

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ENDODONTIA

COMPARAÇÃO *IN VITRO* DA EFETIVIDADE DE VÁRIOS MEIOS DE
CONSERVAÇÃO NA MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DO
LIGAMENTO PERIODONTAL DE DENTES HUMANOS

Dissertação de Mestrado

Beatriz Dulcineia Mendes de Souza Kremer

Florianópolis

2007

BEATRIZ DULCINEIA MENDES DE SOUZA KREMER

**COMPARAÇÃO *IN VITRO* DA EFETIVIDADE DE VÁRIOS MEIOS DE
CONSERVAÇÃO NA MANUTENÇÃO DA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DO
LIGAMENTO PERIODONTAL DE DENTES HUMANOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Endodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Cristina Santos Felipe

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe

Florianópolis

2007

S729c Souza, Beatriz Dulcineia Mendes de
Comparação in vitro da efetividade de vários meios de conservação na
manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal de dentes
humanos / Beatriz Dulcineia Mendes de Souza; orientador Mara Cristina Santos
Felippe. – Florianópolis, 2007.
83 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro
de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Opção
Endodontia.

Inclui bibliografia.

1. Avulsão dentária . 2. Ligamento periodontal. 3. Fibroblastos. 4. Endodontia.

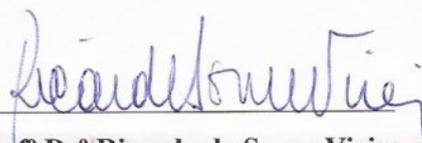
I. Felippe, Mara Cristina Santos. II. Universidade Federal de Santa
Catarina.

Beatriz Dulcineia Mendes de Souza

**“COMPARAÇÃO *IN VITRO* DA EFETIVIDADE DE
VÁRIOS MEIOS DE CONSERVAÇÃO NA MANUTENÇÃO
DA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL DE DENTES HUMANOS”**

Esta dissertação foi julgada adequada e aprovada para obtenção do título de
MESTRE EM ODONTOLOGIA – OPÇÃO ENDODONTIA, no Programa de Pós-
Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

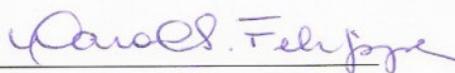
Florianópolis, 14 de dezembro de 2007.



Profº Drº Ricardo de Sousa Vieira

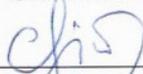
Coordenador do Curso de Pós-Graduação

Banca Examinadora



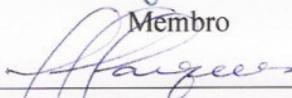
Profª Drª Mara Cristina Santos Felipe

Orientadora



Profª Drª Cláudia Maria de Oliveira Simões

Membro



Profª Drª Márcia Martins Marques

Membro

Ao meu filho João Manoel, aos meus pais José Nelson e
Maria da Conceição e aos meus irmãos Adolfo e
Gabriela.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profª. Dra. Mara Cristina Santos Felipe**, pela preciosa orientação do meu trabalho. Pela paciência, dedicação, rapidez, compreensão, conselhos, tolerância, perfeccionismo e intermináveis ensinamentos. Obrigada por não poupar esforços para me ajudar e por não ter me deixado desistir.

Ao **Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe**, co-orientador, pelo seu exemplo de determinação, competência, conhecimento e sinceridade.

À **Profª. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões**, por abrir-me as portas de seu laboratório para que ali eu pudesse realizar a parte experimental deste trabalho. Um mundo novo eu conheci. Obrigada por sempre me atender e por todos os ensinamentos sobre cultura celular.

À mestranda da Farmácia **Débora Denardin Lückemeyer**, pois sua simplicidade, paciência, boa vontade e seu desprendimento ao ensinar selaram uma perene amizade.

A **minha mãe e minha irmã**, pois sem vocês isto não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Aos professores da disciplina de endodontia: **Ana Maria, Ana Cristina, Caroline, Cleonice Eduardo, Luonothar e Maria Helena**, pela amizade, carinho e constante apoio recebido.

Aos colegas de mestrado: **Jessie, Luciano e Patrícia** pelos momentos inesquecíveis da nossa convivência.

Aos queridos funcionários: **Jaqueline Natividade, Marly Nunes, Sérgio Batista Andrade, Maria de Fátima Rocha e Nilcéia dos Santos Arruda** que sempre dispostos colaboraram de alguma forma com o meu trabalho.

Aos novos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada: **Izabella, Thiago, Aline, Adriana, Cristiane, Jadel, Matias, Luciane, Caroline, Jonas, Francielle e Vanessa**. Por todas as horas de convivência, pela acolhida fraterna.

À **professora Liene Campos**, pela orientação segura na elaboração das normas que regem um trabalho científico.

À **Leila Garcia**, pela análise estatística realizada com segurança e rapidez.

À **Luciana D. Lopes**, amiga verdadeira de longa data. Sempre presente em todas as horas.

Ao **Julliano Kremer**, pessoa especial, que me ensinou que tecnologia é fundamental.

MENDES SOUZA, B. D. **Comparação in vitro da efetividade de vários meios de conservação na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal de dentes humanos.** 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Endodontia)-Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: estabelecer uma linhagem de fibroblastos oriundos de ligamento periodontal de dentes humanos; avaliar a efetividade de diferentes meios de conservação em manter a viabilidade desses fibroblastos; e verificar o efeito de diferentes temperaturas sobre a efetividade dos meios estudados. Uma vez estabelecida a linhagem de fibroblastos, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico MTT, após a conservação a 37°C por 3, 6, 24, 48 e 72h em diferentes meios: Meio Essencial Mínimo (MEM- controle-positivo), solução salina balanceada de Hank (HBSS) estéril, HBSS não estéril, leite desnatado, Save-A-Tooth® e água (controle-negativo). Para verificar o efeito da temperatura, o experimento foi repetido utilizando-se os mesmos meios e períodos, porém cultivando-se as células em temperatura ambiente (20°C). A viabilidade celular também foi avaliada pelo método de exclusão do Azul de Tripiano. As células foram coradas após 6, 24, 48 e 72h de contato com MEM, HBSS estéril, HBSS não estéril, leite desnatado e Save-A-Tooth® a 20°C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Calculadas as médias dos valores de absorbância (MTT) e do percentual de viabilidade celular (Azul de Tripiano), a comparação dos resultados foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. Posteriormente, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Scheffé para localizar as diferenças significativas entre as médias de absorbância e o percentual de células viáveis nos diferentes meios e períodos, num nível de significância de 5%. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados obtidos com o ensaio MTT à temperatura ambiente e a 37°C. Os resultados do MTT realizado à temperatura ambiente demonstraram que o controle-positivo (MEM-37) foi o melhor meio de conservação, seguido pelo leite e depois pela HBSS não estéril e estéril. Após 72h, o desempenho do leite e da HBSS estéril e não estéril foi semelhante. No experimento a 37°C, o leite foi o melhor meio de conservação até 24h. Após 48 e 72h, o desempenho do leite diminuiu e o da HBSS aumentou, apresentando resultados similares aos do grupo-controle. Independentemente da temperatura de cultivo, a água foi o pior meio de conservação e o Save-A-Tooth® demonstrou resultados semelhantes aos da água a partir de 24h. Em relação ao efeito da temperatura, no geral o cultivo a 37°C reduziu a viabilidade das células conservadas em água e em Save-A-Tooth®, mas aumentou a das

mantidas em leite, HBSS estéril e HBSS não estéril, pelo menos até 24h. Pelo método do corante Azul de Tripano, os melhores meios de conservação foram o leite e a HBSS estéril e não estéril, não havendo diferença estatística entre eles, em qualquer período de tempo. Foi concluído que: a técnica de cultivo celular utilizada permitiu a obtenção de uma linhagem de fibroblastos periodontais; a temperatura interfere na efetividade do meio de conservação; leite desnatado, à temperatura ambiente, pode ser utilizado como meio de conservação até 48h.

Palavras-chave: Avulsão. Células do ligamento periodontal. Meios de conservação.

MENDES SOUZA, B. D. **Comparação in vitro da efetividade de vários meios de conservação na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal de dentes humanos.** 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Endodontia)-Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

The aims of this study were to establish a fibroblast lineage from human periodontal ligament cells, to evaluate the effectiveness of different storage media for maintaining the viability of fibroblasts, and to verify the effect of different temperatures on the effectiveness of these media. After the determination of the fibroblasts lineage, the cell viability was evaluated by the MTT colorimetric method, after preservation at 37°C for 3, 6, 24, 48, and 72h in the following media: Minimal Essential Medium (MEM – positive-control), sterile and non-sterile Hank's balanced salt solution (HBSS), non-fat milk, Save-A-Tooth[®], and water (negative-control). In order to verify the effect of the temperature, the experiment was repeated using the same storage media and periods, but with cell culturing at room temperature (20°C). The cell viability was also evaluated by Trypan Blue exclusion method. The cells were stained after 6, 24, 48, and 72h of contact with MEM, sterile and non-sterile HBSS, non-fat milk, and Save-A-Tooth[®] at 20°C. All experiments were performed in triplicate. After calculating the mean absorbance values (MTT) and the mean percent cell viability (Trypan Blue), the results were compared using the Kruskal-Wallis test. Scheffé's multiple comparisons test was used to determine the differences between absorbance means and the percent of viable cells in the different media and periods ($p = 0.05$). Mann-Whitney's test was used to compare the results obtained from MTT at room temperature and 37° C. MTT results at room temperature revealed that the positive-control (MEM-37) was the best storage medium, followed by milk, non-sterile HBSS, and sterile HBSS. After 72h, the performance of milk, sterile and HBSS non-sterile was similar. Milk was the best storage medium at 37° C for up to 24h. After 48 and 72h, milk performed poorer and HBSS performed better, exhibiting similar results to the positive-control. Regardless of the culture temperature, water was the poorer preservation medium, while Save-A-Tooth[®] showed similar results to the water after 24h. The culture at 37° C reduced the viability of cells preserved in water or Save-A-Tooth[®], but increased the viability of cells maintained in milk, sterile and non-sterile HBSS, for up to 24h. The Trypan Blue staining method showed that the best storage media were milk, sterile and non-sterile HBSS, without statistical difference between them. Based on these results, it was concluded that the cell culture used allowed to obtain a periodontal

fibroblasts lineage; the temperature interferes in the storage medium effect; non-fat milk at room temperature can be used for preservation for up to 48h.

Key-words: Avulsion. Periodontal ligament cells. Storage media.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 MEIOS DE CONSERVAÇÃO.....	14
2 ARTIGO	
2.1 VERSÃO EM PORTUGUÊS	21
2.2 TABELAS.....	40
2.3 FIGURAS.....	44
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICES	
A – FIGURAS.....	55
B - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
C – TABELAS	57
D – GRÁFICOS.....	70
E – METODOLOGIA EXPANDIDA.....	73
ANEXOS	
A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA- CEP/UFSC.....	83

1 INTRODUÇÃO

Na dentição permanente, praticamente 16% das injúrias traumáticas dento-alveolares resultam em avulsão, ou seja, o deslocamento total do dente para fora do alvéolo (ANDREASEN, 1970). A direção da força e a intensidade do trauma, aliados à frouxa estrutura do ligamento periodontal, favorecem esse tipo de traumatismo (BLOMLÖF, 1981a), no qual parte do ligamento periodontal permanece inserida no alvéolo, enquanto outra se mantém junto à superfície radicular.

Durante o período em que o dente permanece fora do alvéolo, as células aderidas à parede alveolar permanecem viáveis, no seu ambiente natural. Entretanto, existe uma grande preocupação com as células aderidas à raiz, pois, além do trauma mecânico, logo após a avulsão elas tendem a sofrer desidratação e estão sujeitas à contaminação. Andreasen (1981) e Moddér; Dahlöh; Otteskog (1984) relataram a ocorrência de danos severos nas células do ligamento periodontal de dentes que permaneceram por 30 min em ambiente seco. Essa constatação foi semelhante à de Gamson; Dumsha; Sydiskis (1992), que verificaram que dentes mantidos em ambiente seco, por 30 min, sofreram um decréscimo significativo no número de células viáveis quando comparados aos que ficaram secos por 10 min. Estudos demonstraram que um período a seco de 2h resulta em necrose de praticamente todas as células do ligamento periodontal (ANDREASEN, 1981; MODDÉR; DAHLÖH; OTTESKOG, 1984; GAMSON; DUMSHA; SYDISKIS, 1992; PATIL; DUMSHA; SYDISKIS, 1994; DOYLE; DUMSHA; SYDISKIS, 1998; SCHWARTZ; ANDREASEN; ANDREASEN, 2002).

O resultado do reimplante de dentes com ligamento periodontal comprometido é a reabsorção inflamatória (BLOMLÖF, 1981a; ANDREASEN, 1981; LINDSKOG et al., 1985) ou a anquilose e conseqüente reabsorção substitutiva (ANDREASEN; HJORTING-HANSEN, 1966; CVEK; GRANATH; HOLLENDER, 1974; ANDREASEN; KRISTERSON, 1981; MATSSON et al., 1982; LINDSKOG et al., 1985; BERTOZ et al., 1989; TROPE; FRIEDMAN, 1992). Em um estudo clínico desenvolvido por Cvek; Granath; Hollender (1974) todos os dentes armazenados em ambiente seco por mais de 1h apresentaram sinais clínicos e radiográficos de anquilose. Os mesmos autores, e mais recentemente Donaldson e Kinirons (2001), concluíram que o risco de reabsorção aumenta se o dente avulsionado permanecer seco por mais de 15 min. Dentes de cães reimplantados após 1h de secagem

sofreram reabsorção por substituição (TROPE; FRIEDMAN, 1992) e significativo decréscimo no índice de reparo (PETTIETTE et al., 1997).

Portanto, mediante os resultados destes estudos, conclui-se que a manutenção da viabilidade do ligamento periodontal é extremamente importante para o sucesso do reimplante (CVEK; GRANATH; HOLLENDER, 1974; ANDREASEN et al., 1978; BLOMLÖF, 1981a; ANDREASEN, 1981; LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTROM, 1983; HUPP et al., 1998), e que o tratamento ideal para a avulsão é reimplantar o dente o mais rapidamente possível (ANDREASEN; HJORTING-HANSEN, 1966; ANDREASEN; KRISTERSON, 1981; BLOMLÖF et al., 1983; TROPE; FRIEDMAN, 1992; PETTIETTE et al., 1997).

Quando não for possível realizar o reimplante imediato, esforços devem ser empreendidos no sentido de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal, conservando o dente avulsionado em um meio adequado até o reimplante (BLOMLÖF, 1981a).

Idealmente, o meio de conservação deveria manter as condições de normalidade fisiológica das células, ou seja, apresentar uma osmolalidade entre 230 e 400 mOsm e um pH entre 6,6 e 7,4, além de fornecer íons essenciais como Ca^{2+} e Mg^{2+} (BLOMLÖF, 1981a; KRASNER, 1994). Entende-se por osmolalidade o número de partículas osmoticamente ativas de soluto presentes em 1kg do solvente. Sua importância no meio de armazenamento foi estudada por Blomlöf (1981b) e por Lindskog e Blomlöf (1982), que determinaram que a osmolalidade do meio é mais importante do que a sua composição. No experimento de Lindskog e Blomlöf (1982), a osmolalidade de duas soluções, com a mesma composição, foi ajustada experimentalmente em hipotônica ou fisiológica. Depois de 3h, apenas 10% das células estocadas na solução hipotônica estavam vitais, enquanto que na solução fisiológica o percentual de viabilidade foi de 35%.

Andreasen (1981) demonstrou que o meio de conservação pode ser mais importante do que o período de tempo que o dente permanece fora do alvéolo a seco. A conservação temporária em um meio inadequado aumentou o percentual de células necrosadas e, conseqüentemente, o índice de reabsorção.

Após o dente ter permanecido em ambiente seco, alguns autores recomendam que, antes do reimplante, ele seja imerso em um meio que possa reconstituir os metabólitos celulares perdidos (CVEK; GRANATH; HOLLENDER, 1974; MATSSON et al., 1982; HILTZ; TROPE, 1991). Cvek; Granath; Hollender (1974) demonstraram que a pré-imersão em soro fisiológico por 30 min, de dentes expostos ao ambiente seco por até 40 min, aumentou a incidência de reparo. Andreasen et al. (1978) afirmaram que após um período de

secagem de 60 min, a pré-imersão em meio de Eagle melhorou o reparo do ligamento periodontal. Matsson et al. (1982) concluíram ser vantajoso imergir por 30 min em solução isotônica dentes que ficaram 15 min em ambiente seco. No entanto, após 30 min de secagem, mesmo com a pré-imersão houve um aumento na incidência de anquilose.

Vários experimentos foram conduzidos na tentativa de encontrar o meio ideal (BLOMLÖF, 1981a; HILTZ; TROPE, 1991; TROPE; FRIEDMAN, 1992; FELIPPE, 1998), ou seja, com osmolalidade e pH fisiológicos e que, na medida do possível, forneça íons essenciais às células até o momento em que o dente possa ser reimplantado.

1.1 MEIOS DE CONSERVAÇÃO

Dentre os meios mais estudados pode-se destacar água, saliva, soro fisiológico, soluções para lentes de contato, bebida energética, Meio de Eagle, Viaspan®, meio condicionado, leite e solução salina balanceada de Hank.

