2	9	5	

		0h	1h	3h	6h	24h
EC 180	Rep.1	100	97	92	90	81
	Rep.2	100	98	95	95	98
	Rep.3	100	90	80	69	63
	Rep.4	100	96	93	90	88
	Rep.5	100	86	85	76	80
	Média	100	93	89	84	82
	DP	0	5	6	11	13

		0h	1h	3h	6h	24h
Leite	Rep.1	100	100	99	99	98
	Rep.2	100	99	100	100	100
	Rep.3	100	100	99	99	97
	Rep.4	100	99	99	99	99
	Rep.5	100	100	99	96	95
	Média	100	100	99	99	98
	DP	0	1	1	2	2

		0h	1h	3h	6h	24h
HBSS	Rep.1	100	98	97	95	85
	Rep.2	100	98	99	97	98
	Rep.3	100	91	91	86	88
	Rep.4	100	90	94	91	90
	Rep.5	100	95	92	82	78
	Média	100	94	95	90	88
	DP	0	4	3	6	7

		0h	1h	3h	6h	24h
Água	Rep.1	100	86	83	68	26
	Rep.2	100	87	75	68	23
	Rep.3	100	83	76	62	26
	Rep.4	100	82	66	29	4
	Rep.5	100	90	69	34	14
	Média	100	86	74	52	19
	DP	0	3	7	19	10

APÊNDICE D

Células provenientes do ligamento periodontal humano mantidas em cultura

Médias das densidades ópticas obtidos pelo método colorimétrico do MTT, representando a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura e incubadas nos diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados, por um período de 24h sob a temperatura de 25°C (n= 7, em triplicata).

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
EC0	Rep.1	0,644	0,330	0,187	0,101	0,042	0,026
	Rep.2	0,686	0,302	0,256	0,163	0,030	0,032
	Rep.3	0,745	0,292	0,257	0,156	0,047	0,051
	Rep.4	0,676	0,492	0,354	0,281	0,043	0,041
	Rep.5	0,725	0,476	0,317	0,253	0,048	0,039
	Rep.6	0,650	0,496	0,375	0,270	0,048	0,044
	Rep.7	0,715	0,442	0,274	0,201	0,056	0,049
	Média	0,692	0,404	0,289	0,204	0,045	0,040
DP	0,051	0,092	0,065	0,067	0,008	0,009	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
EC30	Rep.1	0,644	0,287	0,243	0,163	0,052	0,028
	Rep.2	0,686	0,287	0,251	0,171	0,037	0,031
	Rep.3	0,745	0,274	0,244	0,170	0,054	0,050
	Rep.4	0,676	0,446	0,408	0,335	0,052	0,049
	Rep.5	0,725	0,419	0,395	0,266	0,054	0,049
	Rep.6	0,650	0,436	0,411	0,294	0,068	0,049
	Rep.7	0,715	0,443	0,397	0,264	0,075	0,053
	Média	0,692	0,370	0,336	0,238	0,056	0,044
DP	0,051	0,083	0,084	0,069	0,012	0,010	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
EC180	Rep.1	0,644	0,311	0,262	0,144	0,044	0,025
