

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

**MEIOS DE CONSERVAÇÃO DE DENTES AVULSIONADOS:
ESTUDO EM CULTURA DE CÉLULAS.**

Tese de Doutorado

Beatriz Dulcineia Mendes de Souza Kremer

Florianópolis

2009

BEATRIZ DULCINEIA MENDES DE SOUZA KREMER

**MEIOS DE CONSERVAÇÃO DE DENTES AVULSIONADOS:
ESTUDO EM CULTURA DE CÉLULAS.**

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

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

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Tadeu Felippe

Florianópolis

2009

A **Deus**, que ilumina meu caminho todos os dias.

Ao meu filho, **João Manoel**, por muitas vezes ter que aceitar a minha ausência. Esta luta foi para e por você.

Aos meus pais, **Maria da Conceição, José Nelson** e aos meus irmãos, **Adolfo José e Maria Gabriela** pelo apoio constante e irrestrito em todos os anos de minha formação.

A **Julliano Kremer**, pelo apoio e estímulo durante esta caminhada.

"Com muita gratidão, a vocês, dedico este trabalho"

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Prof^a. Dra. Mara Cristina Santos Felipe**, por acreditar em mim e me dar esta oportunidade. Pelos ensinamentos concedidos, dedicação, perfeccionismo, preocupação e presteza. Agradeço as conversas, conselhos e experiência de vida. Te admiro muito!!!

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe**, pela contribuição e experiência profissional compartilhada, estando sempre de prontidão para quaisquer dúvidas a serem sanadas.

À **Prof^a. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões**, por mais uma vez abrir-me as portas de seu laboratório para que ali eu pudesse realizar a parte experimental deste trabalho. Pelo seu exemplo de determinação, competência e profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

À **Jessie Reyes Carmona**, pela sua preciosa ajuda, pelos conselhos e pela paciência de sempre me ouvir. Vou sentir saudades "miga"!!!

À **Luonothar A. S. Dreger e Caroline A. Martins** pelo convívio nestes anos, que nos fez grandes amigas. Obrigada pela força e pelas energias positivas. Adoro vocês!!!

À **Ana Maria Hecke Alves e Maria Helena Pozzobon**, pessoas tão especiais que foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui. Obrigada principalmente pelo senso de justiça.

À **Cleonice S. Teixeira e a Eduardo Antunes Bortoluzzi**, pessoas maravilhosas que estavam sempre disponíveis quando eu precisei. Obrigada! Admiro muito vocês!!

À **Gabriela S. Felipe**, que com sua simplicidade e alegria conquista a todos nós!

Aos queridos funcionários: **Jaqueline Natividade, Marly Nunes, Sérgio Batista Andrade**, sempre gentis e dispostos a me ajudar.

À amiga **Débora Denardin Lückemeyer**, que de alguma forma estava sempre presente para me ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada: **Débora, Jéssica, Izabella, Thiago, Aline, Vanessa, Cristian, Ariadne, Jadel, Francielle, Adriana**

Marina, Caroline e Cristiane. Por todas as horas de convivência, pela acolhida fraterna.

Aos **professores do laboratório de neuroquímica (Bioquímica)** por gentilmente me autorizarem a utilizar o seu espectrofotômetro.

À **professora Mabel Cordeiro**, pela sua amizade, simplicidade e disposição para me ajudar.

Ao **professor Wilson Pacheco**, pelo seu carinho e pelo grande exemplo de amigo e professor.

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 minha nova amiga **Juliana Botelho**, pela ajuda, conversas e consolos. Foi muito bom conhecer você!!!

Às amigas do coração: **Luciana Lopes, Patrícia Pescador, Patrícia Tassinari e Scheila Moraes**, que foram meu apoio em todos os momentos alegres e tristes desta caminhada.

À **Salette Pinheiro**, por cuidar tão bem de meu filho na minha ausência.

"A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade"

"Quem sabe pode muito, mas quem ama pode mais."

Chico Xavier

SOUZA, B. D. M. **Meios de conservação de dentes avulsionados: Estudo em cultura de células**. 2009. 136f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Diversas pesquisas clínicas ou com cultura de células têm sido realizadas com o intuito de identificar o meio mais adequado para a conservação de dentes avulsionados ou de fibroblastos periodontais. Embora, na maioria das vezes, essas pesquisas confirmem ou refutem uma hipótese experimental, normalmente elas dão origem a algumas dúvidas. Esta tese de doutorado é composta de 4 pesquisas desenvolvidas com os objetivos de: 1) verificar se a renovação do leite, em intervalos regulares de 12, 24 ou 48h, é capaz de prolongar sua capacidade de manter a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLPH); 2) verificar se o tempo de estocagem da solução salina balanceada de Hank (HBSS) exerce influência sobre a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH; 3) comparar o efeito de diferentes meios de conservação sobre a viabilidade de FLPH; e 4) comparar o efeito de diferentes meios de conservação sobre a viabilidade e a capacidade proliferativa de FLPH. Para executá-las, as células foram conservadas, a 5 e/ou a 20°C, em própolis, clara de ovo, água de coco, HBSS, Save-A-Tooth[®], leite desnatado e leite integral por períodos variáveis. Células armazenadas em Meio Essencial Mínimo (MEM) a 37°C e em água de torneira (5 e/ou a 20°C) serviram de controle-positivo e negativo, respectivamente. A viabilidade e a capacidade de proliferação celular foram determinadas pelo ensaio MTT. Os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis, Scheffé e Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). Com base nos resultados obtidos nos diferentes experimentos foi possível concluir que: 1) a renovação do leite foi capaz de prolongar a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH somente quando realizada, a cada 48h, no leite mantido a 5°C; 2) o tempo de estocagem da HBSS influenciou negativamente a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH; 3) em ambas as temperaturas, o leite desnatado foi o melhor meio de conservação, seguido pelo leite integral e HBSS. O própolis, a clara de ovo e a água de coco podem ser indicados para a conservação de fibroblastos periodontais por um período máximo de 3h; 4) em ambas as temperaturas, os meios mais efetivos em manter a viabilidade celular (0h) foram o leite desnatado e o leite integral. Quando os meios foram mantidos a 5°C, o leite desnatado e o leite integral proporcionaram maior capacidade proliferativa aos FLPH. Quando mantidos a 20°C, a HBSS revelou os melhores resultados.

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

SOUZA, B. D. M. **Meios de conservação de dentes avulsionados: Estudo em cultura de células.** 2009. 136f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

Several clinical trials or cell culture studies have been carried out in order to identify the most appropriate storage medium for the maintenance of avulsed teeth or periodontal fibroblasts. Although in most cases, these studies confirm or refute an experimental hypothesis, they often give rise to some uncertainties. This doctoral thesis is composed of 4 studies developed with the following purposes: 1) to analyze whether the replacement of milk at 12, 24 or 48 h, can extend its ability to maintain human periodontal ligament fibroblasts (HPDLF) viability; 2) to verify if the storage time influences the effectiveness of Hank's balanced salt solution (HBSS) in maintaining HPDLF viability; 3) to compare the effect of different storage media to preserve HPDLF viability; and 4) to evaluate the effect of different storage media on the maintenance of the viability and proliferative capacity of HPDLF. The cells were stored at 5 and / or 20°C in propolis, egg white, coconut water, HBSS, Save-A-Tooth®, skimmed and whole milk for different periods of time. Cells stored at 37°C in Minimum Essential Medium (MEM) and tap water (5 and / or 20°C) served, respectively, as positive and negative controls. The viability and cellular proliferation capacity was determined by MTT assay. Data were analyzed by Kruskal-Wallis, Scheffe and Mann-Whitney tests ($\alpha = 5\%$). Based on the results obtained in the different experiments, it was concluded that: 1) milk replacement was able to extend its ability to maintain HPDLF viability only when carried out every 48 hours at 5°C, 2) the storage time of HBSS negatively influenced its effectiveness, 3) at both temperatures, skim milk, followed by whole milk and HBSS preserved significantly more viable cells than any other tested solution. Propolis, egg white and coconut water can be indicated to preserve HPDLF for up to 3 hours, 4) at both temperatures, the most effective mediums to maintain cell viability (0 h) were skimmed and whole milk. When the media were kept at 5° C, skimmed and whole milk provided higher proliferative capacity to HPDLF. When kept at 20°C, HBSS showed the best results.