1.1.1 Água

Pelo fato de possuir baixa osmolalidade e cloro, estudos têm demonstrado que a água de torneira é um meio inadequado para manter a viabilidade das células do ligamento periodontal (BLOMLÖF, 1981ab; LINDSKOG; BLOMLÖF, 1982; ANDREASEN, 1981; COURTS; MUELLER; TABELING, 1983; OIKARINEM; SEPPÄ, 1987; HARKACZ; CARNES; WALTER, 1997; MARINO et al., 2000; PEARSON et al., 2003; SIGALAS et al., 2004). Lindskog e Blomlöf (1982) demonstraram que nenhuma célula do ligamento periodontal sobreviveu após o armazenamento por 3h neste meio. No estudo de Sigalas et al. (2004), o grupo de dentes conservados em água foi o que apresentou o maior comprometimento das células e fibras do ligamento periodontal. Em função de seu pobre desempenho, a água vem sendo usada como controle negativo em várias pesquisas que avaliam meios de conservação (OIKARINEM; SEPPÄ, 1987; MARINO et al., 2000; PEARSON et al., 2003).

1.1.2 Saliva

A saliva, embora ligeiramente mais efetiva do que a água, também não é um meio adequado, pois além de hipotônica (BLOMLÖF, 1981ab) é fonte de contaminação bacteriana

para as células periodontais (BLOMLÖF, 1981ab; LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTRÖM, 1983). Estudos demonstraram ausência de viabilidade celular após 3 horas de conservação neste meio (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF et al., 1980; BLOMLÖF, 1981a; LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTRÖM, 1983).

1.1.3 Soro fisiológico (cloreto de sódio a 0,9%)

O soro fisiológico possui osmolalidade e pH fisiológicos, mas não fornece íons essenciais e glicose às células. Logo, é considerado um meio de conservação aceitável por 2 a 3h, pois, a partir desses períodos, a possibilidade de necrose celular aumenta significativamente (BLOMLÖF et al., 1980; ANDREASEN, 1981; BLOMLÖF, 1981a; PATIL; DUMSHA; SYDISKIS, 1994; HUANG; REMEIKIS; DANIEL, 1996; SCHWARTZ; ANDREASEN; ANDREASEN, 2002).

1.1.4 Soluções para lentes de contato

As soluções para lentes de contato se mostraram péssimos meios de conservação, provavelmente devido à presença de conservantes (HUANG; REMEIKIS; DANIEL, 1996). No entanto, em um estudo de Sigalas et al. (2004), essas soluções, quando resfriadas (0°C), proporcionaram melhores resultados do que a água, Gatorade® e leite à temperatura ambiente, sendo recomendadas pelos autores como um meio de conservação por um período de até 1h.

1.1.5 Bebida energética

Segundo Harkacz; Carnes e Walter (1997) e Olson et al. (1997), em função do baixo pH que apresenta, a bebida energética (Gatorade®) revelou resultados desanimadores quando comparada à água de torneira. Já em pesquisa desenvolvida por Sigalas et al. (2004), esse energético preservou um número significativamente maior de células do que a água, sendo recomendado como meio de conservação pelo período de até 1h.

1.1.6 Meio de Eagle

Usado como meio de cultura de células, o meio de Eagle possui sal, glicose, vitaminas, aminoácidos, antibióticos e é suplementado com soro fetal bovino, produto rico em

fatores de crescimento e com alto teor de gama-globulina (BLOMLÖF, 1981a). Em algumas pesquisas, o meio de Eagle mostrou-se superior a outros meios testados e seria um excelente meio de conservação se fosse facilmente obtido (BLOMLÖF, 1981). Fibroblastos viáveis e com capacidade de divisão foram observados após 1 ano de armazenamento em meio de Eagle suplementado com nutrientes, soluções tampão e antimicrobiana (LITWIN; LUNDQUIST; SÖDER, 1971). Pesquisadores relataram que após um período de secagem de 60 min, a pré-imersão de dentes de macacos em meio de Eagle, por 5, 7 ou 14 dias, melhorou a condição periodontal, diminuindo o percentual de reabsorção inflamatória após o reimplante (ANDREASEN et al., 1978).

1.1.7 Viaspan® (utilizado para conservação de órgãos para transplantes)

Com osmolalidade de 320 mOsm/Kg e pH em torno de 7,4, o Viaspan® mostrou-se ótimo na preservação da viabilidade das células periodontais por longo período de tempo (TROPE; FRIEDMAN, 1992; HILTZ; TROPE, 1991; HUPP; TROPE; AUKHIL, 1996). Trope e Friedman (1992) não encontraram evidências histológicas de reabsorção por substituição, inflamatória, ou ambas, após o reimplante de dentes avulsionados armazenados de 6 a 12h em Viaspan®. No estudo de Ashkenazi; Marouni; Sarnat (2000), o Viaspan® permitiu que após 8h de conservação, a viabilidade das células do ligamento se mantivesse acima de 90%. Entretanto, depois de 24h, a capacidade mitogênica e clonogênica foi menor do que a das células mantidas em meio de cultura (α Meio Essencial Mínimo + 15% de soro fetal bovino + solução antibiótica) e solução salina balanceada de Hank. A exemplo do que ocorreu com o meio de Eagle, a pré-imersão em Viaspan® também resultou em melhor reparo periodontal (PETTIETTE et al., 1997). Infelizmente seu uso é inviável em virtude do alto custo (HILTZ; TROPE, 1991; ASHKENAZI; SARNAT; KEILA, 1999), vida útil curta (poucos meses) e dificuldade de acesso (ASHKENAZI; SARNAT; KEILA, 1999).

1.1.8 Meio Condicionado (sobrenadante de culturas de fibroblastos não confluentes)

O meio condicionado foi introduzido como meio de conservação na década passada (HUPP; TROPE; AUKHIL, 1996). Os autores acreditam que, além de preservar a viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal, esse meio estimula o crescimento celular em virtude da presença de fatores de crescimento liberados no sobrenadante durante o crescimento exponencial dos fibroblastos.

1.1.9 Leite

O leite tem sido um meio intensamente estudado e tem ganhado ampla aceitação para a conservação de dentes avulsionados (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF et al., 1980; BLOMLÖF, 1981ab; LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTRÖM, 1983; COURTS; MUELLER; TABELING, 1983; OIKARINEN; SEPPÄ, 1987; HUANG; REMEIKIS; DANIEL, 1996; HARKACZ; CARNES; WALTER, 1997; MARINO et al., 2000; PEARSON et al., 2003; SIGALAS et al., 2004). Com pouco conteúdo bacteriano (BLOMLÖF, 1981; LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTRÖM, 1983), o leite possui osmolalidade e pH relativamente fisiológicos, de 230 a 270 mOsm/Kg e de 6,5 a 6,8, respectivamente, mantendo a viabilidade das células (BLOMLÖF et al., 1980; BLOMLÖF, 1981a; LINDSKOG; BLOMLÖF, 1982), além de fornecer-lhes alguns nutrientes. Entretanto, conforme lembra Blomlöf (1981a), o leite pode sofrer redução do seu pH, o que o tornaria inadequado como meio de conservação. Estudos demonstraram que leite com baixo teor de gordura pode ser mais apropriado na manutenção da viabilidade celular do que leite com alto conteúdo de gordura (HARKACZ; CARNES; WALTER, 1997); que o leite longa vida é tão efetivo quanto o leite regular pasteurizado (MARINO et al., 2000); e que o leite resfriado é mais efetivo do que o leite à temperatura ambiente (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF, 1981a; ASHKENAZI; SARNAT; KEILA, 1999; SIGALAS et al., 2004).

Diversos trabalhos demonstraram que o leite pode manter a viabilidade das células do ligamento periodontal por um período de até 3h (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF et al., 1980; LINDSKOG; BLOMLÖF, 1982; BLOMLÖF et al., 1983; COURTS; MUELLER; TABELING, 1983; HUANG; REMEIKIS; DANIEL, 1996). Blomlöf et al. (1980) verificaram que o percentual de células viáveis de dentes armazenados em leite por períodos de 1 a 3h foi semelhante ao do grupo-controle (sem armazenamento).

No trabalho de Lindskog; Blomlöf; Hammarström (1983), leite com baixo teor de gordura foi usado para conservação de dentes avulsionados por até 6h, sem reduzir seriamente a viabilidade e a atividade mitótica das células periodontais. Resultados similares, ou até melhores, foram encontrados por outros autores (BLOMLÖF, 1981a; OIKARINEN; SEPPÄ, 1987; HILTZ; TROPE, 1991; TROPE; FRIEDMAN, 1992). Blomlöf (1981a) observou que 50% das células estavam viáveis após 12h de conservação em leite. Oikarinen e Seppä (1987) demonstraram que o armazenamento em leite com baixo conteúdo de gordura, por até 8h à temperatura ambiente, não alterou a atividade fibroblástica. No estudo de Hiltz e Trope (1991), o grupo de dentes armazenados em leite integral por 6h manteve um percentual de células vitais de 68,2%; após 12h, esse percentual caiu para 43,4%, sendo praticamente nulo

depois de 48h (0,024%). Ashkenazi; Sarnat; Keila (1999) verificaram que, mesmo após 24h, o leite com baixo conteúdo de gordura a 4°C foi mais efetivo do que o meio condicionado e o Viaspan®, proporcionando alta capacidade clonogênica celular.

Pesquisas com diferentes metodologias foram realizadas para verificar o efeito da pré-imersão, em leite, de dentes estocados em ambiente seco por vários períodos. Patil; Dumsha; Sydiskis (1994) concluíram que a rehidratação por 2h em leite é efetiva na manutenção da viabilidade do ligamento periodontal de dentes que ficaram em ambiente seco por até 10 min. Já no estudo de Gamson; Dumsha; Sydiskis (1992), o leite foi um meio adequado até mesmo quando os dentes ficaram secos por 20 min. Porém, quando o período de secagem foi superior a 30 min, parece não haver vantagens de se realizar a pré-imersão em leite. Doyle; Dumsha; Sydiskis (1998), utilizando períodos de desidratação de 30, 60 e 90 min, não encontraram diferenças significativas no número de células viáveis quando se efetua ou não a pré-imersão. Da mesma forma, no estudo de Martin e Pileggi (2004), dentes armazenados a seco por 30 min e imersos em leite por 45 min, apresentaram número de células viáveis inferior à solução teste (própolis) e ao controle (dentes recém-extraídos).

Quando dentes avulsionados foram mantidos em saliva por 15 min, a pré-imersão em leite frio por 30 ou 60 min, antes do reimplante, melhorou as condições das células do ligamento periodontal (LEKIC; KENNY; BARRET, 1998).

Embora os resultados obtidos com o leite sejam satisfatórios, suas principais desvantagens são não reconstituir os metabólitos celulares perdidos (BLOMLÖF et al., 1983; KRASNER; PERSON, 1992) e, conforme algumas pesquisas, não agir por longo período de tempo (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF et al., 1980; HUANG; REMEIKIS; DANIEL, 1996).

1.1.10 Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS)

Atualmente, é a solução recomendada pela Associação Americana de Endodontia para a conservação de dentes permanentes avulsionados (AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS, 1994). Composta de nutrientes essenciais às células, apresenta um pH de 7,2 e uma osmolalidade em torno de 320 mOsm/Kg (KRASNER; PERSON, 1992), podendo manter as células morfológicamente normais por até 72h (HILTZ; TROPE, 1991). Nas primeiras 24h mostrou-se extremamente eficaz, com resultados similares aos obtidos com o Viaspan® (HILTZ; TROPE, 1991).

Krasner e Person (1992) revelaram 91% de sucesso após o reimplante de 34 dentes humanos armazenados em HBSS. Em um estudo com cultura de células conduzido por Huang; Remeikis; Daniel (1996), a HBSS provou ser melhor do que o leite, com 46,8% de células viáveis após 72h de conservação. Ashkenazi; Sarnat; Keila (1999) demonstraram que depois de 24h, a HBSS, juntamente com o leite a 4°C, apresentaram os melhores resultados com relação à viabilidade celular e à capacidade clonogênica e mitogênica, quando comparado ao meio condicionado e ao Viaspan®. Um ano mais tarde, um trabalho com metodologia semelhante, porém desenvolvido à temperatura ambiente, também revelou que a HBSS foi superior ao Viaspan® e ao Meio Essencial Mínimo (ASHKENAZI; MAROUNI; SARNAT, 2000). No estudo de Sigalas et al. (2004), a HBSS foi o meio de conservação que manteve maior número de células viáveis, com exceção do grupo-controle (Meio Essencial Mínimo).

Embora Matsson et al. (1982) e Hiltz e Trope (1991) tenham observado que a HBSS pode reconstituir os componentes celulares perdidos, com possibilidade de reativar as células degeneradas do ligamento periodontal, Doyle; Dumsha; Sydiskis (1998) não encontraram diferenças significativas no número de células viáveis de dentes armazenados por diferentes períodos de tempo em ambiente seco, com ou sem a pré-imersão na HBSS. No estudo de Martin e Pileggi (2004), dentes que permaneceram secos por 30 min e foram imersos em HBSS por 45 min apresentaram números de células viáveis equivalentes aos de dentes imersos em leite e em soro fisiológico, e estatisticamente inferiores aos de submersos na solução teste (própolis) e no grupo-controle (dentes recém-extraídos).

Quando dentes avulsionados foram conservados por 15 min em saliva, Lekic; Kenny; Barret (1998) demonstraram que não houve diferença significativa no potencial clonogênico das células após a pré-imersão por 30 min em leite ou em HBSS. Entretanto, quando a pré-imersão foi de 60 min, o desempenho da HBSS foi estatisticamente superior ao do leite.

A HBSS está disponível no comércio americano com o nome de Save-A-Tooth® (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA) O produto vem acondicionado em um recipiente que possui uma cesta própria para a colocação do dente, a qual serve para minimizar danos mecânicos às células do ligamento periodontal durante o transporte. Em um experimento com cultura de células, Olson et al. (1997) demonstraram que, após 8 e 12h, o Save-A-Tooth® foi estatisticamente inferior ao leite e igual ao ambiente seco na conservação de fibroblastos periodontais. Empregando metodologia semelhante, Marino et al. (2000) também demonstraram que, no período de 8h, leite integral pasteurizado e leite longa vida conservaram maior número de células do que o Save-A-Tooth®.

Embora vários estudos demonstrem que a HBSS possui melhor capacidade de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal do que o leite (BLOMLÖF, 1981a; COURTS; MUELLER; TABELING, 1983; HILTZ; TROPE, 1991; TROPE; FRIEDMAN, 1992; HUANG; REMEIKIS; DANIEL, 1996; LEKIC; KENNY; BARRETT, 1998; ASHKENAZI; SARNAT; KEILA, 1999; SIGALAS et al., 2004), essa solução não se encontra facilmente disponível no comércio nacional.

Tendo em vista o acima exposto, os objetivos deste estudo foram: obter uma linhagem primária de fibroblastos originados do ligamento periodontal de dentes humanos; preparar a HBSS, na forma estéril e não estéril e comparar a sua efetividade com a de diferentes meios de conservação (MEM, leite, Save-A-Tooth® e água) em manter a viabilidade desses fibroblastos; e verificar o efeito de diferentes temperaturas sobre a efetividade dos meios estudados.

Comparação *in vitro* da efetividade de vários meios de conservação na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal de dentes humanos

B.D. MENDES SOUZA¹, M.C.S. FELIPPE¹, W.T. FELIPPE¹, D.D. LÜCKEMEYER², C. M.O. SIMÕES².

¹ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

² Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

Palavras-chaves: avulsão dental, células do ligamento periodontal, meios de conservação.

Running title: Conservação de fibroblastos periodontais.

Corresponding author: Mara Cristina Santos Felippe

Presidente Coutinho, 179 / 702 - Centro - Florianópolis

CEP: 88.015-230 – SC - Brazil

Phone/Fax: +55 (0) 48 33240147

e-mail: mcsfelippe@hotmail.com

Resumo

Objetivos Estabelecer uma linhagem de fibroblastos de ligamento periodontal de dentes humanos e avaliar o efeito da temperatura de cultivo e de diferentes meios de conservação sobre a viabilidade desses fibroblastos.

Metodologia Estabelecida a linhagem celular, os fibroblastos foram conservados a 37°C em diferentes meios: solução salina balanceada de Hank estéril (HBSSe), HBSS não estéril (HBSSn), Save-A-Tooth® e leite desnatado. Meio Essencial Mínimo (MEM-37) serviu como controle-positivo e a água como controle-negativo. Após 3, 6, 24, 48 e 72h, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT. Para verificar o efeito da temperatura o experimento foi repetido utilizando-se os mesmos meios e períodos, porém cultivando-se as células em temperatura ambiente (20°C). A viabilidade celular também foi avaliada pelo método de exclusão do Azul de Tripano após 6, 24, 48 e 72h de contato, a 20°C, das células com MEM, HBSSe, HBSSn, Save-A-Tooth® e leite desnatado. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. As médias dos valores de absorbância (MTT) e do percentual de viabilidade celular (Azul de Tripano) foram calculadas e comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis e, posteriormente, com o teste de Scheffé para localizar diferenças significativas entre os diferentes meios e períodos, num nível de significância de 5%. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados obtidos com o ensaio MTT a 37 e a 20°C ($P < 0.05$).