	Rep.2	0,686	0,299	0,247	0,159	0,031	0,029
	Rep.3	0,745	0,300	0,240	0,176	0,046	0,045
	Rep.4	0,676	0,486	0,437	0,340	0,052	0,043
	Rep.5	0,725	0,492	0,367	0,225	0,047	0,045
	Rep.6	0,650	0,516	0,422	0,258	0,050	0,043
	Rep.7	0,715	0,507	0,383	0,245	0,052	0,041
	Média	0,692	0,416	0,337	0,221	0,046	0,039
DP	0,051	0,106	0,085	0,068	0,007	0,008	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
Leite	Rep.1	0,644	0,544	0,484	0,449	0,397	0,379
	Rep.2	0,686	0,447	0,471	0,502	0,400	0,383
	Rep.3	0,745	0,557	0,522	0,484	0,403	0,327
	Rep.4	0,676	0,782	0,752	0,741	0,674	0,684
	Rep.5	0,725	0,746	0,704	0,670	0,646	0,602
	Rep.6	0,650	0,730	0,726	0,718	0,696	0,674
	Rep.7	0,715	0,712	0,729	0,723	0,682	0,528
	Média	0,692	0,645	0,627	0,612	0,557	0,511
DP	0,051	0,128	0,128	0,128	0,147	0,149	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
HBSS	Rep.1	0,644	0,441	0,283	0,261	0,253	0,215
	Rep.2	0,686	0,372	0,361	0,357	0,243	0,251
	Rep.3	0,745	0,409	0,401	0,376	0,301	0,240
	Rep.4	0,676	0,586	0,559	0,499	0,495	0,471
	Rep.5	0,725	0,531	0,522	0,531	0,426	0,494
	Rep.6	0,650	0,586	0,561	0,509	0,496	0,374
	Rep.7	0,715	0,597	0,511	0,511	0,487	0,391
	Média	0,692	0,503	0,457	0,435	0,386	0,348
DP	0,051	0,094	0,109	0,104	0,116	0,114	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
MEM	Rep.1	0,644	0,418	0,384	0,364	0,275	0,273
	Rep.2	0,686	0,420	0,420	0,416	0,287	0,234
	Rep.3	0,745	0,446	0,459	0,402	0,330	0,255
	Rep.4	0,676	0,582	0,562	0,546	0,509	0,472
	Rep.5	0,725	0,563	0,534	0,518	0,474	0,350
	Rep.6	0,650	0,652	0,602	0,589	0,535	0,311
	Rep.7	0,715	0,652	0,644	0,618	0,520	0,389
	Média	0,692	0,533	0,515	0,493	0,419	0,326
DP	0,051	0,104	0,097	0,099	0,116	0,084	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
Água	Rep.1	0,644	0,053	0,043	0,043	0,041	0,027
	Rep.2	0,686	0,038	0,030	0,026	0,027	0,027
	Rep.3	0,745	0,047	0,036	0,029	0,029	0,031
	Rep.4	0,676	0,035	0,034	0,043	0,042	0,042
	Rep.5	0,725	0,047	0,044	0,041	0,043	0,043
	Rep.6	0,650	0,032	0,036	0,039	0,039	0,035
	Rep.7	0,715	0,043	0,040	0,040	0,035	0,033
	Média	0,692	0,042	0,038	0,037	0,037	0,034
DP	0,051	0,007	0,005	0,007	0,006	0,007	