Keywords: Tooth avulsion. Periodontal ligament fibroblasts. Storage media.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 MEIOS DE CONSERVAÇÃO.....	13
1.2 METODOLOGIA COMUM AOS DIFERENTES EXPERIMENTOS.....	21
2 ARTIGOS	
2.1 ARTIGO 1: Efeito da renovação do leite sobre a manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.	25
2.2 ARTIGO 2: Efeito do tempo de estocagem da HBSS sobre a manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.	33
2.3 ARTIGO 3: Efeito do própolis, da clara de ovo e da água de coco sobre a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.	41
2.4 ARTIGO 4: Efeito de diferentes meios de conservação sobre a viabilidade e a capacidade proliferativa de fibroblastos do ligamento periodontal humano.	53
3 CONCLUSÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	
A - FIGURAS.....	72
B - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
C - TABELAS	84
D - GRÁFICOS.....	130
ANEXO	
A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA- CEP/UFSC.....	134

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Andreasen; Andreasen; Andersson (2007), de 0,5% a 3% das lesões traumáticas dento-alveolares, na dentição permanente, resultam em avulsão, ou seja, no deslocamento total do dente para fora do alvéolo. Em estudo realizado no Brasil, na Universidade Federal de Santa Catarina, este percentual alcançou 15% (ROCHA; CARDOSO, 2001).

Durante o período extra-alveolar, as células do ligamento periodontal, aderidas à parede do alvéolo, 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; HIØRTING-HANSEN, 1966). Em um estudo clínico desenvolvido por Cvek; Granath; Hollender (1974) todos os dentes reimplantados após conservação em ambiente seco por mais de 1h apresentaram sinais clínicos e radiográficos de anquilose. 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.

Cvek; Granath; Hollender (1974), 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). Quando o período a seco é de 2h, estudos demonstraram que ocorre 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 (ANDREASEN, 1981; BLOMLÖF, 1981a; 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). Portanto, 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; ANDREASEN, 1981; BLOMLÖF, 1981a; LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTROM, 1983; HUPP et al., 1998), e que o tratamento ideal é reimplantar o dente logo após a avulsão (ANDREASEN; HJORTING-HANSEN, 1966; ANDREASEN; KRISTERSON, 1981; BLOMLÖF et al., 1983; TROPE; FRIEDMAN, 1992; PETTIETTE et al., 1997). Quando isso não for possível, esforços devem ser empreendidos no sentido de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal, conservando o dente avulsionado em um meio adequado até que o reimplante possa ser realizado (BLOMLÖF, 1981a).

Idealmente, o meio de conservação deve ser estéril e manter as condições de normalidade fisiológica das células, ou seja, apresentar 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 verificaram 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 isotônico que possa reconstituir os metabólitos celulares perdidos, como meio de Eagle (ANDREASEN et al., 1978) e solução de Hank (MATSSON et al., 1982).

Vários experimentos foram conduzidos na tentativa de encontrar o meio ideal (BLOMLÖF, 1981a; HILTZ; TROPE, 1991; TROPE; FRIEDMAN, 1992; SOUZA, 2007; OZAN et al., 2007; GOPIKRISHNA et al., 2008; GOPIKRISHMA; THOMAS; KANDASWAMY, 2008; MOREIRA-NETO et al., 2009), 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 estudados pode-se destacar água, saliva, soro fisiológico, soluções para lentes de contato, bebida energética, Meio de Eagle, Viaspan®, meio condicionado, leite, solução salina balanceada de Hank e mais recentemente, própolis, clara de ovo e água de coco.

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 (ANDREASEN, 1981; BLOMLÖF, 1981a,b; LINDSKOG; BLOMLÖF, 1982; COURTS; MUELLER; TABELING, 1983; OIKARINEM; SEPPÄ, 1987; HARKACZ; CARNES; WALTER, 1997; MARINO et al., 2000; PEARSON et al., 2003; SIGALAS et al., 2004; SOUZA, 2007). Lindskog e Blomlöf (1982) demonstraram que nenhuma célula do ligamento periodontal sobreviveu após o armazenamento em água por 3h. No estudo de Sigalas et al. (2004), o grupo de dentes conservados na água foi o que apresentou maior comprometimento de 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; SOUZA, 2007).

1.1.2 Saliva

Embora ligeiramente mais efetiva do que a água, também não é um meio adequado, pois além de hipotônica (BLOMLÖF, 1981a,b) é fonte de contaminação bacteriana para as células periodontais (BLOMLÖF, 1981a,b; LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTRÖM, 1983). Estudos demonstraram ausência de viabilidade celular após 3h de conservação na saliva (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF et al., 1980; BLOMLÖF, 1981a; LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTRÖM, 1983).

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

Possui osmolalidade e pH fisiológicos, mas não fornece íons essenciais e glicose às células. Logo, é considerado um meio de conservação aceitável de 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 (Opti Free[®] e K Mart[®]) se mostraram péssimos meios de conservação, provavelmente devido à presença de conservantes (HUANG; REMEIKIS; DANIEL, 1996). No entanto, Sigalas et al. (2004) revelaram que 3 tipos dessas soluções (Soft Wear[®], Opti Free[®] e Solo Care[®]), quando resfriadas (0°C), proporcionaram melhores resultados do que a água, Gatorade[®] e leite à temperatura ambiente, sendo recomendadas pelos autores como meios de conservação por um período de até 1h.

1.1.5 Bebida energética

Em função do baixo pH que apresenta, a bebida energética Gatorade[®] revelou resultados desanimadores quando comparada à água de torneira (HARKACZ; CARNES WALTER, 1997; OLSON et al., 1997). Já em pesquisa desenvolvida por Sigalas et al. (2004), esse energético, quando resfriado (0°C), 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

É um dos meios sintéticos mais utilizados para 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, 1981a). 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 replante (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 (HILTZ; TROPE, 1991; TROPE; FRIEDMAN, 1992; HUPP; TROPE; AUKHIL, 1996). Trope e Friedman (1992) não encontraram evidências histológicas de reabsorção por substituição ou inflamatória após o reimplante de dentes avulsionados armazenados por até 12h em Viaspan[®]. No estudo de Ashkenazi; Marouni; Sarnat (2000), o Viaspan[®] permitiu que mais de 90% das células se mantivessem viáveis após 8h de conservação. 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. À 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

Facilmente encontrado e de baixo custo, o leite tem sido um meio intensamente estudado (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; SOUZA, 2007) e é considerado um meio de conservação aceitável para dentes avulsionados (AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS, 2004). Com pouco conteúdo bacteriano (BLOMLÖF, 1981; LINDSKOG; BLOMLÖF; HAMMARSTROM, 1983), o leite possui osmolalidade (de 230 a 270 mOsm/Kg) e pH (de 6,5 a 6,8) relativamente fisiológicos, mantendo a viabilidade das células (BLOMLÖF et al., 1980; BLOMLÖF, 1981a;

LINDSKOG; BLOMLÖF, 1982), além de fornecer-lhes alguns nutrientes (BLOMLÖF, 1981a) e fatores de crescimento (BELFORD et al., 1995). Belford et al. (1995) demonstraram que a adição de extratos de leite bovino à cultura celular de fibroblastos e de células epiteliais promoveu maior proliferação. Entretanto, conforme lembra Blomlöf (1981a), o leite sofre redução do pH com o tempo, o que pode torná-lo 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 aquele 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). A redução da temperatura promove diminuição do metabolismo celular (BARILE 1994) e do crescimento bacteriano (ASHKENAZI; SARNAT; KEILA, 1999).

Em relação ao tempo pelo qual o leite mantém a viabilidade celular, os resultados existentes são controversos. Diversos trabalhos demonstraram que ele é efetivo por até 3h (BLOMLÖF; OTTESKOG, 1980; BLOMLÖF et al., 1980; LINDSKOG; BLOMLÖF, 1982; BLOMLÖF et al., 1983; COURTS; MUELLER; TABELING, 1983; HUANG; REMEIKIS; DANIEL, 1996). No estudo de Blomlöf et al. (1980), foi verificado que o percentual de células viáveis de dentes armazenados em leite por períodos de 1 a 3h foi semelhante ao do grupo-controle positivo (dentes recém-extraídos). 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 de fibroblastos do ligamento periodontal. 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®, mantendo alta a capacidade clonogênica celular. Já Souza (2007) observou que quando células do ligamento periodontal foram expostas a diferentes meios de conservação e

mantidas a 20 ou a 37°C, o leite foi o melhor meio de conservação por até 48h e 24h, respectivamente. Considerando que o declínio do desempenho do leite ao longo do tempo possa ter ocorrido em virtude da alteração de seu pH (Blomlöf 1981), Souza et al. (2009) procuraram verificar se a renovação do leite, a cada 24h, era capaz de prolongar a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH. Os autores concluíram que a renovação do leite piorou a sua efetividade. Segundo eles, provavelmente, isso ocorreu em virtude da agressão sofrida pelas células durante o ato de aspiração e recolocação do leite. Para elucidar essa questão, eles sugeriram a realização de uma nova pesquisa, na qual a renovação do leite seja realizada em diferentes intervalos de tempo.