Resultados Os resultados do MTT realizado a 37°C mostraram que o leite foi o melhor meio de conservação até 24h. Após 48 e 72h, seu desempenho diminuiu e o da HBSSn aumentou, apresentando-se equivalente ao do controle-positivo (MEM-37). No experimento a 20°C, até 48h o leite foi o melhor meio de conservação, com desempenho semelhante ao do MEM-37 e estatisticamente superior ao da HBSSn e HBSSe. Independentemente da temperatura, os resultados com o Save-A-Tooth® foram equivalentes aos da água (controle-negativo) já a partir de 24h. O cultivo a 37°C reduziu ainda mais a viabilidade das células conservadas em água e em Save-A-Tooth®, mas aumentou a das mantidas em leite, HBSSe e HBSSn, pelo menos até 24h. Pelo método do corante Azul de Tripano, os melhores meios de conservação foram o leite e a HBSSe e HBSSn, não havendo diferença estatística entre eles, em qualquer período de tempo.

Conclusões A técnica de cultivo celular utilizada permitiu a obtenção de uma linhagem de fibroblastos periodontais; a temperatura interferiu na efetividade do meio de conservação; leite desnatado, à temperatura ambiente, pode ser utilizado como meio de conservação por até 48h.

Introdução

Na dentição permanente, praticamente 16% das injúrias traumáticas dento-alveolares resultam em avulsão, ou seja, o deslocamento total do dente para fora do alvéolo (Andreasen 1970). Durante o período extra-alveolar, as células aderidas à raiz tendem a sofrer desidratação e estão sujeitas à contaminação. Estudos demonstraram que um período a seco de 2 horas resulta em necrose de praticamente todas as células do ligamento periodontal (PDL) (Andreasen 1981, Gamson et al. 1992, Patil et al. 1994, Doyle et al. 1998).

O resultado do reimplante de dentes com PDL comprometido é a reabsorção inflamatória (Andreasen 1981, Blomlöf 1981, Lindskog et al. 1985) ou a anquilose e conseqüente reabsorção substitutiva (Matsson et al. 1982, Lindskog et al. 1985, Trope & Friedman 1992). Assim, a conduta recomendada é reimplantar o dente o mais rapidamente possível para minimizar a ocorrência dessas seqüelas (Blomlöf et al. 1983, Trope & Friedman 1992). Quando isso não for possível, esforços devem ser empreendidos no sentido de manter a viabilidade das células do PDL, conservando o dente avulsionado em um meio adequado até o reimplante (Blomlöf 1981).

Vários experimentos foram conduzidos na tentativa de encontrar o meio ideal (Blomlöf 1981, Hiltz & Trope 1991, Trope & Friedman 1992), ou seja, com osmolalidade e pH fisiológicos e que, na medida do possível, forneça íons essenciais às células até o momento do reimplante. Dentre os mais estudados pode-se destacar: soro fisiológico, Meio de Eagle, Viaspan, água, leite e solução salina balanceada de Hank (Felippe 1998). O soro fisiológico possui osmolalidade e pH fisiológicos, mas não fornece íons essenciais e glicose às células. É considerado aceitável por apenas 2 ou 3h, pois, a partir desse período, a possibilidade de necrose celular aumenta significativamente (Andreasen 1981, Blomlöf 1981, Patil et al. 1994, Huang et al. 1996). Embora o meio de Eagle e o Viaspan® tenham a capacidade de manter a viabilidade celular por longo período (Litwin et al. 1971, Hiltz & Trope 1991, Trope & Friedman 1992), são produtos caros, e que não se encontram facilmente disponíveis (Ashkenazi et al. 1999). Por possuir baixa osmolalidade e conter cloro, a água de torneira é um meio inadequado (Andreasen 1981, Harkacz et al. 1997, Marino et al. 2000, Sigalas et al. 2004) e tem sido usada como controle-negativo em pesquisas que avaliam meios de conservação (Marino et al. 2000, Sigalas et al. 2004).

O leite possui pouco conteúdo bacteriano (Blomlöf 1981, Lindskog et al. 1983), osmolalidade e pH relativamente fisiológicos de 230-270 mOsm/Kg e 6.5-6.8, respectivamente, e fornece alguns nutrientes e fatores de crescimento às células (Blomlöf 1981). Em relação ao tempo em que mantém a viabilidade celular, os resultados existentes são

controversos. Enquanto alguns mostram que ele é efetivo pelo período de 3h (Blomlöf & Otteskog 1980, Blomlöf et al. 1983, Huang et al. 1996) ou de 6h (Blomlöf 1981, Lindskog et al. 1983, Hiltz & Trope 1991, Trope & Friedman 1992), outros mostram efetividade por até 24h (Ashkenazi et al. 1999). Também não existe um consenso quando a efetividade do leite é comparada a de outros meios de conservação, principalmente com a da HBSS (Hiltz & Trope 1991, Huang et al. 1996, Olson et al. 1997, Marino et al. 2000). Enquanto Hiltz & Trope (1991) e Huang et al. (1996) verificaram que o leite mostrou pior desempenho do que a HBSS, Olson et al. (1997) e Marino et al. (2000) observaram melhores resultados com o leite.

Atualmente, a HBSS é o meio recomendado pela Associação Americana de Endodontia para conservar dentes permanentes avulsionados (American Association of Endodontists 1994). É composta de nutrientes essenciais às células e apresenta um pH de 7,2 e uma osmolalidade em torno de 320 mOsm/Kg (Krasner & Person 1992). Em estudo clínico, Krasner & Person (1992) observaram 91% de sucesso após o replante de 34 dentes humanos armazenados em HBSS. Essa solução pode manter as células morfológicamente normais por até 72h (Hiltz & Trope 1991). Nas primeiras 24h mostrou resultados similares aos obtidos com o Viaspan® (Hiltz & Trope 1991). No estudo de Huang et al. (1996), a HBSS foi melhor do que o leite, mantendo até 46.8% de células viáveis após 72h. Já Ashkenazi et al. (1999) demonstraram que depois de 24h, a HBSS e o leite a 4°C apresentaram os melhores resultados com relação à viabilidade celular e à capacidade clonogênica e mitogênica, quando comparados ao meio condicionado e ao Viaspan®. Um trabalho semelhante desenvolvido à temperatura ambiente também revelou que a HBSS foi superior ao Viaspan® e ao Meio Essencial Mínimo (Ashkenazi et al. 2000). No estudo de Sigalas et al. (2004), a HBSS foi o meio que manteve maior número de células viáveis, com exceção do grupo-controle (Meio Essencial Mínimo).

Embora vários estudos demonstrem que a HBSS possui melhor capacidade de manter a viabilidade das células do PDL do que o leite (Blomlöf 1981, Hiltz & Trope 1991, Trope & Friedman 1992, Huang et al. 1996, Lekic et al. 1998, Ashkenazi et al. 1999, Sigalas et al. 2004), essa solução não se encontra comercialmente disponível no Brasil. No comércio americano, é facilmente encontrada com o nome de Save-A-Tooth® (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA). Em um experimento com cultura de células, Olson et al. (1997) demonstraram que, após 8 e 12h, o Save-A-Tooth® foi estatisticamente inferior ao leite e igual ao ambiente seco na conservação de fibroblastos periodontais. Empregando metodologia semelhante, Marino et al. (2000) também demonstraram que, no período de 8h, leite integral

pasteurizado e leite longa vida conservaram maior número de células do que o Save-A-Tooth®.

Em razão do exposto, os objetivos deste estudo foram: estabelecer uma linhagem de fibroblastos originados do PDL de dentes humanos; preparar a HBSS, na forma estéril e não estéril e comparar a sua efetividade com a de diferentes meios de conservação em manter a viabilidade desses fibroblastos; e verificar o efeito de diferentes temperaturas sobre a efetividade dos meios estudados.

Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Os procedimentos para cultivo primário e estabelecimento da linhagem celular foram realizados conforme técnica descrita por Sant'Ana et al. (2002), com modificações.

Dois terceiros molares humanos, recém-extraídos por razões ortodônticas, foram imediatamente colocados em tubos de centrífuga de 50 mL contendo 30 mL de solução salina fosfato tamponada (PBS) estéril e 2% de uma associação de antibióticos e antifúngico (PSA) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e transportados para a Sala de Cultura de Células do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC.

Os dentes foram lavados 2x com tampão PBS estéril contendo 1% de PSA. O PDL do terço médio das raízes de cada dente foi removido e colocado em garrafas de cultura de 25 cm² contendo MEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) e 1% de PSA. Em seguida, as garrafas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂ em atmosfera umedecida. A proliferação celular das culturas primárias foi monitorada através de um microscópio de fase invertido (40-200X, Nikon, Tokyo, Japão) e fotografada regularmente para acompanhamento.

Após atingirem confluência, as células foram lavadas 3x com PBS, o explante foi removido, as células foram tripsinizadas (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) e parcialmente transferidas para outra garrafa, dando origem a uma subcultura (primeira passagem). O meio de cultura foi renovado, a cada 3 dias. Depois que as células atingiram nova confluência, o meio de cultura foi removido, as células lavadas 3x com PBS, e nova tripsinização foi realizada para a manutenção da linhagem celular. A inativação da tripsina foi feita pela adição de 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA. As garrafas retornaram para a estufa de CO₂, onde permaneceram até que nova confluência fosse obtida.

Para garantir a perpetuação da cultura, alíquotas de suspensões celulares foram congeladas em nitrogênio líquido (MVE Inc., Minnesota, EUA) a -126°C .

Uma semana antes do início do experimento, as células congeladas foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C e colocadas em garrafas de cultura de 75 cm^2 com MEM contendo 10% de SFB e 1% de PSA. As garrafas foram, então, incubadas a 37°C em estufa de CO_2 . No total, 8 garrafas de 75 cm^2 com células da quinta a décima passagem foram utilizadas nos experimentos.

Para a avaliação da viabilidade celular foram utilizados dois testes: Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazólio (MTT) e Método de Exclusão do Corante Azul de Tripano.

Ensaio MTT

Foram utilizadas 10 placas de cultura (Corning, Corning, NY, USA) com 96 cavidades. As 8 cavidades da primeira coluna ficaram vazias (branco) e as restantes foram preenchidas com $100\ \mu\text{L}$ de MEM contendo 8×10^3 células. As placas foram incubadas a 37°C com 5% CO_2 . Depois que as células atingiram confluência, o MEM foi descartado por aspiração, e as cavidades foram preenchidas com $100\ \mu\text{L}$ dos diferentes meios testados: MEM, esterilizado em filtro $0.22\ \mu\text{m}$ (Millipore, Barueri, SP, Brasil) e suplementado com 2% de SFB e 1% de PSA (pH 7.3); água de torneira (pH 7.6); Save-A-Tooth® (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA) (pH 6.4); HBSS estéril (HBSSe), esterilizada em filtro $0.22\ \mu\text{m}$ (pH 7.0); HBSS não estéril (HBSSn) (pH 7.0); e leite pasteurizado longa vida desnatado (PARMALAT, São Paulo, SP, Brasil) (pH 6.8).

A HBSS foi preparada de acordo com a fórmula presente na bula do Save-A-Tooth®: cloreto de sódio (8 g/l), D-glicose (0.4 g/l), cloreto de potássio (0.4 g/l), bicarbonato de sódio (0.35 g/l), fosfato de sódio (0.09 g/l), fosfato de potássio (0.14 g/l), cloreto de cálcio (0.14 g/l) e sulfato de magnésio (0.1 g/l).

Cinco das 10 placas foram incubadas a 37°C e 5 foram deixadas à temperatura ambiente (20°C). Após 3, 6, 24, 48 e 72h, os meios de conservação foram substituídos por $50\ \mu\text{L}$ da solução de MTT (Sigma Chemical) + MEM (1mg/mL em MEM), e as placas incubadas a 37°C . Depois de 4h, o MTT + MEM foi retirado e $100\ \mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em todas as cavidades (inclusive nas cavidades vazias da primeira coluna). As placas foram, então, agitadas levemente de 2 a 5 min para solubilizar a formazana. A leitura de absorbância foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro (Bio-Tek Instruments-Inc., EL_x 800, Winooski, VT, USA). Os valores de absorbância registrados após a

conservação das células em MEM a 37°C (MEM-37) serviram como controle-positivo do crescimento celular.

O método de Exclusão do Corante Azul de Tripiano foi realizado conforme proposto por Walum et al. (1990), com pequenas modificações. Foram utilizadas 4 placas de cultura (24 cavidades), sendo uma para cada período de tempo. As 24 cavidades foram preenchidas com 1 mL de MEM contendo 8×10^4 células e as placas incubadas a 37°C com 5% CO₂. Após a confluência celular, o MEM foi descartado por aspiração, as células lavadas com 1 mL de PBS e as 4 cavidades de cada coluna foram preenchidas com 1 mL de MEM; Save-A-Tooth®; HBSS estéril (HBSSe); HBSS não estéril (HBSSn); e leite.

As placas foram deixadas à temperatura ambiente (20°C) por 6, 24, 48 e 72h, após as quais os meios de conservação foram aspirados. Depois de o tapete celular ser lavado com 1 mL de PBS, as células foram dissociadas pela tripsina, a qual foi inativada pela adição de MEM contendo 5% de SFB. A suspensão celular foi, então, recolhida, centrifugada a 150 Xg durante 5 min, o sobrenadante foi parcialmente aspirado e o sedimento homogenizado com o sobrenadante restante. De cada suspensão celular, 1 alíquota de 100 µL foi retirada e homogenizada com 100 µL da solução de Azul de Tripiano (Sigma Chemical) a 0.4% em PBS, por 3 min. A contagem do número de células viáveis e não viáveis foi realizada em Câmara de Neubauer, em microscópio de luz invertida (aumento de 40X).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em dias independentes. Os valores de absorvância (MTT) e o número de células viáveis e não viáveis (Azul de tripiano) de cada meio e período foram devidamente anotados para análise estatística.

Avaliação dos resultados

As médias dos valores de absorvância e do percentual de células viáveis foram calculadas. Como, em ambos os casos, os dados não apresentaram distribuição normal, a análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Posteriormente, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Scheffé para localizar diferenças individuais. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados obtidos com ensaio MTT à temperatura ambiente e a 37°C. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

Resultados

A cultura primária foi obtida em 10 dias e as subculturas que permitiram estabelecer a linhagem celular, foram obtidas após um período médio de 15 dias (Fig. 1).

Viabilidade celular pelo Ensaio MTT

As médias (\pm DPM) dos valores de absorvância, representativas da viabilidade das células mantidas nos diferentes meios e períodos de conservação encontram-se expressas nas Tabelas 1 (37°C) e 2 (temperatura ambiente). O teste de Kruskal-Wallis revelou que, para ambas as situações, houve diferença significativa ($p < 0.001$) em função dos tempos e dos meios analisados.

Nos experimentos realizados a 37°C, o leite apresentou valores mais altos do que os dos outros meios de conservação ($p < 0.001$) nos períodos de 3 e 6h. Depois, os valores foram reduzindo e tornaram-se equivalentes aos do controle (MEM-37) após 24h e equivalentes aos da água, após 72h (Tabela 1 e Fig. 4). Nos períodos iniciais (3 e 6h), os valores de absorvância da HBSSe e HBSSn foram equivalentes aos do MEM-37 ($p > 0.05$). Porém, depois de 24h os valores foram mais baixos ($p < 0.001$) do que os obtidos com a conservação em leite. Após 48 e 72h, a média dos valores da solução não estéril aumentou tornando-se equivalente a do MEM-37, enquanto a da estéril sofreu uma queda, com valores estatisticamente inferiores aos do MEM-37 e HBSSn. Nos dois primeiros períodos (3 e 6h), o Save-A-Tooth® mostrou desempenho inferior a todos os outros meios de conservação ($p < 0.001$), com exceção da água, cujos resultados foram significativamente inferiores ($p < 0.001$). A partir de 24h, os valores de absorvância do Save-A-Tooth® foram equivalentes aos da água ($p = 1.000$).

Nos experimentos realizados à temperatura ambiente, os valores de absorvância obtidos com a conservação em leite por 6, 24 e 48h foram equivalentes aos do MEM-37 (controle-positivo) (Tabela 2 e Fig. 3). Até 48h, os valores de absorvância do leite foram significativamente mais altos ($p < 0.001$) do que os da HBSSe HBSSn. Após 72h, os três meios tiveram desempenho similar ($p > 0,05$). Nos períodos iniciais (3 e 6h), a HBSSe, a HBSSn, o MEM-20 e o Save-A-Tooth® apresentaram resultados equivalentes ($p > 0.05$). Com o passar do tempo, os valores de absorvância do MEM-20 e do Save-A-Tooth® reduziram drasticamente, tornando-se semelhantes aos da água.

Comparação dos resultados obtidos com os ensaios MTT realizados a 37°C e à temperatura ambiente.