Médias das densidades ópticas obtidas pelo método colorimétrico do MTT, representando a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura e incubadas nos EC, por um período de 24h sob a temperatura de 4°C (n= 7, em triplicata).

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
E.C. 0	Rep.1	0,644	0,352	0,318	0,286	0,186	0,104
	Rep.2	0,686	0,400	0,388	0,323	0,270	0,140
	Rep.3	0,745	0,423	0,342	0,320	0,230	0,119
	Rep.4	0,676	0,593	0,584	0,494	0,337	0,110
	Rep.5	0,725	0,537	0,484	0,420	0,240	0,102
	Rep.6	0,650	0,597	0,431	0,442	0,286	0,148
	Rep.7	0,715	0,530	0,483	0,491	0,319	0,141
	Média	0,692	0,490	0,433	0,397	0,267	0,123
DP	0,051	0,098	0,093	0,086	0,053	0,019	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
E.C. 30	Rep.1	0,644	0,437	0,324	0,290	0,212	0,150
	Rep.2	0,686	0,396	0,377	0,309	0,240	0,219
	Rep.3	0,745	0,501	0,357	0,340	0,278	0,182
	Rep.4	0,676	0,614	0,568	0,494	0,359	0,236
	Rep.5	0,725	0,548	0,533	0,445	0,301	0,150
	Rep.6	0,650	0,601	0,501	0,471	0,398	0,207
	Rep.7	0,715	0,575	0,486	0,496	0,385	0,181
	Média	0,692	0,525	0,449	0,406	0,310	0,189
DP	0,051	0,083	0,095	0,090	0,072	0,033	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
E.C. 180	Rep.1	0,644	0,407	0,346	0,304	0,205	0,142
	Rep.2	0,686	0,404	0,373	0,331	0,233	0,178
	Rep.3	0,745	0,430	0,348	0,300	0,257	0,145
	Rep.4	0,676	0,603	0,583	0,485	0,451	0,228
	Rep.5	0,725	0,559	0,543	0,493	0,415	0,151
	Rep.6	0,650	0,633	0,544	0,470	0,420	0,186
	Rep.7	0,715	0,589	0,570	0,506	0,425	0,172
	Média	0,692	0,518	0,472	0,413	0,344	0,172
DP	0,051	0,100	0,110	0,096	0,106	0,030	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
Leite	Rep.1	0,644	0,522	0,474	0,482	0,490	0,482
	Rep.2	0,686	0,489	0,476	0,424	0,454	0,438
	Rep.3	0,745	0,642	0,544	0,544	0,479	0,376
	Rep.4	0,676	0,785	0,786	0,759	0,756	0,705
	Rep.5	0,725	0,794	0,782	0,760	0,671	0,672
	Rep.6	0,650	0,756	0,741	0,736	0,720	0,495
	Rep.7	0,715	0,754	0,725	0,707	0,688	0,475
	Média	0,692	0,677	0,647	0,630	0,608	0,520
DP	0,051	0,128	0,143	0,143	0,129	0,122	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
HBSS	Rep.1	0,644	0,375	0,345	0,330	0,287	0,229
	Rep.2	0,686	0,451	0,407	0,349	0,301	0,298
	Rep.3	0,745	0,461	0,408	0,328	0,312	0,285
	Rep.4	0,676	0,615	0,559	0,541	0,522	0,487
	Rep.5	0,725	0,610	0,599	0,552	0,462	0,451
	Rep.6	0,650	0,613	0,580	0,565	0,501	0,431
	Rep.7	0,715	0,603	0,593	0,558	0,482	0,419
	Média	0,692	0,533	0,499	0,460	0,410	0,371
DP	0,051	0,101	0,108	0,117	0,104	0,099	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
MEM	Rep.1	0,644	0,433	0,408	0,350	0,350	0,186
	Rep.2	0,686	0,491	0,471	0,400	0,296	0,142
	Rep.3	0,745	0,582	0,463	0,431	0,283	0,127
	Rep.4	0,676	0,716	0,669	0,631	0,531	0,265
	Rep.5	0,725	0,654	0,640	0,630	0,462	0,246
	Rep.6	0,650	0,704	0,690	0,611	0,521	0,241
	Rep.7	0,715	0,626	0,622	0,558	0,510	0,234
	Média	0,692	0,601	0,566	0,516	0,422	0,206
DP	0,051	0,106	0,115	0,119	0,109	0,055	

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
Água	Rep.1	0,644	0,041	0,037	0,036	0,044	0,028
	Rep.2	0,686	0,043	0,028	0,027	0,024	0,024
	Rep.3	0,745	0,031	0,031	0,029	0,031	0,031
	Rep.4	0,676	0,048	0,048	0,044	0,038	0,048
	Rep.5	0,725	0,053	0,046	0,046	0,043	0,045
	Rep.6	0,650	0,039	0,039	0,033	0,039	0,036
	Rep.7	0,715	0,041	0,042	0,038	0,039	0,039
	Média	0,692	0,042	0,039	0,036	0,037	0,036
DP	0,051	0,007	0,007	0,007	0,007	0,009	

Médias das densidades ópticas obtidas pelo método colorimétrico do MTT, representando a viabilidade das células do ligamento periodontal mantidas em cultura e incubadas nos controles positivos, HBSS e MEM, por um período de 24h sob temperatura de 37°C (n= 3, em triplicata).

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
HBSS	Rep. 1	0,644	0,517	0,459	0,467	0,436	0,312
	Rep. 2	0,686	0,521	0,503	0,491	0,496	0,328
	Rep. 3	0,745	0,429	0,467	0,445	0,371	0,242
	Média	0,692	0,489	0,476	0,468	0,434	0,294
	DP	0,051	0,052	0,023	0,023	0,063	0,046

		0h	1h	3h	6h	12h	24h
MEM	Rep. 1	0,644	0,548	0,515	0,497	0,508	0,451
	Rep. 2	0,686	0,549	0,540	0,570	0,502	0,460
	Rep. 3	0,745	0,550	0,532	0,491	0,517	0,409
	Média	0,692	0,549	0,529	0,519	0,509	0,440
	DP	0,051	0,001	0,013	0,044	0,008	0,027