Pesquisas com diferentes metodologias foram realizadas para verificar o efeito da pré-imersão em leite de dentes que permaneceram estocados em ambiente seco por vários períodos (GAMSON; DUMSHA; SYDISKIS, 1992; PATIL; DUMSHA; SYDISKIS 1994; DOYLE; DUMSHA; SYDISKIS, 1998; MARTIN; PILEGGI, 2004; GOPIKRISHNA et al., 2008; GOPIKRISHMA; THOMAS; KANDASWAMY, 2008). 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. Gamson; Dumsha; Sydiskis (1992) observaram que o leite foi um meio adequado até mesmo quando os dentes ficaram secos por 20min. Porém, quando o período de secagem foi superior a 30 min, não houve vantagens na 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 aos dos mantidos na solução teste (própolis) e aos dos dentes do grupo-controle (dentes recém-extraídos). Com metodologia semelhante, Gopikrishna et al. (2008) demonstraram que o leite apresentou desempenho inferior a HBSS, ao própolis e a água de coco na rehidratação de células do ligamento periodontal mantidas por 30 min em ambiente seco.

Quando dentes avulsionados foram mantidos em saliva por 15 min, a pré-imersão em leite frio por 30 e 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, sua principal desvantagem é não reconstituir os metabólitos celulares perdidos (BLOMLÖF et al., 1983; KRASNER; PERSON, 1992), ou seja, ele retarda a morte celular, mas não restaura a morfologia normal das células, nem tampouco sua habilidade de diferenciação e mitose.

Segundo, Krasner (1992, 1994) quando um dente é mantido em um meio que permite a reconstrução celular, seu ligamento periodontal permanecerá fisiologicamente saudável.

1.1.10 Solução salina balanceada de Hank (HBSS)

A HBSS é recomendada para a conservação de dentes permanentes avulsionados (AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS, 2004). 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 morfolologicamente 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 por diferentes períodos de tempo. 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 e o leite, ambos a 4°C, apresentaram os melhores resultados com relação à viabilidade celular e à capacidade clonogênica e mitogênica quando comparada 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). Mantendo placas de cultura a 20 e a 37°C, Souza (2007) demonstrou que a efetividade da HBSS recém-manipulada foi significativamente inferior a do leite até 48 e 24h de conservação, respectivamente.

Embora Matsson et al. (1982) e Hiltz e Trope (1991) tenham observado que a HBSS pode reconstituir os metabólitos 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 número de células viáveis equivalente ao de dentes imersos em leite e em soro fisiológico, e estatisticamente inferior ao dos que ficaram na solução teste (própolis) e no grupo-controle (dentes recém-extraídos). Empregando metodologia

semelhante, Gopikrishna et al. (2008) não verificaram diferença estatística entre os resultados obtidos com a HBSS e o própolis, os quais foram superiores aos do leite.

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 não se encontra facilmente disponível no mercado brasileiro. No comércio americano é comercializada 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. Outras pesquisas desenvolvidas com esse produto revelaram resultados similares (MARINO et al. 2000; SOUZA, 2007). Marino et al. (2000) demonstraram que, no período de 8h, leite integral pasteurizado e leite longa vida conservaram maior número de células do que o Save-A-Tooth[®]. Empregando metodologia semelhante, Souza (2007) verificou que, a partir de 24h de contato, os resultados do Save-A-Tooth[®], utilizado aproximadamente 6 meses após a aquisição, foram estatisticamente inferiores aos da HBSS recém-manipulada e iguais aos da água de torneira. Nesse estudo, a HBSS foi obtida usando os mesmos componentes apresentados pelo fabricante do Save-A-Tooth[®], em concentrações iguais às mencionadas por Krasner e Person (1992). Considerando que o Save-A-Tooth[®] e a HBSS possuíam os mesmos componentes, o baixo desempenho apresentado pelo Save-A-Tooth[®], em relação à HBSS recém-manipulada, pode ter sido devido ao seu tempo de armazenagem (6 meses) ou por diferenças nas concentrações desses componentes, as quais não são reveladas pelo fabricante do Save-A-Tooth[®].

1.1.11 Própolis

É uma substância resinosa com propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e antifúngica, razão pela qual tem sido utilizado na medicina (KOO et al., 2000). Composto basicamente de resinas vegetais, cera de abelha, óleos essenciais e pólen, sua constituição pode variar em virtude do clima, da estação e da região de sua origem (CHENG; WONG, 1996). Martin e Pileggi (2004) e Ozan et al. (2007) demonstraram superioridade do própolis em relação a HBSS e ao leite na conservação de células do ligamento periodontal. No entanto,

Gopikrishna et al. (2008) revelaram que o própolis e a HBSS apresentaram o mesmo desempenho quando usados na rehidratação de dentes humanos expostos ao ambiente seco por 30 min.

1.1.12 Clara de ovo

A clara, parte transparente que circunda a gema da célula ovo, é formada basicamente por albumina e água. Possui um pH de 8,6 e osmolalidade de 258 mOsm (KHADEMI et al., 2008). Khademi et al. (2008) revelaram que a clara de ovo obteve desempenho similar a HBSS e superior ao leite após 12h de conservação de fibroblastos do ligamento periodontal humano.

1.1.13 Água de coco

A água de coco é um isotônico natural estéril existente na cavidade da semente do coco, rica em nutrientes. Corresponde a aproximadamente 25% do fruto, e sua composição básica apresenta 93% de água, 5% de açúcares, que lhe conferem alta osmolalidade, além de proteínas, vitaminas e sais minerais como potássio, cálcio e magnésio (NADANASABAPATHY; KUMAR, 1999). Gopikrishna et al. (2008) e Gopikrishna; Thomas; Kandaswamy (2008) demonstraram que a água de coco *in natura* foi estatisticamente superior a HBSS e ao leite na rehidratação de células do ligamento periodontal de dentes humanos expostos por 30 min em ambiente seco. No entanto, Moreirane et al. (2009) relataram que a água de coco foi inferior ao leite na manutenção da viabilidade de fibroblastos humanos.

Com base na revisão de literatura realizada, pode-se afirmar que ainda não há informações na literatura referentes ao efeito da renovação do leite e do tempo de estocagem da HBSS sobre a manutenção da viabilidade de FLPH. Além disso, ainda não existe um trabalho que tenha comparado, simultaneamente, a efetividade dos meios naturais citados (própolis, clara de ovo e água de coco) com a de diferentes meios já consagrados (leite e HBSS). Também não há estudos que tenham avaliado, simultaneamente, a capacidade de proliferação das células após a exposição a esses meios de conservação. Diante disso, os objetivos deste estudo foram: 1) verificar se a renovação do leite, em intervalos regulares de 12, 24 ou 48h, é capaz de prolongar sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH; 2) verificar se o tempo de estocagem da HBSS exerce influência sobre a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH; 3) comparar o efeito de diferentes meios de conservação (leite

desnatado, leite integral, HBSS, Save-A-Tooth[®], água de coco *in natura*, própolis e clara de ovo) sobre a viabilidade de FLPH; e 4) comparar o efeito de diferentes meios de conservação (leite desnatado, leite integral, HBSS, Save-A-Tooth[®], água de coco *in natura*, própolis e clara de ovo) sobre a viabilidade e a capacidade proliferativa de FLPH.

Para alcançá-los foram desenvolvidas 4 pesquisas no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina. O laboratório possui 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.

1.2 METODOLOGIA COMUM AOS DIFERENTES EXPERIMENTOS

Os procedimentos para cultivo primário e estabelecimento da linhagem celular foram realizados conforme técnica descrita por Sant'Ana et al. (2002) e modificada por Souza (2007). 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 Obtenção das culturas primárias de fibroblastos periodontais humanos

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 Solução Tampão fosfato (PBS) estéril e 2% de penicilina G sódica (10.000 UI), de estreptomicina (10mg) e de anfotericina B (25µg) (PSA) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) 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). 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 Meio Essencial Mínimo (MEM) (Cultilab, Brasil), 10% de Soro Fetal Bovino (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.