A comparação dos resultados obtidos com o ensaio MTT à temperatura ambiente e a 37°C (Table 3) revelou que a conservação das células nas diferentes temperaturas gerou valores de absorvância significativamente diferentes dependendo do meio e período avaliado. A manutenção das células em MEM a 37°C (controle-positivo) gerou valores de absorvância

mais altos do que os observados no MEM a 20°C, para qualquer período ($p < 0.001$). Ao contrário, a água demonstrou comportamento diferente, pois independentemente do período avaliado, o cultivo a 37°C diminuiu de forma significativa ($p < 0.05$) os valores de absorvância. Em relação aos outros meios estudados, os resultados diferiram dependendo do período de avaliação. Até 24h, a conservação a 37°C na HBSSe e na HBSSn resultou em maiores valores de absorvância, com diferença significativa nos períodos de 3 e 6h ($p < 0.001$). Após 48 e 72h, a solução não estéril continuou mantendo um melhor percentual de viabilidade quando as células foram cultivadas na estufa ($p = 0.002$ e $p = 0.069$, respectivamente) enquanto a solução estéril revelou resultado inverso, ou seja, o cultivo a 37°C diminuiu o percentual de viabilidade quando comparado ao cultivo à temperatura ambiente ($p < 0.05$). O desempenho do leite foi similar ao da HBSSe, pois o aumento de temperatura exerceu efeito positivo ($p < 0.05$) até 24h. Nos demais períodos, a viabilidade celular foi significativamente mais baixa do que a observada com o cultivo a temperatura ambiente ($p < 0.001$). Por outro lado, o cultivo em Save-A-Tooth® a 37°C só foi efetivo até 3h; nos demais períodos houve uma diminuição gradativa nos valores de absorvância, a qual se mostrou significativa nos períodos de 6 e 72h ($p < 0.001$ e $p < 0.003$, respectivamente).

Viabilidade celular pelo teste Azul de Tripano

As médias (\pm DPM) do percentual de células viáveis nos diferentes meios e períodos de conservação estão expressas na tabela 4. O teste de Kruskal-Wallis revelou que, no período de 6h, os meios se comportaram de maneira similar ($p = 0.284$). Porém, houve diferença significativa ($p < 0.001$) entre o percentual de viabilidade nos períodos de 24, 48 e 72h (Fig. 5). Após 24h, os percentuais de células viáveis mantidas na HBSSe, na HBSSn, no MEM e no leite se mantiveram estáveis e equivalentes, enquanto o do Save-A-Tooth® diminuiu drasticamente, com diferença significativa ($p < 0.001$) em relação aos outros meios. Já nos períodos de 48 e 72h, a solução estéril, a não estéril e o leite foram melhores do que o MEM ($p < 0.001$), o qual se igualou ao Save-A-Tooth® no final do experimento.

Independentemente do teste de citotoxicidade aplicado, o percentual de viabilidade das células mantidas em Save-A-Tooth® e em MEM-20 diminuiu significativamente a partir de 24 e 48h, respectivamente. Pelo teste do Azul de Tripano, os percentuais de células viáveis mantidas em leite, HBSSe e HBSSn foram equivalentes entre si durante todo o período experimental. Já pelo ensaio MTT, o leite foi superior a essas duas soluções até 48h, igualando-se a elas após 72h.

Discussão

Este estudo foi conduzido para comparar a efetividade de 6 meios de conservação (HBSSe, HBSSn, Save-A-Tooth®, leite, MEM e água) na manutenção da viabilidade e da função mitocondrial de fibroblastos periodontais.

Trabalhos desenvolvidos para avaliar diferentes meios de conservação demonstraram que o tempo de efetividade difere em função do meio estudado. Alguns evidenciaram que o leite é efetivo por um tempo variável de 3 a 24h (Blomlöf & Otteskog 1980, Blomlöf et al. 1983, Huang et al. 1996, Ashkenazi et al. 1999), enquanto a HBSS e o Viaspan® podem manter a viabilidade das células por até 72h (Hiltz & Trope 1991, Huang et al. 1996) e 168h (Hiltz & Trope 1991), respectivamente. Dessa forma, este estudo foi desenvolvido empregando-se períodos variáveis de 3 a 72h por serem considerados clinicamente relevantes.

Embora a temperatura corporal seja de 37°C, normalmente o dente avulsionado é conservado em um meio à temperatura ambiente. Como existem na literatura experimentos realizados a 37°C (Blomlöf & Otteskog 1980, Blomlöf 1981, Harkacz et al. 1997, Marino et al. 2000, Pearson et al. 2003, Chung et al. 2004) e à temperatura ambiente (Hiltz & Trope 1991, Ashkenazi et al. 2000), este experimento foi realizado nas duas condições para permitir comparações.

Um dos testes de citotoxicidade aplicado foi o MTT (sal de tetrazólio), o qual é um composto hidrossolúvel facilmente incorporado pelas células viáveis, que o reduz em suas mitocôndrias pela ação das desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em cristais de formazana que ficam armazenados no citoplasma celular e são, depois, solubilizados pelo DMSO. A viabilidade das células e sua atividade metabólica são fornecidas pela quantificação da formazana produzida, expressa em valores de absorbância, analisada em espectrofotômetro (Mossmann 1983; Sieuwerts et al. 1995; Andrighetti-Fröhner et al. 2003).

Nas pesquisas com culturas de células, realizadas a 37°C ou mesmo à temperatura ambiente, o meio usado como padrão (controle-positivo) para comparações tem sido um meio próprio para crescimento celular (geralmente MEM) colocado em estufa de CO₂ à temperatura de 37°C. O MEM possui aminoácidos, vitaminas, proteínas, minerais, carboidratos, fatores de crescimento, entre outros, os quais são nutrientes essenciais que fornecem a energia necessária para o metabolismo e proliferação celular (Freshney 1999). Além disso, a temperatura de 37°C e a presença de CO₂ criam um ambiente favorável ao crescimento das células. Ashkenazi et al. (2000) demonstraram que células cultivadas por 24h em meio de cultura (α MEM + 15% de SFB) a 37°C apresentaram maior capacidade mitogênica e clonogênica do que as cultivadas no mesmo meio à temperatura ambiente. Diante disso, e de

acordo com a metodologia empregada por outros autores (Blomlöf 1981, Ashkenazi et al. 1999, Ashkenazi et al. 2000), foi definido que, em relação ao ensaio MTT realizado em ambas as temperaturas (20 e 37°C), os resultados obtidos com a conservação das células em MEM a 37°C serviriam de padrão (controle-positivo) para comparação dos resultados dos outros meios. A água, usada como controle-negativo, a 37 e a 20°C, apresentou os piores resultados, concordando com os de vários estudos prévios (Andreasen 1981, Harkacz et al. 1997, Marino et al. 2000, Sigalas et al. 2004).

No experimento realizado a 37°C, embora o MEM-37 tenha mantido maior percentual de células metabolicamente ativas nos períodos de 24, 48 e 72h, seu desempenho foi estatisticamente inferior ao do leite nos períodos iniciais (3 e 6h). Neste experimento, o SFB foi adicionado ao MEM numa concentração de 2%. Ainda que essa concentração tenha se mostrado suficiente para a manutenção da viabilidade quando as células foram cultivadas a 37°C, é possível que os resultados fossem melhores se uma maior concentração tivesse sido utilizada como realizado por outros autores (Blomlöf & Otteskog 1980, Blomlöf 1981, Huang et al. 1996, Olson et al. 1997, Ashkenazi et al. 1999, Marino et al. 2000, Ashkenazi et al. 2000, Sigalas et al. 2004).

A opção pelo uso de leite desnatado se deve ao fato de que leite com baixo teor de gordura é mais apropriado na manutenção da viabilidade celular do que aquele com alto conteúdo de gordura (Harkacz et al. 1997)

Os resultados do experimento realizado à temperatura ambiente revelaram que, com exceção do controle (MEM-37), o leite foi o melhor meio de conservação. Até 48h, ele foi significativamente melhor do que os outros meios testados e, após 72h, seus resultados foram equivalentes aos da HBSSe e HBSSn. Embora estejam em concordância com os achados de Olson et al. (1997) e Marino et al. (2000), estes resultados diferem do de outros autores, os quais afirmaram que o leite é efetivo por curto período de tempo (Blomlöf & Otteskog 1980, Blomlöf et al. 1983, Huang et al. 1996). Discordam também dos de Sigalas et al. (2004) e de Ashkenazi et al. (2000) que afirmaram que apenas o leite resfriado (-4°C) é adequado para a preservação da capacidade proliferativa das células do ligamento periodontal.

Cabe também ressaltar que, quando os experimentos foram realizados a 37°C, os resultados com o leite até 24h foram ainda melhores. Este achado vai de encontro ao de Blomlöf & Otteskog (1980) que verificaram que o leite não sofreu interferência da temperatura na manutenção da viabilidade de fibroblastos periodontais, pelo menos até 3h. Nesta pesquisa, o desempenho do leite a 37°C caiu consideravelmente a partir de 48h,

igualando-se à água após 72h. Provavelmente, o leite a partir de 48h sofreu uma redução de pH, gerando um meio impróprio para a sobrevivência celular.

Uma possível explicação para os bons resultados obtidos com o leite nos dois experimentos (20 e 37°C) é que, além do pH e osmolalidade fisiológicos e presença de alguns nutrientes (Blomlöf 1981), ele possui fatores de crescimento. Belford et al. (1995) demonstraram que a adição de extratos de leite bovino à cultura de células de fibroblastos e de células epiteliais promoveu maior proliferação celular. Pode também ser cogitado que, a relativa opacidade do leite interferiu na leitura da densidade ótica. Smee et al. (2002) afirmaram que substâncias que em meio de cultura apresentam forte coloração interferem na leitura das absorbâncias gerando valores mais altos. Testando diferentes concentrações de clorofilina adicionada a HBSS, Chung et al. (2004) levantaram a hipótese de que a coloração verde dessa substância pode ter aumentado os valores de absorbância, superestimando os resultados. Porém, vale lembrar que, conforme discutido mais adiante, os dados obtidos com o teste de exclusão Azul de Tripiano confirmaram a efetividade do leite na manutenção da viabilidade celular.

Vários experimentos têm demonstrado que a HBSS é um meio eficaz na conservação de dentes avulsionados (Trope & Friedman 1992, Krasner & Person 1992), de fibroblastos periodontais (Blomlöf 1981, Huang et al. 1996, Ashkenazi et al. 2000), e de fibroblastos labiais (Hiltz & Trope 1991), por períodos variáveis de 3 a 72h (Hiltz & Trope 1991, Huang et al. 1996, Ashkenazi et al. 1999, Ashkenazi et al. 2000). Os resultados do MTT à temperatura ambiente demonstraram que não houve diferença significativa entre a HBSSe e a HBSSn, em qualquer período de tempo. Até 48h, a efetividade das duas soluções foi significativamente inferior a do leite e, após 72h, não houve diferença entre os 3 produtos. No experimento a 37°C, a HBSSe e a HBSSn tiveram desempenhos semelhantes e foram inferiores ao do leite até 24h. Vários estudos prévios relataram superioridade da HBSS em relação ao leite (Blomlöf 1981, Hiltz & Trope 1991, Trope & Friedman 1992, Huang et al. 1996, Lekic et al. 1998, Ashkenazi et al. 1999, Sigalas et al. 2004,). Entretanto, após 48h e 72h, somente a HBSSn foi significativamente melhor do que o leite.

Como já dito anteriormente, a HBSS não se encontra disponível comercialmente no mercado brasileiro. Por isso, após a manipulação da HBSS conforme a fórmula do Save-A-Tooth®, procurou-se comparar a sua capacidade de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal com a de outros meios. De posse de uma solução que apresentasse os mesmos resultados encontrados na literatura, seria possível disponibilizá-la em locais públicos como escolas, centros esportivos, hospitais, farmácias, corpo de bombeiro, postos de saúde e

até mesmo em casa. A HBSS foi testada na forma estéril e não estéril para avaliar se a prévia esterilização exerceria algum efeito sobre sua efetividade. A esterilização da HBSS não pode ser realizada em autoclave por causa da presença da glicose. Para esterilizá-la foi utilizado filtro 0.22 μm (Millipore) adaptado em aparelhos específicos, o que tornou a obtenção da solução mais trabalhosa, lenta e onerosa. Os resultados deste trabalho mostraram que não há vantagens em se realizar a esterilização do produto, haja vista que o desempenho das duas soluções foi semelhante em todos os períodos, principalmente no experimento desenvolvido à temperatura ambiente.

Considerando que normalmente o dente avulsionado é mantido em um meio à temperatura ambiente, e comparando os resultados obtidos após a conservação em leite e em HBSSe ou HBSSn a 20°C, parece lícito sugerir que o leite desnatado pode ser utilizado como meio de conservação até 48h. Talvez a substituição do leite, em intervalos regulares de 24 ou 48h, possa aumentar ainda mais o seu tempo de efetividade. Uma pesquisa encontra-se em andamento com o objetivo de esclarecer essa questão.

Neste trabalho, tanto o cultivo à temperatura ambiente quanto o realizado a 37°C demonstraram resultados desanimadores com o Save-A-Tooth®. Após os períodos iniciais (3 e 6h) do cultivo à temperatura ambiente, o Save-A-Tooth® manteve, praticamente, 50% de viabilidade celular. No realizado a 37°C, os percentuais de células viáveis, em relação ao controle-positivo, foram, aproximadamente, de 75% e 48% (dados não mostrados). Após 24, 48 e 72h, em ambas as temperaturas os resultados foram estatisticamente iguais aos da água. Outras pesquisas desenvolvidas com esse produto revelaram resultados similares (Olson et al. 1997, Marino et al. 2000). Após a conservação de células à temperatura ambiente, em leite integral e em Save-A-Tooth®, Olson et al. (1997) verificaram que após 8 e 12h, os valores de densidade ótica do grupo do Save-A-Tooth® foram similares aos apresentados pelas células mantidas em ambiente seco. A partir de 4h, o leite integral mostrou desempenho significativamente melhor do que o Save-A-Tooth® e o controle-positivo. Com metodologia similar, porém mantendo as células a 37°C nos diferentes meios, Marino et al. (2000) demonstraram que, no período de 8h, a conservação em leite integral resultou em valores de densidade ótica significativamente maiores do que os obtidos com a conservação em Save-A-Tooth® e em MEM (com 10% de SFB). Neste estudo, o Save-A-Tooth® foi utilizado alguns meses após a sua fabricação. É possível que o curto período decorrido desde a fabricação até o uso tenha influenciado na sua capacidade de conservação, pois a HBSS, utilizada logo após a obtenção, revelou desempenho superior ao do Save-A-Tooth®, embora apresentasse a mesma constituição. Um estudo futuro será realizado com a mesma HBSS aqui empregada, porém

após a estocagem por 6 meses, para confirmar esta suposição. Deve-se ressaltar que a medida de pH registrada da HBSSe e HBSSn foi de 7.0, enquanto a do Save-A-Tooth® foi de 6.4, o que não reflete o pH ideal para crescimento celular.

Um outro teste utilizado para avaliar a viabilidade celular foi o teste de exclusão do corante Azul de Tripano. O fenômeno de permeabilidade da membrana celular permite estimar, indiretamente, o grau de integridade da mesma, e serve para avaliar apenas a vitalidade e não a saúde fisiológica ou a capacidade metabólica celular (Martin & Pileggi 2004). O percentual de células não coradas representa, portanto, o índice de viabilidade (Walum et al. 1990).

Os resultados obtidos com este teste foram semelhantes aos do ensaio MTT: o leite foi o melhor meio de conservação e o Save-A-Tooth® e o MEM tiveram uma queda significativa em seu desempenho a partir de 24 e 48, respectivamente. Porém, a HBSSe e a HBSSn mostraram desempenho igual ao do leite, o que sugere que a técnica do corante Azul de Tripano é menos sensível do que o ensaio MTT. Ashkenazi et al. (1999) e Ashkenazi et al. (2000) testaram a viabilidade celular com a técnica do Azul de Tripano e verificaram que não houve diferença significativa entre os meios testados após 2, 8 e 24h. No entanto, quando testaram a capacidade mitogênica e clonogênica celular, os autores encontraram diferenças significativas após o período de 24h.

Nossos resultados diferem dos de Hiltz & Trope (1991) que, também empregando o Azul de Tripano, verificaram que a conservação de células à temperatura ambiente em leite e HBSS foi efetiva por 6 e 24h, respectivamente. A HBSS manteve células viáveis por até 96h, superando o leite em todos os períodos de tempo. Talvez essa diferença possa ser justificada pela origem dos fibroblastos e pelo tipo de leite utilizado. Enquanto esses autores realizaram a pesquisa com fibroblastos labiais e leite integral, neste experimento foram utilizados fibroblastos periodontais e leite desnatado, que é mais indicado por possuir menor teor de gordura (Harkacz et al. 1997).

Os resultados deste estudo sugerem que o leite desnatado, à temperatura ambiente, pode ser utilizado como meio de conservação até 48h. Excedendo esse período de tempo, o leite deve ser substituído pela HBSSn. Quando o período de tempo extra-alveolar a seco exceder 20 min, é preferível utilizar a HBSS, pois essa solução, além de reconstituir metabólitos perdidos tem a capacidade de reativar as células degeneradas do ligamento periodontal (Matsson et al. 1982, Hiltz & Trope 1991).

Conclusões

A técnica de cultivo celular utilizada permitiu obter uma linhagem de fibroblastos oriundos do ligamento periodontal humano; a temperatura interferiu na efetividade dos meios de conservação; leite desnatado, à temperatura ambiente, pode ser utilizado como meio de conservação até 48h.

Referências

American Association of Endodontists (1994) Treatment of the avulsed tooth. Recommended Guidelines of the American Association of Endodontists. Endodontics Today.

Andreasen, JO (1970) Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. Scandinavian Journal Dental Research **78**, 329-42.

Andreasen, JO (1981) Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpar healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. International Journal Oral Surgery. **10**, 43-53.

Andrighetti-Fröhner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CRM, Simões CMO (2003) Cytotoxicity and potencial antiviral evaluation of violacein produced by chromobacterium violaceum. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **98**, 843-48.

Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H (2000) In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature. Endodontics Dental Traumatology **16**, 63-70.

Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S (1999) In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. Endodontics Dental Traumatology **15**, 149-56.

Belford, DA et al. (1995) Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. In vitro Cellular and Developmental Biology. Animal **31**, 752-60.

Blomlöf L (1981) Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticuled teeth prior to replantation. Swedish Dental Journal **8**, 1-26.

Blomlöf L, Lindskog S, Anderson L, Hedström K-G, Hammarström L (1983) Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. Journal of Dental Research, **62**, 912-16.

Blomlöf L, Otteskog P (1980) Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scandinavian Journal Dental Research* **88**, 436-40.

Chung, W-G, Lee E J, Lee S-J, Lee S-A, Kim J (2004) Effect of chlorophyllin on normothermic storage of human periodontal ligament cells. *Journal of Endodontics* **30**, 399-402.

Doyle D L, Dumsha T C, Sydiskis R J (1998) Effect of soaking in Hank' balanced salt solution or milk on PDL cell viability of dry stored human teeth. *Endodontics Dental Traumatology* **14**, 221-4.

Freshney, R I (1999) *Culture of Animal Cells. A Multimedia Guine*. Wiley-Liss, CD.

Gamson E K, Dumsha T C, Sydiskis R (1992) The effect of drying time on periodontal ligament cell vitality. *Journal of Endodontics* **18**, 189.

Gil J N (1989) *Contribuição ao estudo da traumatologia Bucomaxilo-facial: Estudo prospectivo de 200 pacientes com traumatismos dento-alveolares.. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.*

Harkacz O M, Carnes D L, Walter W A (1997) Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. *Journal of Endodontics* **23**, 687-90.

Hiltz J, Trope M (1991) Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endodontics Dental Traumatology* **7**, 69-72.

Huang S C, Remeikis N A, Daniel J C (1996) Effects of Long- Term Exposure of Human Periodontal Ligament Cells to Milk and Other Solutions. *Journal of Endodontics* **22**, 30-3.

Krasner P, Person P (1992) Preserving avulsed teeth for replantation. *Journal of the American Dental Association* **23**, 80-88.

Lekic P C, Kenny D J, Barrett E J (1998) The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *International Endodontic Journal* **31**, 137-40.

Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L (1983) Mitosis and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scandinavian Journal Dental Research* **91**, 465-72.

Lindskog S, Pierce A. M, Blomlöf L, Hammarström L (1985) Mitoses and microorganismos in the periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. *Endodontics Dental Traumatology* **1**, 96-101.

Litwin J, Lundquist G, Söder P-O (1971) Studies on long-term maintenance of teeth and viable associated cells in vitro. *Scandinavian Journal Dental Research* **79**, 536-39.

Marino T G et al. (2000) Determination of Periodontal Ligament Cell Viability in Long Shelf-Life Milk. *Journal of Endodontics* **26**, 699-702.

Martin M P, Pileggi R (2004) A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. *Endodontics Dental Traumatology* **20**, 85-89.

Matsson L, Cvek M, Andreasen J O, Granath L (1982) Ankylosis of experimentally reimplanted teeth related to extra-alveolar period and storage environment. *Pediatric Dentistry* **4**, 327-29.

Mossmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63.

Olson B D, Mailhot J M, Anderson R W, Schuster G S, Weller R N (1997) Comparison of Various Transport Media on Human Periodontal Ligament Cell Viability. *Journal of Endodontics* **23**, 676-79.

Patil S, Dumsha T C, Sydiskis R J (1994) Determining periodontal ligament (PDL) cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. *International Endodontic Journal* **27**, 1, 1-5.

Piche J E, Carnes D L, Graves D T (1989) Initial characterization of cells derived from human periodontia. *Journal of Dental Research* **68**, 761-67.

Sant'ana A C P, Marques M M, Barroso E C, Passanezi E (2002) Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. *Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru* **10**, 134- 40.

Sieuwerts A, Klijn J G M, Peters H A, Foekens J A (1995) The MTT tetrazolium salt assay serutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC₅₀- values and cell survival. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **33**, 813-23.

Sigalas E, Regan J D, Kramer P R, Witherspoon D E, Opperman L A (2004) Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Endodontics Dental Traumatology* **20**, 21-28.

Smee D F, Morrison A C, Bannard D L, Sidwell R W (2002) Comparison of colorimetric fluorimetric, and visual methods for determining anti-influenza (H N and H N) virus activities and toxicities of compounds. *Journal of Virological Methods* **106**, 71-79.

Trope M, Friedman S (1992) Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hanks' balanced salt solution. *Endodontics Dental Traumatology* **8**, 183-88.

Walum E, Strenberg K, Jenssen D (1990) *Understanding cell toxicology: principles and practice*. New York: Ellis Howood; p. 97-111.

Table 1 Resultados da determinação da viabilidade de fibroblastos periodontais conservados a 37°C nos diferentes meios e períodos, obtidos através do método colorimétrico do MTT, expressos em valores de absorbância. Os resultados representam a média de três experimentos independentes \pm DPM.

Períodos Meios	Períodos				
	3h	6h	24h	48h	72h
MEM- 37	0.329 \pm 0.033	0.312 \pm 0.043	0.354 \pm 0.065	0.346 \pm 0.046	0.383 \pm 0.063
Water	0.047 \pm 0.035	0.029 \pm 0.021	0.015 \pm 0.011	0.021 \pm 0.012	0.013 \pm 0.019
Save-A-Tooth	0.249 \pm 0.043	0.150 \pm 0.027	0.019 \pm 0.014	0.022 \pm 0.011	0.008 \pm 0.009
HBSSe	0.310 \pm 0.041	0.287 \pm 0.033	0.241 \pm 0.047	0.179 \pm 0.073	0.132 \pm 0.113
HBSSn	0.328 \pm 0.030	0.298 \pm 0.034	0.251 \pm 0.043	0.343 \pm 0.141	0.324 \pm 0.167
Milk	0.459 \pm 0.050	0.437 \pm 0.079	0.398 \pm 0.117	0.132 \pm 0.095	0.018 \pm 0.008

Table 2 Resultados da determinação da viabilidade de fibroblastos periodontais conservados à temperatura ambiente nos diferentes meios e períodos, obtidos através do método colorimétrico do MTT, expressos em valores de absorbância. Os resultados representam a média \pm DPM de três experimentos independentes.

Períodos Meios	Períodos				
	3h	6h	24h	48h	72h
MEM-20	0.174 \pm 0.056	0.215 \pm 0.051	0.163 \pm 0.067	0.047 \pm 0.032	0.039 \pm 0.026
Water	0.061 \pm 0.028	0.069 \pm 0.047	0.036 \pm 0.035	0.030 \pm 0.015	0.021 \pm 0.015
Save-A-Tooth	0.146 \pm 0.048	0.185 \pm 0.049	0.054 \pm 0.069	0.025 \pm 0.014	0.025 \pm 0.017
HBSSe	0.159 \pm 0.038	0.219 \pm 0.061	0.224 \pm 0.084	0.218 \pm 0.053	0.269 \pm 0.052
HBSSn	0.181 \pm 0.048	0.230 \pm 0.060	0.249 \pm 0.057	0.225 \pm 0.061	0.256 \pm 0.058
Milk	0.278 \pm 0.083	0.330 \pm 0.084	0.326 \pm 0.097	0.316 \pm 0.092	0.236 \pm 0.048

Table 3 – Resultados da análise comparativa da média dos valores de absorvância obtidos pelo método colorimétrico MTT, após a conservação dos fibroblastos periodontais, à temperatura ambiente e a 37°C, nos diferentes meios e períodos.

	20° C	37° C	p*
3h			
MEM	0.174 (0.056)	0.328 (0.033)	<0.001
HBSSe	0.159 (0.038)	0.310 (0.041)	<0.001
HBSSn	0.181 (0.048)	0.328 (0.030)	<0.001
Milk	0.278 (0.083)	0.459 (0.050)	<0.001
Save-a-tooth	0.146 (0.048)	0.249 (0.043)	<0.001
Water	0.061 (0.028)	0.047 (0.035)	<0.001
6h			
MEM	0.215 (0.051)	0.313 (0.043)	<0.001
HBSSe	0.219 (0.061)	0.287 (0.033)	<0.001
HBSSn	0.230 (0.060)	0.298 (0.034)	<0.001
Milk	0.330 (0.084)	0.437 (0.079)	<0.001
Save-a-tooth	0.185 (0.049)	0.150 (0.027)	<0.001
Water	0.069 (0.047)	0.029 (0.021)	<0.001
24h			
MEM	0.163 (0.067)	0.354 (0.065)	<0.001
HBSSe	0.224 (0.084)	0.241 (0.047)	0.768
HBSSn	0.249 (0.057)	0.251 (0.043)	0.509
Milk	0.326 (0.097)	0.398 (0.117)	0.008
Save-a-tooth	0.054 (0.069)	0.019 (0.014)	0.211
Water	0.036 (0.035)	0.015 (0.011)	0.022
48h			
MEM	0.047 (0.032)	0.346 (0.046)	<0.001
HBSSe	0.218 (0.053)	0.179 (0.073)	0.021
HBSSn	0.225 (0.061)	0.343 (0.141)	0.002
Milk	0.316 (0.092)	0.132 (0.095)	<0.001
Save-a-tooth	0.025 (0.014)	0.022 (0.011)	0.248
Water	0.030 (0.015)	0.021 (0.012)	0.009
72h			
MEM	0.039 (0.026)	0.383 (0.063)	<0.001
HBSSe	0.269 (0.052)	0.132 (0.113)	<0.001
HBSSn	0.256 (0.058)	0.324 (0.167)	0.069
Milk	0.236 (0.048)	0.018 (0.008)	<0.001
Save-a-tooth	0.025 (0.017)	0.008 (0.009)	0.003
Water	0.021 (0.015)	0.013 (0.019)	<0.001

* teste de Mann-Whitney

Table 4 Resultados da determinação da viabilidade de fibroblastos periodontais conservados à temperatura ambiente nos diferentes meios e períodos, obtidos através do método de exclusão do corante Azul de Tripano, expressos em percentuais. Os valores representam a média \pm DPM de três experimentos independentes.

Períodos \ Meios	6h	24h	48h	72h
MEM-20	94.39 \pm 5.32	91.37 \pm 5.24	45.43 \pm 20.76	17.89 \pm 10.17
Save-A-Tooth®	96.94 \pm 1.77	9.54 \pm 16.87	8.18 \pm 6.58	8.79 \pm 8.40
HBSSe	97.56 \pm 2.12	96.43 \pm 1.83	92.04 \pm 3.32	86.45 \pm 10.49
HBSSn	96.43 \pm 2.67	94.64 \pm 3.24	82.13 \pm 11.37	82.38 \pm 17.19
Milk	96.45 \pm 1.81	95.11 \pm 2.41	93.33 \pm 2.16	83.39 \pm 14.03

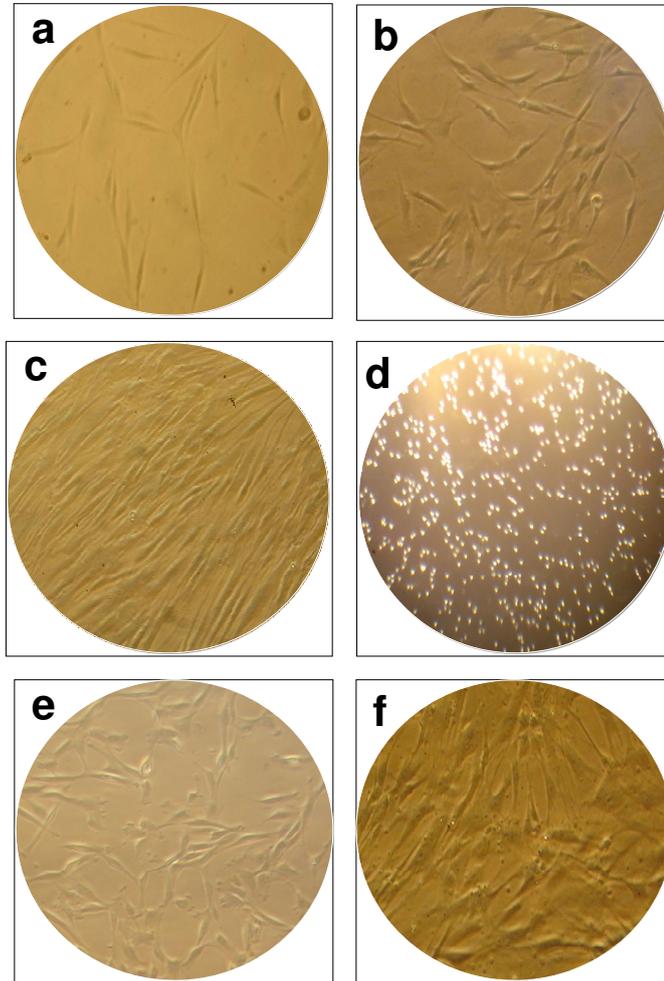


Figure 1 Imagens de fotomicrografias da cultura de fibroblastos periodontais (100X) (a) cultura primária obtida após 10 dias de cultivo; (b) cultura primária obtida após 13 dias de cultivo; (c) tapete confluyente obtido após 15 dias de cultivo; (d) tripsinização; (e) linhagem celular – primeira passagem; (f) linhagem celular – oitava passagem.

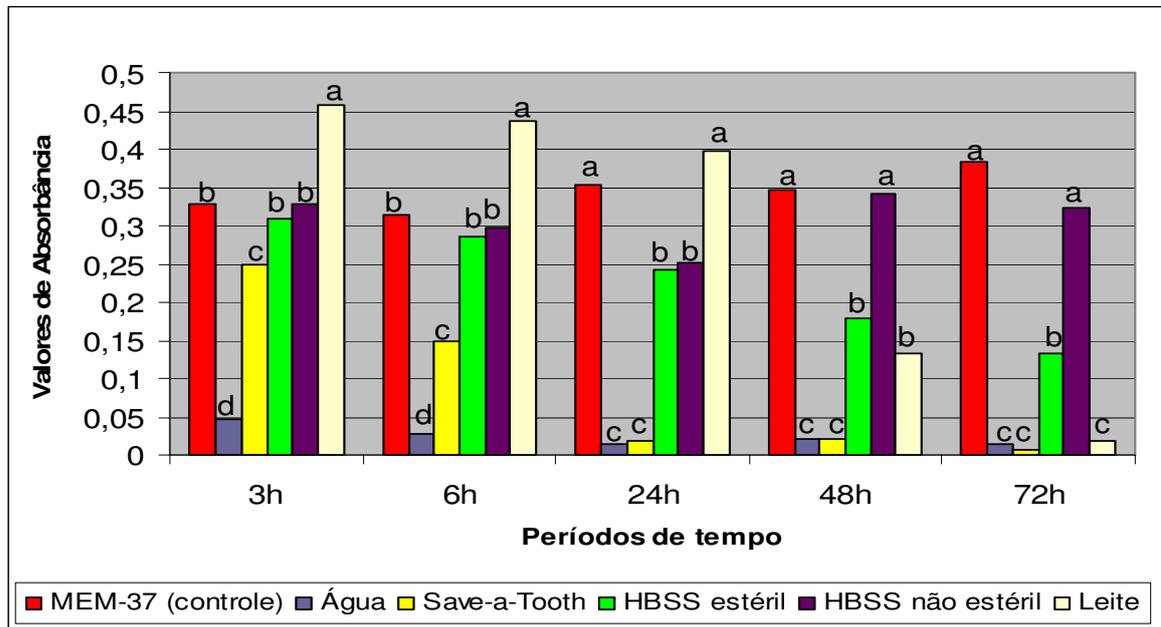


Figure 2 Resultados da determinação da viabilidade de fibroblastos periodontais conservados a 37°C em diferentes meios e períodos, obtidos através do método colorimétrico do MTT, expressos em valores de absorbância. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