1.2.2 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.

1.2.3 Experimento

Duas semanas antes do início dos experimentos, fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLPH), previamente congelados, foram rapidamente descongelados em banho-maria a 37°C e colocados em garrafas de cultura de 75 cm² com MEM contendo 10% SFB e 1% de PSA. As garrafas foram, então, incubadas a 37°C em estufa de CO₂ (Fanem, HF 212, São Paulo, SP, Brasil). As células foram subcultivadas a cada 5 dias até a obtenção do número

adequado para a realização dos experimentos. Foram utilizadas células da quinta à décima passagem. Para a preparação das placas de cultura, as células foram tripsinizadas (Trypsina, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) e, em seguida, colocadas em um tubo de centrífuga com o mínimo de volume do meio de cultura. A suspensão foi adequadamente homogeneizada e uma alíquota de 10 µl foi colocada na câmara de Neubauer para contagem das células no microscópio ótico invertido (Diaphot, Nikon, Tokyo, Japão). Após os cálculos, a suspensão celular, contendo o número ideal de células por cavidade, foi distribuída em placas de cultura de 96 cavidades. Nas pesquisas referentes aos artigos 1, 2 e 3 foram utilizadas 8×10^3 células/cavidade e na pesquisa referente ao artigo 4 foram utilizadas 4×10^3 células/cavidade.

Quando conveniente, o pH de cada um dos meios de conservação foi verificado por meio de pHmetro digital (Digimed-modelo: DM20, Canadá) calibrado com soluções de pH 7,0 e 4,0.

Em todas as pesquisas, cada um dos meios foi testado em 11 cavidades de cada placa de cultura. O controle-positivo foi constituído por células conservadas em MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA, e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. O controle-negativo foi constituído por células conservadas em água de torneira a 5 e/ou 20°C. Para a avaliação da viabilidade celular, foi empregado o Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazólio (MTT) conforme proposto por Mossmann (1983), modificado por Sieuwerts et al. (1995) e adaptado por Andrighetti- Fröhner et al. (2003). 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 a 540 nm.

Para a realização do teste de viabilidade, depois de cada período experimental, os meios de conservação foram substituídos por solução tampão fosfato (PBS), para lavagem do tapete celular e, posteriormente, por 50 µL de solução de MTT (Sigma Chemical) + MEM (1mg/mL em MEM). Após 4h de incubação a 37°C, o MTT + MEM foi retirado e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em todas as cavidades. 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 (Labsystems Multiskan MS 352, Haverhill, MA, USA).

Os experimentos foram repetidos 3 vezes em dias independentes. Ao final, os valores de absorvância obtidos foram devidamente anotados e agrupados para análise estatística pelos testes de Kruskal-Wallis, Scheffé e Mann-Whitney. O nível de significância foi de 5%.

2 ARTIGOS

2.1 ARTIGO 1: Efeito da renovação do leite sobre a manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano

Beatriz Dulcineia Mendes Souza¹, Wilson Tadeu Felipe¹, Cláudia Maria Oliveira Simões²,
Mara Cristina Santos Felipe¹

¹ Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

² Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar se a renovação do leite, a cada 12, 24 ou 48h, é capaz de prolongar a sua capacidade de manter a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLPH). FLPH foram conservados por 24, 48, 72, 96 e 120h, a 5 e a 20°C, em leite desnatado não renovado e em leite renovado (12 - 48h). Células conservadas em Meio Essencial Mínimo (MEM) a 37°C e em água de torneira, a 5 e a 20°C, serviram como controle-positivo e negativo, respectivamente. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT. Os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis, Scheffé e Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). Os resultados mostraram que a 5°C, apenas o leite renovado a cada 48h foi significativamente melhor do que o leite não renovado. A 20°C, o leite não renovado foi mais eficaz do que o leite renovado a cada 12 e 24h, em todos os períodos de tempo. Em relação ao efeito da temperatura, a renovação do leite mantido a 5°C foi mais efetiva na conservação de FLPH do que a realizada no leite mantido a 20°C. Foi concluído que a renovação do leite foi capaz de prolongar a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH somente quando realizada, a cada 48h, no leite mantido a 5°C.

Palavras chaves

Avulsão dentária, fibroblastos do ligamento periodontal, meios de conservação.

Introdução

Quando um dente sofre avulsão, a conduta recomendada é reimplantá-lo o mais rapidamente possível para evitar a ocorrência de reabsorções (Blomlöf et al. 1983, Trope & Friedman 1992). Se o reimplante não for 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 1981).

O leite tem sido amplamente estudado (Blomlöf & Otteskog 1980, Blomlöf 1981, Lindskog et al. 1983, Huang et al. 1996; Harkacz et al. 1997; Marino et al. 2000, Sigalas et al. 2004, Souza 2007) e é aceito como um adequado meio de conservação para dentes avulsionados (American Association of Endodontists 2004). Possui baixo conteúdo bacteriano (Blomlöf 1981, Lindskog et al. 1983), apresenta osmolalidade fisiológica (230-270 mOsm/Kg), pH neutro (6,5-6,8), e fornece nutrientes (Blomlöf 1981) e alguns fatores de crescimento (Belford et al. 1995) essenciais para o metabolismo celular. Estudos em cultura de células demonstraram que sua efetividade varia de 3 a 48h (Blomlöf & Otteskog 1980,

Lindskog et al. 1983, Huang et al. 1996, Ashkenazi et al. 1999, Souza 2007) e que o leite resfriado é mais efetivo do que o leite à temperatura ambiente (Blomlöf & Otteskog 1980, Blomlöf 1981, Ashkenazi et al. 1999, Sigalas et al. 2004). Testando diferentes meios de conservação, Souza (2007) verificou que o leite, a 37 e a 20°C, foi significativamente melhor do que os outros produtos (HBSS estéril, HBSS não estéril e Save-A-Tooth[®]) por até 24 e 48h, respectivamente. Considerando que o declínio do desempenho do leite ao longo do tempo possa ter ocorrido em virtude da alteração de seu pH (Blomlöf 1981), Souza et al. (2009) procuraram verificar se a renovação do leite, a cada 24h, era capaz de prolongar a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH. Os autores concluíram que a renovação do leite piorou a sua efetividade. Segundo eles, provavelmente, isso ocorreu em virtude da agressão sofrida pelas células durante o ato de aspiração e recolocação do leite. Para elucidar essa questão, eles sugeriram a realização de uma nova pesquisa, na qual a renovação do leite seja realizada em diferentes intervalos de tempo.

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se a renovação do leite, em intervalos regulares de 12, 24 e 48h, é capaz de prolongar a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH. Paralelamente, foi avaliado o efeito da temperatura (5 e 20°C) sobre a efetividade do leite.

Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Protocolo 074/08). Os procedimentos de cultura primária e estabelecimento da linhagem celular foram realizados de acordo com técnica descrita por Sant'Ana et al. (2002) e modificada por Souza (2007).

Duas semanas antes de iniciar os experimentos, FLPH foram rapidamente descongelados em banho maria a 37°C e colocados em garrafas de cultura com Meio Essencial Mínimo (MEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brazil) e 1% de penicilina sódica (10.000 UI), de estreptomicina (10mg) e de anfotericina B (25µg) (PSA) (Cultilab, Brazil). As garrafas foram, então, incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂ em atmosfera umedecida (Fanem, HF 212, São Paulo, SP, Brasil). As células foram subcultivadas a cada 5 dias até a obtenção do número suficiente para a realização dos experimentos. Foram utilizadas células da quinta a décima passagem.

Suspensão celular contendo 8×10^3 células foram distribuídas nas placas de cultura. Após 24h de incubação, o MEM foi aspirado das cavidades das placas de cultura e as células

foram expostas, a 5 e a 20°C, a 100 µL de: leite desnatado longa vida (UHT, Parmalat, São Paulo, SP, Brazil) (pH 6,8); leite desnatado, renovado a cada 12h; leite desnatado, renovado a cada 24h; leite desnatado renovado a cada 48h, e água de torneira (controle-negativo) (pH 7,6). Células conservadas a 37°C em MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA, serviram como controle-positivo para verificação do crescimento celular. Cada um dos meios foi testado em 11 cavidades de cada placa de cultura e o experimento foi repetido 3 vezes em dias independentes.