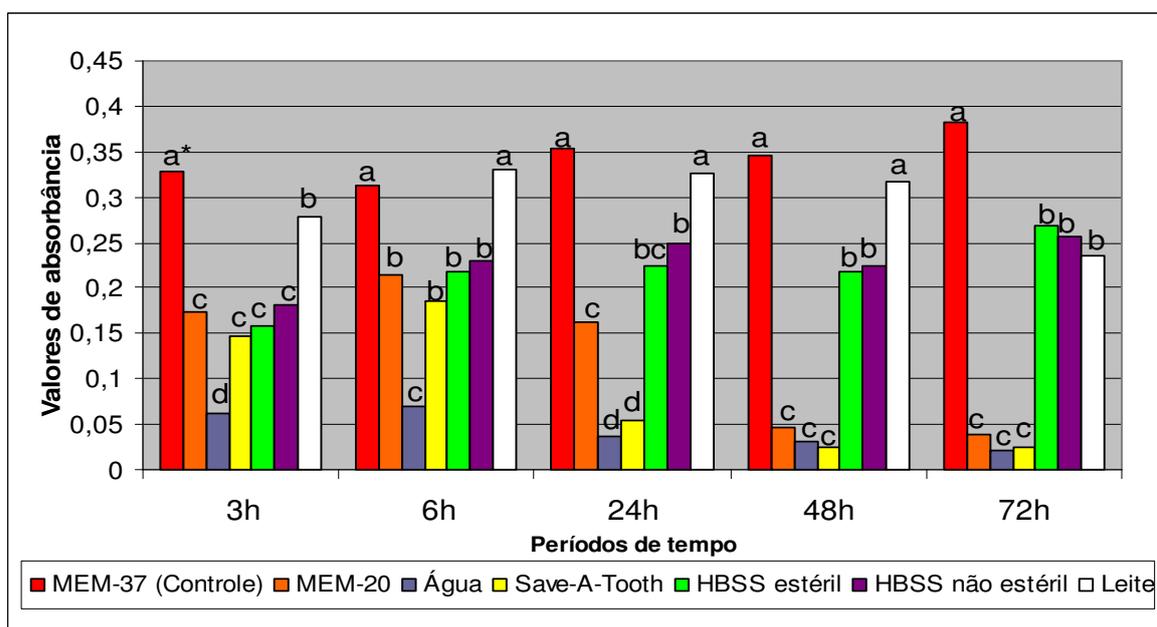


Figura 3 – Resultados da determinação da viabilidade de fibroblastos periodontais conservados à temperatura ambiente nos diferentes meios e períodos, obtidos através do método colorimétrico do MTT, expressos em valores de absorbância. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. *Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

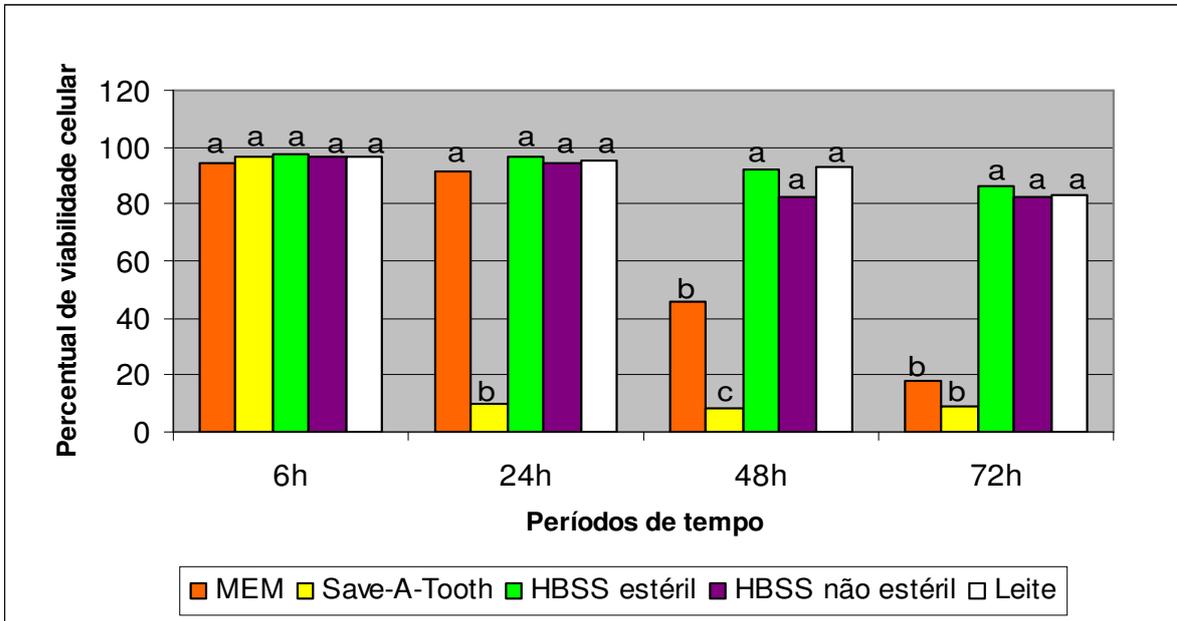


Figure 4 Resultados da determinação da viabilidade de fibroblastos periodontais conservados à temperatura ambiente em diferentes meios e períodos, obtidos através do método de exclusão do corante Azul de Tripano, expressos em percentuais. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. Treatment of the avulsed tooth. Recommended Guidelines of the American Association of Endodontists. Endodontics Today, 1994.

ANDREASEN, J. O; HJORTING-HANSEN, E. Replantation of teeth. Part I. Radiographic and clinical study of 22 replanted anterior teeth in humans. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.24, n.3, p.263-286, 1966.

ANDREASEN, J. O. Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.78, n.8, p.329-342, Apr. 1970.

ANDREASEN, J. O. et al. Periodontal and pulpal healing of monkey incisors preserved in tissue culture before replantation. **Int. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v.7, n.2, p.104-112, Apr. 1978.

ANDREASEN, J. O; KRISTERSON, L. The effect of limited drying or removal of periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.39, n.1, p.1-13, Jan. 1981.

ANDREASEN, J. O. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpar healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. **Int. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v.10, n.1, p.43-53, Feb. 1981.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. et al. Cytotoxicity and potencial antiviral evaluation of violacein produced by chromobacterium violaceum. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.6, p.843-848, Sep. 2003.

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.**, Copenhagen, v.15, n. 4, p.149-156, 1999.

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.**, Copenhagen , v.16, n.2, p.63-70, 2000.

BELFORD, D. A. et al. Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. **In vitro Cell Dev Biol. Anim.**, Columbia, v.31, p.752-760, 1995.

BERTOZ, F. A. et al. Processo de reparo em dentes reimplantados após a remoção mecânica das fibras periodontais radiculares. **Rev. Odont. UNESP**, São Paulo, v.18, n.1, p.81-89, jan./jun. 1989.

BLOMLÖF, L. et al. Vitality of periodontal ligament cells after storage of monkey teeth in milk or saliva. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.88, n.5, p.441-445, Oct. 1980.

BLOMLÖF, L.; OTTESKOG, P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.88, n.5, p.436-440, Oct. 1980.

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

BLOMLÖF, L. Storage of Human periodontal ligament cells in a combination of different media. **J. Dent. Res.**, Washington, v.60, n.11, p.1904-1906, Nov. 1981b.

BLOMLÖF, L. et al. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. **J. Dent. Res.**, Washington, v.62, n.8, p.912-916, Aug. 1983.

CHUNG, W-G. et al. Effect of chlorophyllin on normothermic storage of human periodontal ligament cells. **J. Endod.**, Baltimore, v.30, n.6, p.399-402, June 2004.

COURTS, F. J.; MUELLER, W. A.; TABELING, H. J. Milk as an interim medium for avulsed teeth. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.5, n.3, p.183-186, Sept. 1983.

CVEK, M.; GRANATH, L-E; HOLLENDER, L. Treatment of nonvital permanent incisors with calcium hydroxide. III Variation of occurrence of ankylosis of reimplanted teeth with duration of extra-alveolar period and storage environment. **Odontol. Revy**, Malmo, v.25, p. 43-56, 1974.

DONALDSON, M.; KINIRONS, M. J. Factors affecting the time of onset of resorption in avulsed and replanted incisor teeth in children. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.17, p.205-209, 2001.

DOYLE, D.L.; DUMSHA, T.C.; SYDISKIS, R.J.Effect of soaking in Hank' balanced salt solution or milk on PDL cell viability of dry stored human teeth. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.14, p. 221-224, May 1998.

FELIPPE, Wilson Tadeu. **Vitalidade das células do ligamento periodontal após armazenamento em diferentes meios e sua relação com o reparo após o reimplante.** 1998. 110f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells.** A Multimedia Guine. Wiley-Liss, 1999. CD.

GAMSON, E. K.; DUMSHA, T.C.; SYDISKIS, R. The effect of drying time on periodontal ligament cell vitality. **J. Endod.**, Baltimore, v.18, n.4, p.189, Apr. 1992

GIL, J. N. **Contribuição ao estudo da traumatologia Bucomaxilo-facial: Estudo prospectivo de 200 pacientes com traumatismos dento-alveolares.** 1989. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

HARKACZ, O. M.; CARNES, D. L.; WALTER, W. A. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. **J. Endod.**, Baltimore, v.23, n.11, p.687-690, Nov. 1997.

HILTZ, J.; TROPE, M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and Viaspan storage media. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.7, n.2, p.69-72, Apr. 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.**, Baltimore, v.22, n.1, p.30-33, Jan. 1996.

HUPP, J.; TROPE, M.; AUKHIL, I. The viability of periodontal ligament cells of teeth stored for extended periods. **J. Endod.**, Baltimore, v.22, n.4, p.215, Apr. 1996.

HUPP, J.G. et al. Periodontal ligament vitality and histologic healing of teeth stored for extended periods before transplantation. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.14, p. 79-83, 1998.

KRASNER, P.; PERSON, P. Preserving avulsed teeth for replantation. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.23, p.80-88, Nov. 1992.

KRASNER, P. Modern treatment of avulsed teeth by emergency physicians. **Am. J. Emerg. Med.**, Philadelphia, v.12, n.2, p.241-246, Mar. 1994.

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

LINDSKOG, S. BLOMLÖF, L. Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.40, n.6, p.435-441, Nov. 1982.

LINDSKOG, S. et al. Mitoses and microorganismos in the periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.1, n.3, p.96-101, June 1985.

LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L.; HAMMARSTROM, L. Mitosis and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.91, n.4, p.465-472, Dec.1983.

LITWIN, J.; LUNDQUIST, G.; SÖDER, P-O. Studies on long-term maintenance of teeth and viable associated cells in vitro. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.79, p.536-539, 1971.

MARINO, T. G. et al. Determination of Periodontal Ligament Cell Viability in Long Shelf-Life Milk. **J. Endod.**, Baltimore, v.26, n.12, p.699-702, Dec. 2000.

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

MATSSON, L. et al. Ankylosis of experimentally reimplanted teeth related to extra-alveolar period and storage environment. **Pediatr. Dent.**, Chicago, v.4, n.4, p.327-329, 1982.

MODDÉR, T.; DAHLÖF,G.; OTTESKOG, P. Effect of drying on Human Periodontal Ligament Repair in Vitro. **J. Int. Assoc. Dent. Child.**, London, v.15, n.1, p.15-20, June 1984.

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

OIKARINEN, K. S.; SEPPÄ, S. T. Effect of preservation media on proliferation and collagen biosynthesis of periodontal ligament fibroblasts. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.3, n.3, p.95-99, June 1987.

OLSON, B., D. et al. Comparison of Various Transport Media on Human Periodontal Ligament Cell Viability. **J. Endod.**, Baltimore, v.23, n.11, p.676-679, Nov. 1997.

PATIL, S.; DUMSHA, T. C.; SYDISKIS, R. J. Determining periodontal ligament (PDL) cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.27, n.1, p.1-5, Jan. 1994.

PEARSON, R. et al. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. **J. Endod.**, Baltimore, v.29, n.3, p.184-186, Mar. 2003.

PETTIETTE, M. et al. Periodontal healing of extracted dogs' teeth air-dried for extended periods and soaked in various media. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.13, p.113-118, 1997.

PICHE, J. E.; CARNES, D. L.; GRAVES, D. T. Initial characterization of cells derived from human periodontia. **J. Dent. Res.**, Washington, v.68, n.5, p.761-767, 1989.

SANT'ANA, A. C. P. et al. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v.10, n.3, p.134-140, 2002.

SIGALAS, E. et al. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.20, p.21-28, 2004.

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. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.18, p.190-195, 2002.

SIEUWERTS, A. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC₅₀- values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, Berlin, v.33, p.813-823, 1995.

SMEE, D. F. et al. Comparison of colorimetric fluorimetric, and visual methods for determining anti-influenza (H N and H N) virus activities and toxicities of compounds. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.106, p.71-79, 2002.

TROPE, M.; FRIEDMAN, S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hanks'balanced salt solution. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.8, n.5, p.183-188, Oct. 1992.

WALUM, E.; STRENBORG, K.; JENSSEN, D. **Understanding cell toxicology: principles and practice**. New York: Ellis Howood, 1990, p. 97-111.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Figuras

Figura 2 – Imagem de fotomicrografia da cultura primária de fibroblastos periodontais obtida após 10 dias de cultivo. (100X)

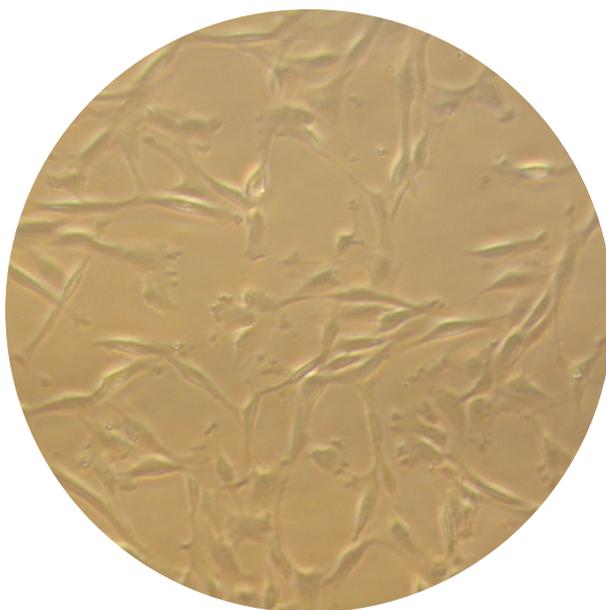


Figura 3 – Imagem de fotomicrografia da cultura de fibroblastos periodontais, obtida na primeira passagem. (100X)

APÊNDICE B – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Através do programa estatístico Stata 9.0 (Stata CorpLP, College Station, TX, USA), as médias dos valores de absorvância das 33 cavidades de cada grupo do teste MTT e o percentual de células viáveis nas 12 cavidades de cada grupo do teste Azul de Tripiano foram calculados. A normalidade dos dados foi avaliada através de histogramas e do teste de Shapiro-Wilk. Tendo-se constatado que, em ambos os casos, os dados não apresentaram distribuição normal, a comparação dos resultados dos diferentes grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Posteriormente, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Scheffé para localizar as diferenças estatisticamente significativas entre as médias de absorvância e percentual de células viáveis nos diferentes grupos e períodos num nível de significância de 5%.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados obtidos com o teste MTT à temperatura ambiente e a 37°C.

APÊNDICE C – Tabelas

Tabela 5 – Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorvância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 20°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 3h.

	MEM-37	MEM-20	HBSSe	Save-20	Leite-20	<i>Água-20</i>
MEM-20	-.154576 0.000					
HBSSe	-.170152 0.000	-.015576 0.955				
Save-20	-.182636 0.000	-.028061 0.541	-.012485 0.985			
Leite-20	-.050909 0.013	.103667 0.000	.119242 0.000	.131727 0.000		
<i>Água-20</i>	-.267576 0.000	-.113 0.000	-.097424 0.000	-.084939 0.000	-.216667 0.000	
HBSSn	-.148273 0.000	.006303 1.000	.021879 0.800	.034364 0.278	-.097364 0.000	.119303 0.000

Tabela 6 – Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorbância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 20°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 6h.

	MEM-37	MEM-20	HBSSe	Save-20	Leite-20	Água-20
MEM-20	-.097909 0.000					
HBSSe	-.093667 0.000	.004242 1.000				
Save-20	-.127788 0.000	-.029879 0.627	-.034121 0.460			
Leite-20	.017364 0.960	.115273 0.000	.11103 0.000	.145152 0.000		
Água-20	-.243909 0.000	-.146 0.000	-.150242 0.000	-.116121 0.000	-.261273 0.000	
HBSSn	-.082939 0.000	.01497 0.981	.010727 0.997	.044848 0.136	-.100303 0.000	.16097 0.000

Tabela 7 – Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorvância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 20°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 24h.

	MEM-37	MEM-20	HBSSe	Save-20	Leite-20	<i>Água-20</i>
MEM-20	-.190758 0.000					
HBSSe	-.129667 0.000	.061091 0.058				
Save-20	-.3 0.000	-.109242 0.000	.170333 0.000			
Leite-20	-.027818 0.859	.162939 0.000	.101848 0.000	.272182 0.000		
Água-20	-.318303 0.000	-.127545 0.000	-.188636 0.000	-.018303 0.981	-.290485 0.000	
HBSSn	-.104576 0.000	.086182 0.001	.025091 0.910	.195424 0.000	-.076758 0.004	.213727 0.000

Tabela 8 – Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorbância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 20°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 48h.

	MEM-37	MEM-20	HBSSe	Save-20	Leite-20	Água-20
MEM-20	-.299182 0.000					
HBSSe	-.127788 0.000	.171394 0.000				
Save-20	-.320788 0.000	-.021606 0.820	-.193 0.000			
Leite-20	-.029697 0.485	.269485 0.000	.098091 0.000	.291091 0.000		
Água-20	-.315788 0.000	-.016606 0.943	-.188 0.000	.005 1.000	-.286091 0.000	
HBSSn	-.121394 0.000	.177788 0.001	.006394 1.000	.199394 0.000	-.091697 0.000	.194394 0.000

Tabela 9 – Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorvância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 20°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 72h.

	MEM-37	MEM-20	HBSSe	Save-20	Leite-20	<i>Água-20</i>
MEM-20	-.343939 0.000					
HBSSe	-.113667 0.000	.230273 0.000				
Save-20	-.357879 0.000	-.013939 0.948	-.244212 0.000			
Leite-20	-.14703 0.000	.196909 0.000	-.033364 0.153	.210848 0.000		
<i>Água-20</i>	-.361636 0.000	-.017697 0.848	-.24797 0.000	-.003758 1.000	-.214606 0.000	
HBSSn	-.126758 0.000	.217182 0.000	-.013091 0.961	.231121 0.000	.020273 0.743	.234879 0.000

Tabela 10 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorbância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 37°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 3h.

	MEM-37	HBSSe	HBSSn	Leite	<i>Save</i>
HBSSe	-.018303 0.615				
HBSSn	-.000848 1.000	.017455 0.663			
Leite	130424 0.000	148727 0.000	.131273 0.000		
Save	-.080182 0.000	-.061879 0.000	-.079333 0.000	-.210606 0.000	
Água	-.281364 0.000	-.263061 0.000	-.280515 0.000	-.411788 0.000	-.201182 0.000

Tabela 11 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorvância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 37°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 6h.

	MEM-37	HBSSe	HBSSn	Leite	Save
HBSSe	-.025576 0.355				
HBSSn	-.014848 0.865	.010727 0.964			
Leite	124303 0.000	.149879 0.000	.139152 0.000		
Save	-.162576 0.000	-.137 0.000	-.147727 0.000	-.286879 0.000	
Água	-.28403 0.000	-.258455 0.000	-.269182 0.000	-.408333 0.000	-.121455 0.000

Tabela 12 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorbância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 37°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 24h.

	MEM-37	HBSSe	HBSSn	Leite	<i>Save</i>
HBSSe	-.112909 0.000				
HBSSn	-.102697 0.000	.010212 0.993			
Leite	.043909 0.133	.156818 0.000	.146606 0.000		
Save	-.334818 0.000	-.221909 0.000	.232121 0.000	-.378727 0.000	
Água	-.338545 0.000	-.225636 0.000	-.235848 0.000	-.382455 0.000	-.003727 0.000

Tabela 13 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorbância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 37°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 48h.

	MEM-37	HBSSe	HBSSn	Leite	<i>Save</i>
HBSSe	-.166879 0.000				
HBSSn	-.003121 0.000	.163758 0.000			
Leite	-.213788 0.000	-.046909 0.314	-.210667 0.000		
Save	-.323909 0.000	-.15703 0.000	-.320788 0.000	-.110121 0.000	
Água	-.325242 0.000	-.158364 0.000	-.322121 0.000	-.111455 0.000	-.001333 0.000

Tabela 14 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa da média dos valores de absorbância obtidos pelo teste colorimétrico MTT realizado a 37°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 72h.

	MEM-37	HBSSe	HBSSn	Leite	<i>Save</i>
HBSSe	-.250455 0.000				
HBSSn	-.058333 0.194	.192121 0.000			
Leite	-.364394 0.000	-.113939 0.000	-.306061 0.000		
Save	-.374242 0.000	-.123788 0.000	-.315909 0.000	-.009848 0.000	
Água	-.369758 0.000	-.119303 0.000	-.311424 0.000	-.005364 0.000	.004485 0.000

Tabela 15 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa do percentual de viabilidade celular pelo método de exclusão do corante Azul de Tripano realizado a 20°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 24h.

	MEM-20	Save	HBSS e	<i>HBSSn</i>
Save	-81.8323 0.000			
HBSSe	5.06318 0.679	86.8955 0.000		
HBSSn	3.27265 0.913	85.105 0.000	-1.79054 0.990	
Leite	3.73682 0.866	85.5691 0.000	-1.32636 0.997	.464174 1.000

Tabela 16 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa do percentual de viabilidade celular pelo método de exclusão do corante Azul de Tripano realizado a 20°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 48h.

	MEM-20	Save	HBSSe	<i>HBSSn</i>
Save	-37.2516 0.000			
HBSSe	46.6131 0.000	83.8647 0.000		
HBSSn	36.7048 0.000	73.9564 0.000	-9.90828 0.326	
Leite	47.9037 0.000	85.1553 0.000	1.29066 0.999	11.1989 0.209

Tabela 17 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa do percentual de viabilidade celular pelo método de exclusão do corante Azul de Tripano realizado a 20°C, após a conservação dos fibroblastos nos diferentes meios pelo período de 72h.

	MEM-20	Save	HBSSe	<i>HBSSn</i>
Save	-9.10076 0.530			
HBSSe	68.5605 0.000	77.6613 0.000		
HBSSn	64.4878 0.000	73.5885 0.000	-4.07275 0.957	
Leite	65.5045 0.000	74.6053 0.000	-3.05597 0.985	1.01678 1.000

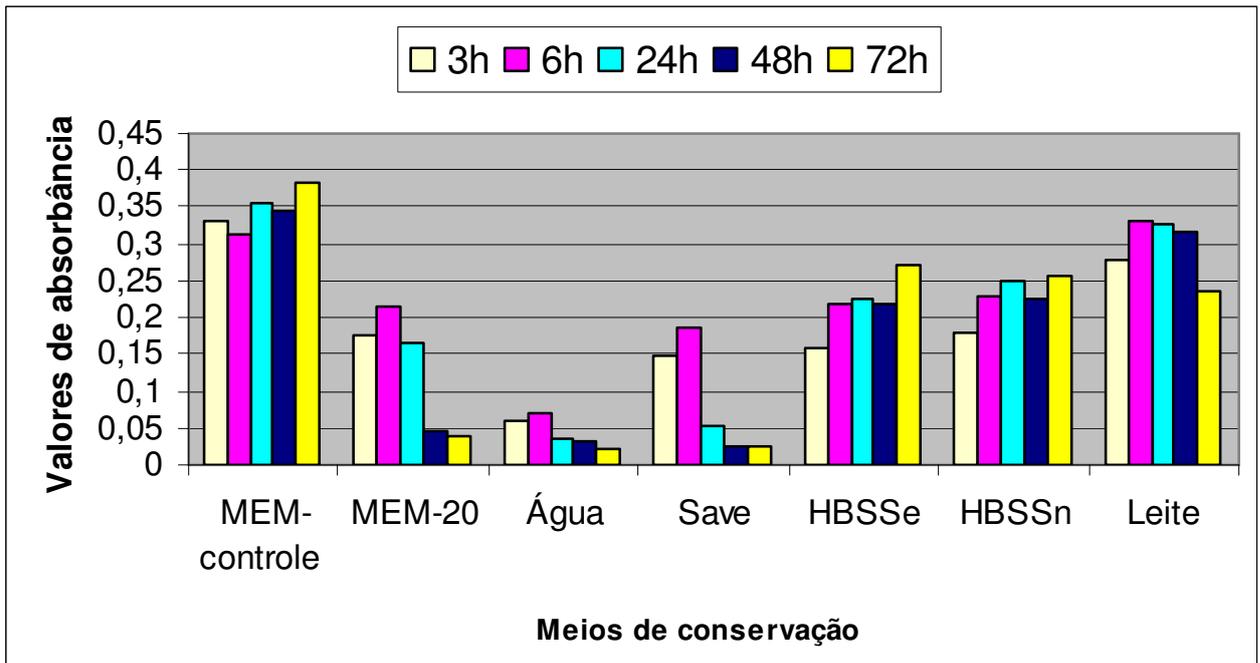


Gráfico 1 - Valores de absorbância obtidos pelo método colorimétrico MTT, após a conservação dos fibroblastos periodontais à temperatura ambiente, nos diferentes meios e períodos.

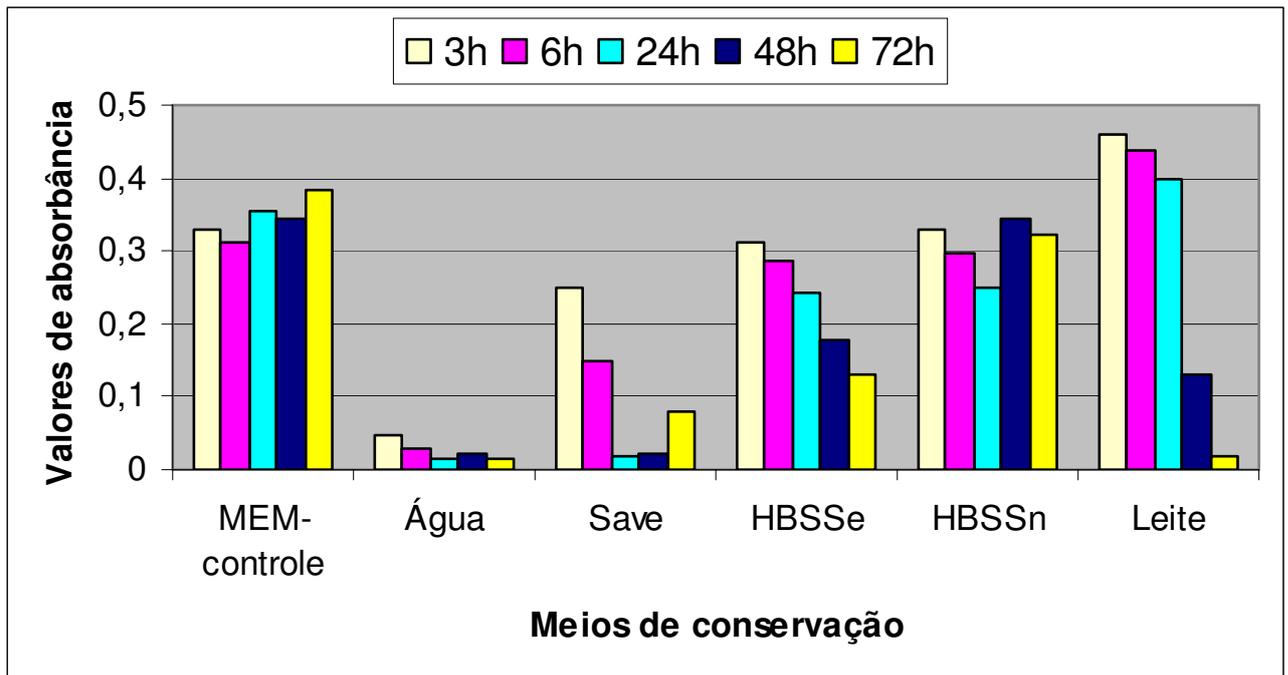


Gráfico 2 - Valores de absorbância obtidos pelo método colorimétrico MTT, após a conservação dos fibroblastos periodontais a 37°C, nos diferentes meios e períodos.

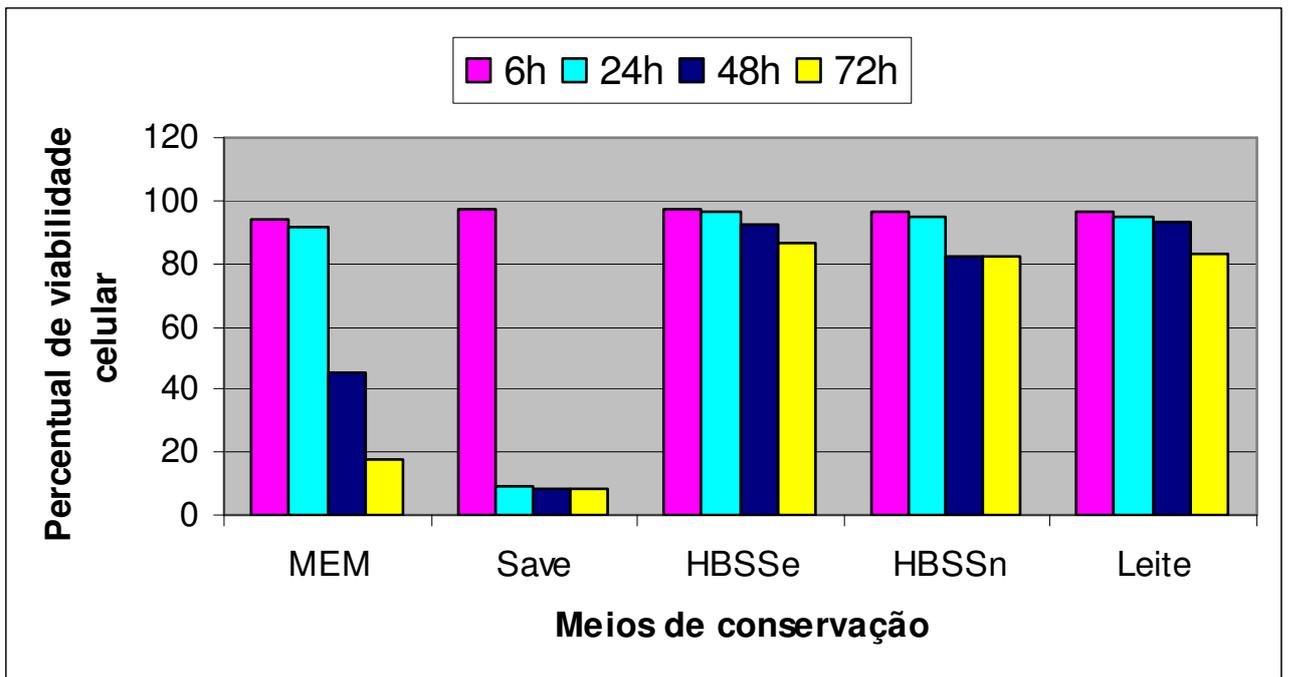


Gráfico 3 - Percentuais de viabilidade celular obtidos pelo método de exclusão do corante Azul de Tripiano, após a conservação dos fibroblastos periodontais nos diferentes meios e períodos.

APÊNDICE E – Metodologia Expandida

1 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina, classificado como Laboratório com nível de segurança tipo 2, ou seja, possui os equipamentos necessários para assegurar a devida proteção aos pesquisadores, ao experimento propriamente dito e ao meio ambiente.

Para melhor entendimento, este capítulo foi subdividido, objetivando apresentar os materiais utilizados, relatar os procedimentos prévios a sua execução, abordar a origem e preparo dos meios de conservação avaliados, além de detalhar a execução dos testes de citotoxicidade empregados.

1.1 MATERIAIS

1.1.1 Meio de Cultura

O Meio Essencial Mínimo (MEM), utilizado para a proliferação e manutenção das células, é constituído de aminoácidos, vitaminas, proteínas, minerais, carboidratos, fatores de crescimento, entre outros, nutrientes essenciais que fornecem a energia necessária para o metabolismo e proliferação celular (FRESHNEY, 1999).

Outra função do MEM é controlar o pH e a osmolaridade da cultura celular, mantendo-os adequados para que as células continuem viáveis, tamponando e protegendo-as de mudanças bruscas no ambiente de cultivo (FRESHNEY, 1999).

A atmosfera no interior da estufa deve ser saturada com vapores d'água a fim de prevenir a evaporação e o aumento da osmolaridade do meio. A osmolaridade do plasma humano é de 290 mOsm/kg, considerado também um valor ótimo para células, *in vitro*, mas na prática valores de 260 a 320 mOsm/kg são bem aceitos.

Conforme as recomendações do fabricante (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 9,77g de MEM foi diluído em 1 L de água Milli-Q. Após o preparo, o pH do meio foi mantido entre 7,2 e 7,4 com o uso de NaOH (0,1 N) e HCl (1 N).

1.1.2 Soro Fetal Bovino

O soro fetal bovino (SFB) é rico em fatores de crescimento e tem alto teor de gama-globulina. Foi adicionado ao meio de cultura para permitir a manutenção e a proliferação celular. O SFB também protege a cultura de perturbações tóxicas, como mudanças de pH, presença de metais pesados, atividade proteolítica e endotoxinas (FRESHNEY, 1999). Para o crescimento das culturas celulares e sua manutenção foi utilizado SFB (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) na concentração de 10% e 5%, respectivamente.

1.1.3 Antibióticos e Antifúngico

Para evitar a contaminação das culturas celulares por bactérias, fungos e leveduras, foi adicionado ao meio uma associação de antibióticos e antifúngico (PSA) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) na proporção de 1% ou 2%, composta de: 10.000 UI de penicilina G sódica, 10 mg de sulfato de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B.

1.1.4 Tripsina

A tripsina é uma enzima do grupo das proteases que catalisa as reações de quebra da cadeia polipeptídica em determinadas seqüências de aminoácidos. Essa enzima não requer a presença de co-fatores e é muito utilizada em culturas de células que necessitam de um suporte para fixação e proliferação. Ela é um meio químico de dissociação celular que age, então, sobre as proteínas que permitem a fixação das células no suporte, liberando-as. Para evitar a citólise, após a individualização das células, a tripsina deve ter sua ação proteolítica inibida através do meio de cultura + SFB (FRESHNEY, 1999). Nos experimentos foi utilizada tripsina de pâncreas de porco (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) a 0,25% diluída em solução de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) a 0,05%. O volume utilizado foi de 0,5 ml e 1 ml para garrafas de 25 e 75 cm², respectivamente.