Para a avaliação da viabilidade celular, foi empregado o Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazólio (MTT). Para isso, após 24, 48, 72, 96 e 120h, os meios de conservação foram substituídos por 100 µL de solução tampão fosfato (PBS) para lavagem do tapete celular e, posteriormente, por 50 µL de solução de MTT (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) + MEM (1mg/mL em MEM). As placas foram incubadas a 37°C e, depois de 4h, o MTT + MEM foi retirado e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado. As placas foram, então, agitadas levemente de 2 a 5 min para solubilizar a formazana. A leitura dos valores de absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan MS 352, Haverhill, MA, USA) a 540 nm.

A análise estatística dos dados registrados foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Scheffé. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os resultados a 5 e a 20°C. O nível de significância foi de 5%.

Resultados

As médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade das células mantidas nos diferentes meios e períodos de conservação encontram-se expressas nas Figuras 1 (5°C) e 2 (20°C). O teste de Kruskal-Wallis revelou que, para ambas as temperaturas, houve diferença significativa em função dos tempos e dos meios analisados. Tanto a 5 como a 20°C, os resultados indicaram que o MEM foi mais efetivo em manter a viabilidade celular do que os outros meios ($p < 0,001$), os quais se mostraram significativamente melhores do que a água de torneira, em qualquer período de tempo. Quando o leite foi mantido a 5°C, a renovação só foi benéfica quando realizada de 48/48h ($p < 0,001$). Quando realizada de 12/12h ou de 24/24h, houve diminuição do número de células viáveis. Quando a 20°C, o leite não renovado foi mais eficaz em manter a viabilidade celular do que o leite renovado a cada 12 ou 24h ($p < 0,05$). O leite renovado a cada 48h e o leite não renovado apresentaram desempenho similar em 96 e 120h ($p > 0,05$).

Em relação ao efeito da temperatura, o teste de Mann-Whitney revelou que a renovação foi menos prejudicial quando realizada no leite mantido a 5°C ($p < 0,05$).

Discussão

Estudos em cultura de células têm demonstrado que a efetividade do leite diminui com o passar do tempo (Souza 2007), provavelmente porque ocorre declínio de seu pH (Blomlöf 1981). Em estudo recente, Souza et al. (2009) demonstraram que a renovação do leite, a cada 24h, não foi capaz de manter a viabilidade celular. Segundo os autores, provavelmente, a agressão sofrida pelas células durante o ato de aspiração e recolocação do leite, interferiu negativamente sobre o tapete celular. Neste estudo, a renovação do leite foi realizada a cada 12, 24 ou 48h, a fim de melhor avaliar esta questão.

Foi observado que as renovações realizadas a cada 12 ou 24h, tanto do leite mantido a 5°C como do mantido a 20°C, diminuíram a sua capacidade de conservar a viabilidade celular. A renovação realizada a cada 12h foi mais deletéria às células do que a realizada a cada 24h, o que confirma que o ato de aspirar e recolocar o leite prejudica a organização do tapete celular, por destacar células das cavidades, conforme mencionado por Souza et al. (2009). Em uma situação clínica de avulsão dental, é provável que a renovação seja menos prejudicial, uma vez que ela não exigiria a aspiração do produto.

A renovação a cada 48h, do leite mantido a 20°C, também não aumentou a sua efetividade. Porém, a 5°C, o leite renovado a cada 48h foi significativamente melhor do que o leite não renovado.

Geralmente, dentes avulsionados são conservados em um meio à temperatura ambiente. No entanto, a baixa temperatura diminui o metabolismo celular (Barile 1994), limita o crescimento bacteriano e retarda a queda do pH do leite (Ashkenazi et al. 1999). Em estudos prévios foi verificado que a conservação de FLPH em leite refrigerado é mais benéfica (Blomlöf 1981, Ashkenazi et al. 1999, Sigalas et al. 2004). Este estudo foi realizado a 5 e a 20°C para permitir comparações. Os resultados demonstraram que o leite não renovado foi efetivo na conservação de fibroblastos periodontais e não sofreu influência da temperatura por até 48h, corroborando os achados de Souza (2007). A partir de 72h, o leite não renovado mantido a 5°C apresentou desempenho superior ao do mantido a 20°C. Porém, vale ressaltar que a partir deste período (72h), o desempenho do leite não renovado a 5°C foi muito inferior ao do MEM. Interessantemente, a partir de 48h, a renovação do leite mantido a 5°C foi menos prejudicial às células. Provavelmente, a menor temperatura propiciou maior estabilidade ao

tapete celular, evitando que as células se destacassem com facilidade, o que parece ter ocorrido quando a renovação foi feita no leite mantido a 20°C.

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, foi concluído que a renovação do leite foi capaz de prolongar a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH somente quando realizada, a cada 48h, no leite mantido a 5°C.

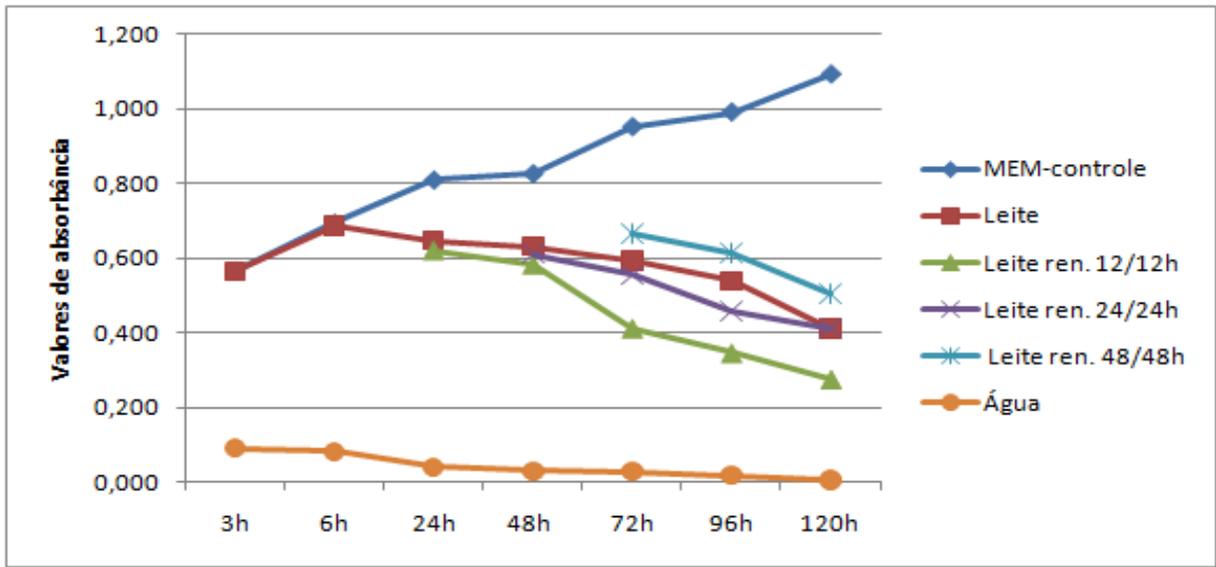


Fig. 1 Média dos valores de absorbância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 5°C nos diferentes meios e períodos de tempo.

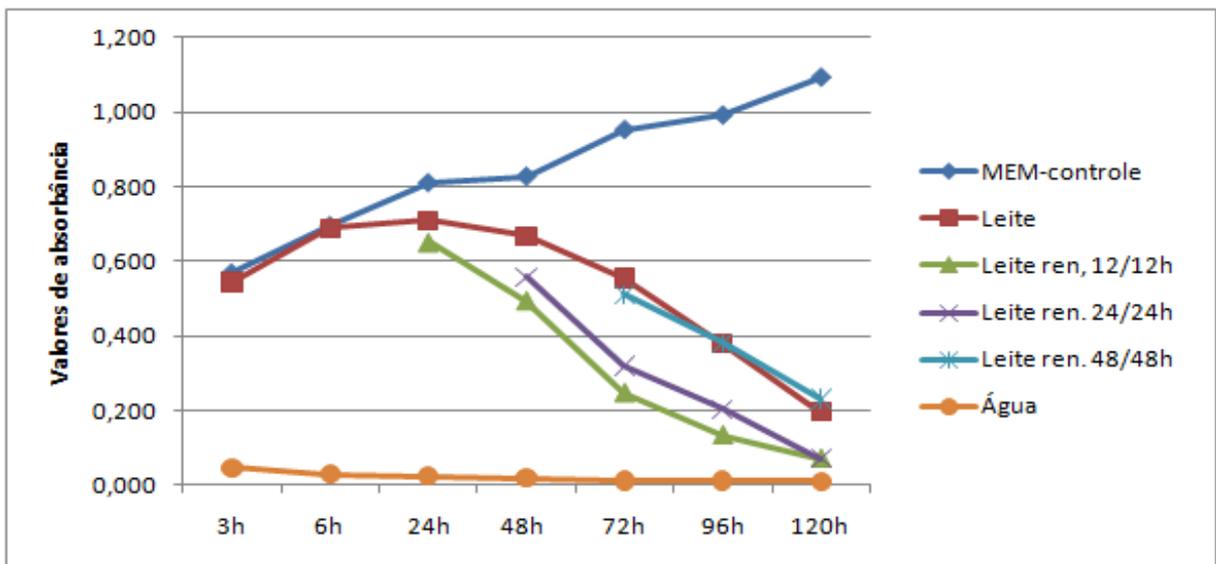


Fig. 2 Média dos valores de absorbância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 20°C nos diferentes meios e períodos de tempo.

Referências

1. Blomlöf L, Lindskog S, Anderson L, Hedström K-G, Hammarström L. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. *J Dent Res* 1983; **62**: 912-6.
2. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hanks'balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol* 1992; **8**: 183-8.
3. Blomlöf L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed Dent J* 1981; **8**: 1-26.
4. Blomlöf L, Otteskog P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1980; **88**: 436-40.
5. Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L. Mitosis and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1983; **91**: 465-72.
6. Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC. Effects of long- term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endod* 1996; **22**: 30-3.
7. Harkacz OM, Carnes DL, Walter WA. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* 1997; **23**: 687-90.
8. Marino TG, West LA, Liewehr FR, Mailhot JM, Buxton TB, Runner RR, et al. Determination of Periodontal Ligament Cell Viability in Long Shelf- Life Milk. *J Endod* 2000; **26**: 699-702.
9. Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE, Opperman LA. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2004; **20**: 21-8.
10. SOUZA, Beatriz Dulcineia Mendes. **Comparação *in vitro* da efetividade de vários meios de conservação na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento**

periodontal humano. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

11. American Association of Endodontists. Recommended Guidelines for the treatment of avulsed permanent tooth. Chicago, IL: American Association of Endodontists, 2004.

12. Belford DA, Rogers ML, Register GO, Francis GL, Smithers GW, Liepe IJ, et al. Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. *In vitro Cell Dev Biol Animal* 1995; 31: 752-60.

13. 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* 1999; 15: 149-56.

14. Souza BDM, Felipe WT, Simões CMO, Felipe MCS. Effect of temperature and milk replacement on human periodontal ligament fibroblast viability. 2009 No prelo.

15. Sant'ana ACP, Marques MM, Barroso EC, Passanezi E. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. *Rev Fac Odontol Bauru* 2002; 10: 134-40.

16. Barile F. A. Introduction to *in vitro* cytotoxicology: mechanisms and methods. Boca Raton: CRC Press 1994; 12-4.

2.2 ARTIGO 2: Efeito do tempo de estocagem da HBSS sobre a manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano

Beatriz Dulcineia Mendes Souza¹, Wilson Tadeu Felipe¹, Cláudia Maria Oliveira Simões²,
Mara Cristina Santos Felipe¹

¹ Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

² Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Resumo

A solução salina balanceada de Hank (HBSS) é recomendada para a conservação de dentes avulsionados. O propósito deste estudo foi verificar se o tempo de estocagem da HBSS influencia sua capacidade de manter a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLPH). FLPH foram conservados, a 20°C por 3, 6, 24, 48, 72, 96 e 120h em HBSS recém-manipulada (HBSS), HBSS estocada por 6 meses (HBSS 6M), HBSS estocada por 12 meses (HBSS 12M) e Save-A-Tooth®. Células conservadas em Meio Essencial Mínimo (MEM) a 37°C e em água de torneira a 20°C serviram como controle-positivo e negativo, respectivamente. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT. Os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Scheffé ($\alpha=5\%$). Os resultados mostraram que, a partir de 6h, a HBSS recém-manipulada foi significativamente mais efetiva em manter a viabilidade celular do que a HBSS 6M, HBSS 12M e Save-A-Tooth®. Foi concluído que o tempo de estocagem da HBSS exerceu influência negativa sobre a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH.

Palavras-chaves: Avulsão dentária, fibroblastos do ligamento periodontal.

Introdução

Vários experimentos foram conduzidos na tentativa de encontrar o meio de conservação ideal para dentes avulsionados (Blomlöf 1981, Hiltz & Trope 1991, Trope & Friedman 1992, Souza 2007). A HBSS tem sido recomendada para este propósito (American Association of Endodontists 2004). Composta de nutrientes essenciais, essa solução 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). Em um estudo conduzido por Huang et al. (1996), a HBSS provou ser melhor do que o leite, conservando 46,8% de células viáveis, após 72h de contato. Diferentes pesquisas demonstraram que a HBSS tem gerado melhores resultados em relação à manutenção da viabilidade celular (Ashkenazi et al. 1999, Ashkenazi et al. 2000, Sigalas et al. 2004) e à capacidade clonogênica e mitogênica, quando comparada ao meio condicionado e ao Viaspan® (Ashkenazi et al. 1999) e ao Meio Essencial Mínimo (α MEM) (Ashkenazi et al. 2000).

A HBSS pode ser manipulada segundo a fórmula descrita por Krasner & Person (1992). Para a conservação de dentes avulsionados, está disponível no comércio internacional com o nome de Save-A-Tooth® (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA). Em algumas pesquisas realizadas em cultura de células foi demonstrado que a efetividade do Save-A-

Tooth[®] foi inferior a do leite (Olson et al. 1997, Marino et al. 2000, Souza 2007, Souza et al. 2009), inferior a da HBSS recém-manipulada (Souza 2007, Souza et al. 2009), e similar a da água de torneira depois de 24h de conservação (Souza 2007, Souza et al. 2009). No estudo desenvolvido por Souza (2007), a HBSS foi manipulada usando os mesmos componentes exibidos no rótulo do Save-A-Tooth[®], porém em concentrações iguais às mencionadas por Krasner & Person (1992), já que os fabricantes não especificam as concentrações que utilizam para a obtenção do Save-A-Tooth[®]. É sabido que o tempo de armazenamento de um produto pode afetar a sua efetividade. No estudo de Souza (2007), o Save-A-Tooth[®] foi utilizado aproximadamente 6 meses após a sua aquisição. Conforme o autor, é possível que a estocagem do produto tenha influenciado negativamente a sua efetividade, já que a HBSS utilizada logo após a sua manipulação apresentou melhor desempenho. Com o intuito de esclarecer esta questão, o objetivo deste estudo foi avaliar se o tempo de estocagem da HBSS influencia sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH.

Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Protocolo 108/08). Os procedimentos de cultura primária e estabelecimento da linhagem celular foram realizados de acordo com a técnica descrita por Sant'Ana et al. (2002) e modificada por Souza (2007).

Duas semanas antes de iniciar os experimentos, FLPH foram rapidamente descongelados em banho-maria a 37°C e colocados em garrafas de cultura com MEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) e 1% de penicilina sódica (10.000 UI), de estreptomicina (10mg) e de anfotericina B (25µg) (PSA) (Cultilab, Brasil). As garrafas foram, então, incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂ em atmosfera umedecida (Fanem, HF 212, São Paulo, SP, Brasil). As células foram subcultivadas a cada 5 dias até a obtenção do número adequado para a realização dos experimentos. Foram utilizadas células da quinta a décima passagem.

As células (8×10^3 células por cavidade) foram semeadas em 7 placas com 96 cavidades (TPP, Trasadingen, Switzerland) e incubadas a 37°C com 5% CO₂. Após semiconfluência, o MEM foi aspirado e as cavidades foram preenchidas com 100 µL das seguintes soluções: HBSS (pH 7,2); HBSS 6M (pH 7,0); HBSS 12M (pH 7,0) e Save-A-Tooth[®] (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA) (pH 7,0). Células conservadas a 37°C em MEM, suplementado com 10% SFB e 1% PSA, e células conservadas em água de torneira a 20°C serviram como controle-positivo e negativo, respectivamente. Cada um dos meios foi

testado em 11 cavidades de cada placa de cultura e o experimento foi repetido 3 vezes em dias independentes.