1.1.5 Solução Salina Fosfato Tamponada

A solução salina fosfato tamponada (PBS) é uma mistura de sais que, ao ser utilizada para a lavagem do tapete celular, remove resíduos orgânicos e celulares. Possui pH em torno

de 7,0. Foi preparada com 8,0 g de NaCl (Gibco, Gibco Industries Inc., EUA), 0,2 g de KCl (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA), 1,44 g de Na₂HPO₄ (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA), 0,24 g de KH₂PO₄ (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA), em quantidade suficiente para 1 L de água Milli-Q. Após o preparo, a solução (PBS) foi esterilizada em autoclave.

1.1.6 Dimetilsulfóxido

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente crioprotetor adicionado ao meio de cultura previamente ao congelamento de células. Praticamente, ele não evita os danos causados pelo resfriamento rápido (formação intracelular de cristais de gelo), mas impede ou diminui os danos causados pelo resfriamento lento (desidratação e retração celulares) (FRESHNEY, 1999).

1.1.7 Sal de Tetrazólio

O sal de tetrazólio (3-4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil tetrazolim Brometo)-(MTT) é um composto hidrossolúvel facilmente incorporado pelas células viáveis, que o reduz em suas mitocôndrias pela ação das desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em cristais de formazana, os quais ficam armazenados no citoplasma celular e são, depois, solubilizados pelo DMSO (MOSSMANN, 1983; SIEUWERTS et al., 1995; ANDRIGHETTI- FRÖHNER et al., 2003).

A viabilidade das células e sua atividade metabólica são fornecidos através da quantificação da formazana produzida pelas mesmas (valores de absorbância), realizado em um espectrofotômetro (Bio-Tek, EL_x 800) a 540 nm.

1.1.8 Azul de Tripano

O azul de tripano é um corante vital. O fenômeno de permeabilidade da membrana celular permite estimar, indiretamente, o grau de integridade da mesma. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (WALUM; STENBERG; JENSSEN, 1990).

1.2 MÉTODOS

1.2.1 Procedimentos prévios

Previamente ao início dos experimentos foi necessário obter as culturas primárias, estabelecer a linhagem celular, determinar o número ideal de células a ser colocado nas cavidades das placas e preparar as placas de cultura.

1.2.1.1 Obtenção das culturas primárias de fibroblastos periodontais humanos

Antes da realização da exodontia, os doadores foram informados sobre o projeto, concordaram em participar da pesquisa por livre e espontânea vontade, e assinaram o consentimento informado, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. (Protocolo de Pesquisa n° 077/07- ANEXO A)

Dois terceiros molares, recém-extraídos por razões ortodônticas, de pacientes atendidos no Centro Cirúrgico do Curso de Odontologia da UFSC, foram imediatamente colocados em tubos de centrífuga de 50 ml contendo 30 ml de PBS estéril e 2% de PSA e transportados para a Sala de Cultura de Células do Laboratório de Virologia Aplicada.

Todos os procedimentos para o cultivo primário e o estabelecimento da linhagem foram realizados em cabine vertical de segurança biológica (VECO, Campinas, SP, Brasil), em temperatura ambiente (20°C), da técnica descrita por Sant'Ana et al. (2002), com modificações. Na cabine, os dentes foram lavados 2x com tampão PBS estéril contendo 1% de PSA. O ligamento periodontal do terço médio das raízes de cada dente foi removido com uma lâmina cirúrgica n° 15 e colocado em garrafas de cultura de 25 cm² (TPP/Switzerland/Europe) contendo MEM, 10% SFB e 1% de PSA. Em seguida, as garrafas foram incubadas em estufa (Ultrasafe, modelo HF 212 UV) a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂ em atmosfera umedecida.

A proliferação celular dessas culturas primárias foi monitorada através de um microscópio de fase invertido (40-200x, Nikon, Tokyo, Japão) e fotografada regularmente para acompanhamento.

1.2.1.2 Estabelecimento da linhagem celular

Os fibroblastos foram cultivados até o tapete celular atingir confluência. Uma vez confluentes, as células foram lavadas 3x com PBS, o explante foi removido, as células foram tripsinizadas e parcialmente transferidas para outra garrafa, dando origem a uma subcultura (primeira passagem). O meio de cultura foi renovado, em média, a cada 3 dias e observado diariamente para verificar possível alteração de sua coloração. Assim que nova confluência do tapete celular foi verificada, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas 3x com PBS e nova tripsinização foi realizada para a manutenção da linhagem celular. A inativação da tripsina foi feita pela adição de 5 ml de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA. As garrafas retornaram para a estufa de CO₂, onde permaneceram até que nova confluência fosse obtida. Cada tripsinização deu origem a 1 nova passagem.

Alíquotas de suspensões celulares foram congeladas para garantir a cultura utilizando o Procedimento Operacional Padrão (Pop) do Laboratório de Virologia Aplicada. Inicialmente, foi preparado o meio de congelamento em banho de gelo contendo: 50% de MEM, 40% de SFB e 10% de DMSO (Nuclear, Diadema, SP, Brasil). O tapete celular foi lavado 3x com PBS, as células foram tripsinizadas, e foram adicionados 10 ml de meio de cultura suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA. A suspensão celular foi transferida para um tubo estéril de 15 ml, centrifugada a 150 Xg de 3 a 5 min. Em seguida, o meio foi aspirado preservando-se o agregado de células (pellet) no fundo do tubo, ao qual foram adicionados rapidamente 3,6 ml do meio de congelamento previamente preparado. Após a homogeneização com uma pipeta, o conteúdo do tubo foi transferido para 2 criotubos de 1,8 ml, mantidos em banho de gelo. Os criotubos foram congelados a -80°C. Aproximadamente 20h depois, eles foram colocados no container de nitrogênio líquido (MVE Inc., EUA) a -126°C.

Com o intuito de obter uma maior quantidade de células para a preparação das placas de cultura, 1 semana antes da execução do experimento, as células congeladas foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C e colocadas em garrafas de cultura de 75 cm² com MEM contendo 10% de SFB e 1% de PSA. Uma alíquota de 10 ml foi reservada para verificar a viabilidade celular com o corante Azul de Tripiano. As garrafas foram, então, incubadas a 37°C em estufa de CO₂. No total, 8 garrafas de 75 cm² com células pertencentes da quinta a décima passagem foram utilizadas para a realização dos experimentos.

1.2.1.3 Determinação do número ideal de células por cavidade

Um estudo piloto foi realizado para determinar o número ideal de células a ser colocado nas cavidades das placas. Uma placa de cultura com 24 cavidades (Corning, Corning, NY, USA) foi preparada de forma que 6 delas fossem preenchidas com 1 ml de MEM contendo 8×10^4 células, 6 com 1 ml contendo 12×10^4 células e 6 com 1 ml contendo 16×10^4 células. A placa foi incubada a 37°C em estufa de CO_2 por 24h quando a confluência do tapete celular foi avaliada. Nas 6 cavidades da placa que receberam 16×10^4 células foi observado um número excessivo de células, as quais se apresentavam aderidas ou empilhadas umas sobre as outras ou descoladas (mortas). Nas cavidades com 12×10^4 células, o tapete celular estava mais bem organizado, com as células bem confluentes; e nas cavidades com 8×10^4 células, o tapete celular estava confluyente, mas havia espaços vazios entre as células. Como era intenção estender os períodos experimentos para 72h, o uso de 12×10^4 células provavelmente resultaria em um crescimento exagerado da cultura. Assim, ficou estabelecido que as cavidades deveriam receber 8×10^4 células/ml (placas de 24 cavidades) ou 8×10^4 células/100 μl (placas de 96 cavidades).

1.2.1.4 Preparação das placas de cultura

Para a preparação das placas de cultura, as células foram tripsinizadas e, em seguida, colocadas em um tubo de centrífuga com o mínimo de volume de meio. A suspensão foi adequadamente homogeneizada e 1 alíquota de 10 μl foi colocada na Câmara de Neubauer para contagem no microscópio ótico invertido. Após os cálculos, a suspensão celular contendo o número adequado de células por ml foi distribuída nas placas de cultura para dar início aos experimentos.

1.2.2 Execução dos experimentos

Para a execução do trabalho, foram utilizados os seguintes meios de conservação:

- a) MEM: esterilizado em filtro 0,22 μm (Millipore, Baruiiri, SP, Brasil) e suplementado com 2% de SFB e 1% de PSA (pH 7,3);
- b) HBSS não estéril: preparado no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC. O preparo foi feito de acordo com a fórmula: cloreto de sódio (8 g/l), D-glicose (0,4 g/l), cloreto de potássio

(0,4 g/l), bicarbonato de sódio (0,35 g/l), fosfato de sódio (0,09 g/l), fosfato de potássio (0,14 g/l), cloreto de cálcio (0,14 g/l) e sulfato de magnésio (0,1 g/l) – (bula do Save-A-Tooth®) (pH 7,0);

c) HBSS estéril: Após o preparo, o HBSS foi esterilizado em filtro 0,22 µm (pH 7,0);

d) Save-A-Tooth® (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA) (pH 6,4);

e) Leite: pasteurizado - longa vida desnatado (PARMALAT, São Paulo, Brasil). No momento do uso, a caixa foi aberta dentro da cabine, sob condições assépticas (pH 6,8);

f) Água: imediatamente retirada da torneira do próprio laboratório (pH 7,6).

O pH de cada um dos meios de conservação foi verificado através de pHmetro digital (Digimed-modelo: DM20, Canada) calibrado com soluções de pH 7,0 e 4,0.

Para a avaliação da viabilidade celular, foram utilizados dois testes: Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazólio (MTT) e Método de Exclusão do Corante Azul de Tripano.

1.2.2.1 Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazólio (MTT)

O ensaio MTT foi empregado conforme proposição por Mossmann (1983), modificado por Sieuwerts et al. (1995) e adaptado por Andrighetti- Fröhner et al. (2003).

Protocolo: Foram utilizadas 10 placas de cultura (Corning, Corning, NY, USA) com 96 cavidades. As 8 cavidades da primeira coluna (vertical) ficaram vazias (branco) e todas as cavidades restantes foram preenchidas com 100 µl de MEM contendo 8×10^3 células. As placas foram incubadas a 37°C com 5% CO₂. Depois de 24h, foi verificada a confluência do tapete celular. O MEM foi, então, descartado por aspiração, e 100 µl de cada um dos meios de conservação a ser testado foram colocados nas 11 cavidades de cada fila, constituindo os seguintes grupos:

Grupo 1 – MEM;

Grupo 2 – Tampão HBSS esterilizado;

Grupo 3 – Save-A-Tooth®;

Grupo 4 – Leite;

Grupo 5 – Água de torneira;

Grupo 6 – Tampão HBSS não estéril.

Cinco das 10 placas preparadas foram deixadas à temperatura ambiente (20°C) e 5 foram incubadas a 37°C. Após 3, 6, 24, 48 e 72h, o aspecto da cultura foi analisada em microscópio de luz e os meios de conservação foram substituídos por 50 µl da solução de MTT (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) + MEM (1mg/ml em MEM). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C e após 4h foi retirado o MTT + MEM de cada cavidade, de forma cuidadosa, procurando não danificar as células. Depois, foram adicionados 100 µl de DMSO em todas as cavidades (inclusive nas cavidades vazias da primeira coluna). As placas foram, então, agitadas levemente de 2 a 5 min para que toda a formazana fosse solubilizada. A leitura de absorbância foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro.

Os experimentos foram realizados em triplicata, em dias independentes. Ao final, os valores de absorbância de cada meio foram devidamente anotados e agrupados para análise estatística.

Com o intuito de facilitar a discussão dos resultados, os percentuais de viabilidade celular foram calculados levando-se em consideração os valores das médias das absorbâncias verificados no grupo-controle (MEM 37°C), nos diferentes períodos.

1.2.2.2 Método de Exclusão do Corante Azul de Tripiano

O método de Exclusão do Corante Azul de Tripiano foi desenvolvido conforme proposto por Walum; Stenberg; Jenssen (1990), com pequenas modificações.

Protocolo: Foram utilizadas 4 placas de cultura com 24 cavidades, sendo uma placa para cada período de tempo testado (6, 24, 48 e 72h).

Após o preenchimento das cavidades com 1 ml de MEM contendo 8×10^4 células, as placas foram incubadas a 37°C com 5% CO₂. Depois de 24h, foi verificada a confluência do tapete celular. O MEM foi descartado por aspiração, as células foram lavadas com 1 ml de PBS, e 1 ml de cada um dos meios de conservação testados foi colocado nas 4 cavidades de cada coluna, constituindo os seguintes grupos:

Grupo 1 – MEM;

Grupo 2- Save-A-Tooth®;

Grupo 3- Tampão HBSS esterilizado;

Grupo 4- Tampão HBSS não estéril;

Grupo 5- Leite.

As placas foram deixadas à temperatura ambiente (20°C) por 6, 24, 48 e 72h, após as quais os meios de conservação foram aspirados. Depois do tapete celular ser lavado com 1 ml de PBS, as células foram dissociadas pela tripsina, a qual foi inativada pela adição de MEM contendo 5% de SFB. Em seguida, a suspensão celular foi recolhida, centrifugada a 150 Xg durante 5 min, o sobrenadante foi parcialmente aspirado e o sedimento homogenizado com o sobrenadante restante. De cada suspensão celular, 1 alíquota de 100 µl foi retirada e homogenizada com 100 µl da solução de Azul de Tripiano (Sigma, Sigma Chemical CO., EUA) a 0,4% em PBS, por 3 min. A contagem do número de células viáveis e não viáveis foi realizada em Câmara de Neubauer, no microscópio de luz invertido (aumento de 40x).

Os experimentos foram realizados em triplicata, em dias independentes. O número de células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas) presentes nas 12 cavidades de cada grupo foram devidamente registradas para futura análise estatística.

1.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Através do programa estatístico Stata 9.0 (Stata CorpLP, College Station, TX, USA), as médias dos valores de absorbância das 33 cavidades de cada grupo do teste MTT e o percentual de células viáveis nas 12 cavidades de cada grupo do teste Azul de Tripiano foram calculados. A normalidade dos dados foi avaliada através de histogramas e do teste de Shapiro-Wilk. Tendo-se constatado que, em ambos os casos, os dados não apresentaram distribuição normal, a comparação dos resultados dos diferentes grupos foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Posteriormente, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Scheffé para localizar as diferenças estatisticamente significativas entre as médias de absorbância e percentual de células viáveis nos diferentes grupos e períodos, num nível de significância de 5%.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados obtidos com o teste MTT à temperatura ambiente e a 37°C.

ANEXO

ANEXO A - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS - CEP
PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO N°. 077/07

I – IDENTIFICAÇÃO

Título do projeto: “Comparação *in vitro* da efetividade do leite e de uma solução teste em manter a vitalidade de fibroblastos do ligamento periodontal de dentes humanos”.

Área: Odontologia

Pesquisador Responsável: Mara Cristina Santos Felipe

Pesquisador Principal: Beatriz Dulcinéia Mendes de Souza

Data da coleta dos dados: 04/2007 a 05/2007.

Instituição em que será realizado o estudo: Laboratório de virulogia aplicada (MIP-CCB)

II – Objetivos

Gerais: Estabelecer um protocolo de cultura de fibroblastos do ligamento periodontal humano e verificar a efetividade *in vitro* de uma solução teste (tampão HBSS) na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.

Específicos: 1. Obter ligamento periodontal humano de terceiros molares saudáveis de pacientes atendidos na clínica de cirurgia II da faculdade de odontologia da UFSC; 2. Obter cultura primária a partir do ligamento periodontal humano obtido; Estabelecer uma linhagem celular a partir do cultivo primário de fibroblastos do ligamento periodontal humano obtido; 4. Comparar a efetividade *in vitro* do leite longa vida e de uma solução teste (tampão HBSS) na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano, em diferentes períodos de tempo e temperatura, através da avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do corante Azul de Tripano e pelo ensaio colorimétrico do MTT.

III – SUMÁRIO DO PROJETO: Trata-se de um estudo de dissertação na área da odontologia. Será extraído um dente hígido por razões alheias à pesquisa que fornecerá tecido periodontal suficiente para estabelecer a linhagem celular. Será avaliada a capacidade de diferentes meios de conservação de dentes avulsionados, fato comum especialmente em crianças de 8-12 anos. Será realizado dois testes de citotoxicidade para verificar o número de células viáveis (teste com azul de tripano e ensaio calorimétrico com sal de tetrazolium (MTT). Será utilizado o leite e uma solução salina balanceada de Hanks como meio efetivos a conservação. Pretende-se divulgar o meio mais efetivo para conservação de dentes especialmente nos locais com maior probabilidade de acidentes.

IV – COMENTÁRIO: A pesquisa proposta tem relevância científica e social. O tema faz parte da linha de atuação dos pesquisadores. Os documentos exigidos pela legislação foram anexados. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) está adequado.

(X) aprovado

Parecer:

Tendo em vista o exposto, sou de parecer favorável à aprovação do referido projeto.

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado, em reunião deste Comitê na data de 07 de maio de 2007.

Prof. Washington Farieta de Souza
Coordenador do CEP-UFSC