A HBSS foi preparada de acordo com a fórmula apresentada pelo fabricante do Save-A-Tooth[®] (Phoenix-Lazerus, EUA). As concentrações de cada componente foram baseadas na fórmula apresentada por Krasner & Person (1992): 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).

O Save-A-Tooth[®] empregado nesta pesquisa foi armazenado à temperatura ambiente e utilizado aproximadamente 1 mês após a sua aquisição (lote 8231, data de fabricação não revelada, validade janeiro/2012).

As 7 placas foram mantidas a 20°C por 3, 6, 24, 48, 72, 96 e 120h. A viabilidade celular foi avaliada por meio do Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazólio (MTT). Para isso, após cada período experimental, os meios de conservação foram substituídos por 100 µL de solução tampão fosfato (PBS) para lavagem do tapete celular e, posteriormente, por 50 µL de solução de MTT (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) + MEM (1mg/mL em MEM). As placas foram incubadas a 37°C e, depois de 4h, o MTT + MEM foi retirado e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados. As placas foram, então, agitadas levemente de 2 a 5 min para solubilizar a formazana. A leitura dos valores de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan MS 352, Haverhill, MA, USA) a 540 nm.

A análise estatística dos dados registrados foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Scheffé, em um nível de significância foi de 5%.

Resultados

As médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade das células mantidas nos diferentes meios e períodos, encontram-se expressas na Figura 1. O teste de Kruskal-Wallis revelou que houve diferença significativa em função dos períodos e dos meios analisados.

Em qualquer período de tempo, o meio menos efetivo foi a água de torneira. No período de 3h, não houve diferença entre as soluções experimentais e o MEM ($p > 0,05$). A partir de 6h, o MEM, seguido da HBSS, apresentou maior capacidade de manter a viabilidade celular do que os outros meios ($p < 0,001$). A efetividade da HBSS 6M foi similar a da HBSS 12M até 48h ($p > 0,05$), tornando-se superior após 72h ($p < 0,001$). A partir de 24h, o Save-A-Tooth[®] apresentou efetividade similar a da água de torneira ($p > 0,05$).

Discussão

A HBSS é um meio de cultura muito utilizado em pesquisas biomédicas envolvendo diferentes tipos de células (Krasner & Person 1992). Vários estudos demonstraram que esta solução é um meio efetivo para a conservação de dentes avulsionados (Blomlöf 1981, Hiltz & Trope 1991, Sigalas et al. 2004), pois tem a capacidade de preservar e de reconstituir as células do ligamento periodontal de dentes mantidos fora do alvéolo por longo período de tempo (Krasner & Person 1992). Segundo Krasner (1992), a HBSS não necessita de refrigeração e tem validade de 2 anos. A sua grande desvantagem é não estar disponível em locais onde a avulsão comumente ocorre. No entanto, com a comercialização da HBSS no início da década de 90 (Save-A-Tooth[®]), ficou mais fácil a aquisição do produto. Algumas investigações com cultura de células demonstraram resultados desanimadores com a utilização do Save-A-Tooth[®] (Olson et al. 1997, Marino et al. 2000, Souza 2007). Após 8h de contato, esse produto foi menos efetivo do que o leite integral pasteurizado (Olson et al. 1997, Marino et al. 2000), menos efetivo do que o leite longa vida (Marino et al. 2000) e similar ao Gatorade[®] (Olson et al. 1997). Souza (2007) verificou que, a partir de 24h de contato, os resultados do Save-A-Tooth[®] foram muito inferiores aos da HBSS recém-manipulada e similares aos da água de torneira. Considerando que o Save-A-Tooth[®] e a HBSS possuíam os mesmos componentes, o autor sugeriu que o pobre desempenho do Save-A-Tooth[®] pode ter sido provocado pelo tempo em que ficou estocado (6 meses) ou porque as concentrações de seus componentes são bastantes distintas das utilizadas para a manipulação da HBSS. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar se o tempo de estocagem da HBSS influencia sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH.

Os resultados revelaram que, a partir de 6h, a HBSS mostrou efetividade significativamente superior a HBSS 6M e a HBSS 12M, as quais apresentaram desempenhos similares por até 48h. A partir de 72h, a efetividade da HBSS 12M declinou consideravelmente. Estes achados sugerem que os períodos de 6 e 12 meses de estocagem da HBSS causam alteração de seus componentes, tornando-os insuficientes para a nutrição das células por períodos superiores a 6h. Em virtude das limitações dos estudos em cultura de células, estudos clínicos devem ser conduzidos para confirmar estes resultados.

Em relação ao Save-A-Tooth[®], os resultados deste estudo confirmam os de estudos prévios (Olson et al. 1997, Marino et al. 2000, Souza 2007). Embora tenha apresentado efetividade no período de 3h, a partir de 6h o seu desempenho foi declinando tornando-se similar ao da água de torneira após 24h de contato. Importante salientar que, embora o Save-A-Tooth[®] tenha ficado estocado, à temperatura ambiente, por apenas 1 mês antes de ser

utilizado, sua efetividade foi significativamente inferior a da HBSS estocada por 6 e 12 meses. Isto sugere, a exemplo de Souza (2007), que existem diferenças nas concentrações dos produtos utilizados para a obtenção do Save-A-Tooth[®] e da HBSS empregada neste estudo. De acordo com os resultados obtidos, foi concluído que o tempo de estocagem da HBSS exerceu influência negativa sobre a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH.

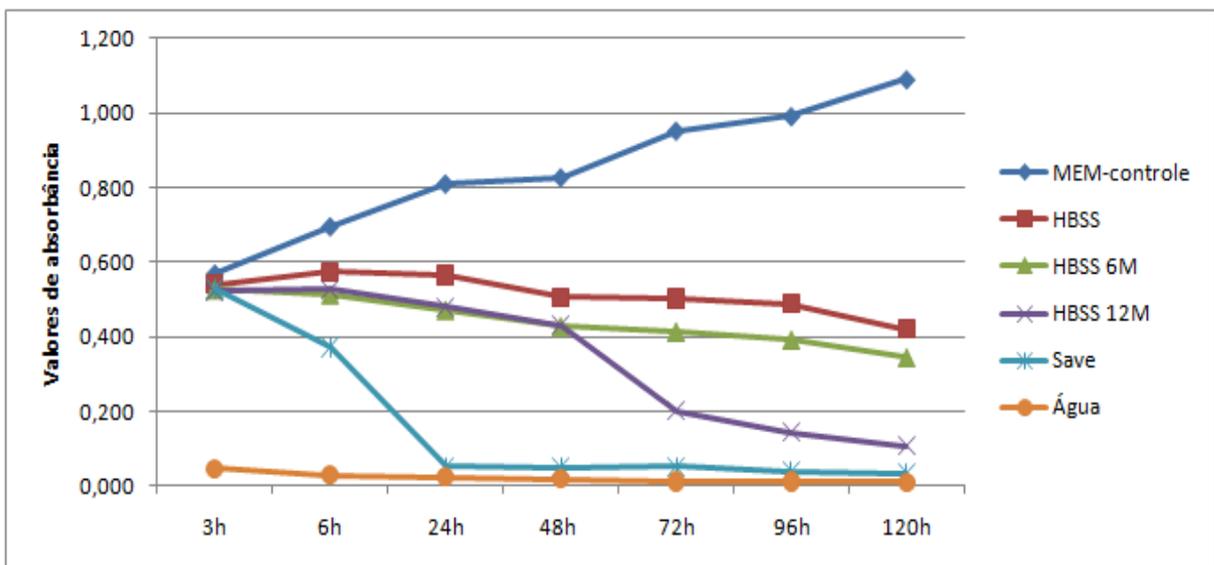


Fig. 1 Média dos valores de absorvância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 20°C nos diferentes meios e períodos de tempo.

Referências

1. Blomlöf L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed Dent J* 1981; 8: 1-26.
2. Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod Dent Traumatol* 1991; 7: 69-72.
3. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hanks' balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8: 183-8.
4. SOUZA, Beatriz Dulcineia Mendes. **Comparação *in vitro* da efetividade de vários meios de conservação na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.** 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
5. American Association of Endodontists. Recommended Guidelines for the treatment of avulsed permanent tooth. Chicago, IL: American Association of Endodontists, 2004.
6. Krasner P, Person P. Preserving avulsed teeth for replantation. *J Am Dent Assoc* 1992; 23: 80-8.
7. Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC. Effects of long- term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endod* 1996; 22: 30-3.
8. 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* 1999; 15: 149-56.
9. 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* 2000; 16: 63-70.

10. Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE, Opperman LA. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2004; 20: 21-8.
11. Olson BD, Mailhot JM, Anderson RW, Schuster GS, Weller RN. Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. *J Endod* 1997; 23: 676-9.
12. Marino TG, West LA, Liewehr FR, Mailhot JM, Buxton TB, Runner RR, et al. Determination of Periodontal Ligament Cell Viability in Long Shelf- Life Milk. *J Endod* 2000; 26: 699-702.
13. SOUZA, Beatriz Dulcineia Mendes. **Meios de conservação de dentes avulsionados: estudo em cultura de células.** 2009. 136f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
14. Sant’ana ACP, Marques MM, Barroso EC, Passanezi E. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. *Rev Fac Odontol Bauru* 2002; 10: 134-40.
15. Krasner P. Management of tooth avulsion in the school setting. *J Sch Nurs* 1992; 8: 20-6.

2.3 ARTIGO 3: Efeito do própolis, da clara de ovo e da água de coco sobre a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal

Beatriz D. Mendes Souza, MSc¹, Wilson Tadeu Felipe, DDS, MSc, PhD¹, Cláudia Maria O. Simões, MSc, PhD², Mara Cristina S. Felipe, DDS, MSc, PhD¹.

¹ Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

² Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Resumo

O propósito deste estudo foi avaliar, através do ensaio MTT, a capacidade de novos meios de conservação de manter a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLPH). FLPH foram conservados, a 5 e a 20°C, em própolis, clara de ovo, água de coco, solução salina balanceada de Hank (HBSS), Save-A-Tooth[®], leite desnatado e leite integral por 3, 6, 24, 48, 72, 96 e 120h. Células conservadas em Meio Essencial Mínimo (MEM) a 37°C e em água de torneira, a 5 e a 20°C, serviram como controle-positivo e negativo, respectivamente. Os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis, Scheffé e Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). Os resultados mostraram que, em ambas as temperaturas, o leite desnatado foi o melhor meio de conservação, seguido pelo leite integral e HBSS. O própolis, a clara de ovo e a água de coco podem ser indicados para a conservação de fibroblastos periodontais por um período máximo de 3h.

Palavras-chaves

Avulsão dentária, fibroblastos do ligamento periodontal, meios de conservação.

Introdução

A avulsão dental se caracteriza pelo deslocamento completo do dente para fora do alvéolo. Durante o período extra-alveolar, as células aderidas à superfície da raiz estão sujeitas à contaminação e tendem a sofrer desidratação e necrose (Andreasen & Hjørting-Hansen 1966, Andreasen 1981, Gamson et al. 1992, Patil et al. 1994, Doyle et al. 1998). Assim, a conduta recomendada é reimplantar o dente o mais rápido possível para minimizar a ocorrência de reabsorções (Blomlöf et al. 1983, Trope & Friedman 1992). Quando isso não for possível, o uso de um meio de conservação que preserve a viabilidade das células do ligamento periodontal é fundamental para o sucesso do reimplante.

A HBSS, comercialmente disponível como Save-A-Tooth[®] (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA), tem sido recomendada para a manutenção de dentes avulsionados (American Association of Endodontists 2004). No entanto, alguns autores demonstraram que após 8h, a efetividade do Save-A-Tooth[®] é inferior a do leite (Olson et al. 1997, Marino et al. 2000, Souza 2007), a da HBSS recém-manipulada (Souza 2007) e similar a da água de torneira depois de 24h de conservação (Souza 2007, Souza et al. 2009).

O leite tem ampla aceitação como meio de conservação (Blomlöf & Otteskog 1980, Blomlöf 1981, Lindskog et al. 1983, Huang et al. 1996, Harkacz et al. 1997, Marino et al.

2000, Sigalas et al. 2004, Souza 2007). Estudos demonstraram que leite refrigerado e com baixo conteúdo de gordura é mais adequado para a manutenção da viabilidade de fibroblastos periodontais (Blomlöf & Otteskog 1980, Blomlöf 1981, Ashkenazi et al. 1999, Sigalas et al. 2004).

Mais recentemente, o própolis, a clara de ovo e a água de coco foram avaliados como possíveis meios de conservação. O própolis possui propriedades antimicrobianas, fungicidas e anti-inflamatórias (Koo et al. 2000). Embora não se encontre facilmente disponível, alguns estudos revelaram que esta solução foi similar (Gopikrishna et al. 2008a) ou até melhor do que a HBSS na manutenção da viabilidade de FLPH (Martin & Pileggi 2004, Ozan et al. 2007). Rica em proteínas e facilmente obtível, a clara de ovo se revelou tão efetiva quanto a HBSS na conservação de fibroblastos periodontais por até 12h (Khademi et al. 2008). A água de coco possui composição química semelhante à das bebidas isotônicas e costuma ser usada para rehidratação corporal e reposição de sais (Pinheiro et al. 2005). Enquanto Gopikrishna et al. (2008a,b) relataram que a água de coco foi mais efetiva na manutenção da viabilidade celular do que o leite e a HBSS, Moreira-Neto et al. (2009) observaram maior efetividade do leite.

Diante da possibilidade de uso desses novos meios de conservação e das controvérsias existentes nos poucos estudos realizados para avaliá-los, o objetivo desta pesquisa foi comparar, através do ensaio MTT, a viabilidade de FLPH mantidos por até 120h, a 5 e a 20°C, em própolis, clara de ovo, água de coco, HBSS, Save-A-Tooth[®], leite desnatado e leite integral.

Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Protocolo 073/08).

FLPH foram cultivados em garrafas de cultura celular com MEM (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab, Brazil) e 1% de penicilina sódica (10.000 UI), de estreptomicina (10mg) e de anfotericina B (25µg) (PSA) (Cultilab, Brazil) em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂ em atmosfera umedecida (Fanem, HF 212, São Paulo, SP, Brasil). As células foram subcultivadas a cada 5 dias até a obtenção do número suficiente para a realização dos experimentos. Foram utilizadas células da quinta a décima passagem.

As células (8×10^3 células por cavidade) foram semeadas em 14 placas com 96 cavidades (TPP, Trasadingen, Switzerland) e incubadas a 37°C com 5% CO₂. Após

semiconfluência, o MEM foi aspirado e as células foram expostas, a 5 e a 20°C, a 100 µL de: leite longa vida desnatado (UHT, Parmalat, São Paulo, SP, Brazil) (pH 6,8); leite longa vida integral (UHT, Parmalat, Brazil) (pH 6,8); HBSS (pH 7,2); Save-A-Tooth[®] (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA) (pH 7); água de coco (pH 5,5) filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore, Chicago, USA), própolis 20% veiculado em propilenoglicol (pH 6), clara de ovo (pH 8,7) e água de torneira (pH 7,6) (controle-negativo). Células conservadas a 37°C em MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA serviram como controle-positivo para verificação do crescimento celular. Cada um dos meios foi testado em 11 cavidades de cada placa de cultura e o experimento foi repetido 3 vezes em dias independentes.

Para a avaliação da viabilidade celular, foi empregado o Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazólio (MTT). Para isso, após 3, 6, 24, 48, 72, 96 e 120h, os meios de conservação foram substituídos por 100 µL de solução tampão fosfato (PBS) para lavagem do tapete celular e, posteriormente, por 50 µL de solução de MTT (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) + MEM (1mg/mL em MEM). As placas foram incubadas a 37°C e, depois de 4h, o MTT + MEM foi retirado e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados. As placas foram, então, agitadas levemente de 2 a 5 min para solubilizar a formazana. A leitura dos valores de absorbância foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan MS 352, Haverhill, MA, USA).

A análise estatística dos dados registrados foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Scheffé. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os resultados a 5 e a 20°C. O nível de significância foi de 5%.

Resultados

As médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade das células mantidas nos diferentes meios e períodos de conservação, encontram-se expressas nas Figuras 1 (5°C) e 2 (20°C). O teste de Kruskal-Wallis revelou que, para ambas as temperaturas, houve diferença significativa em função do tempo e do meio analisado. Tanto a 5 como a 20°C, a partir de 6h o MEM apresentou maior efetividade do que todos os outros meios ($p < 0,001$). Os piores resultados foram revelados após a exposição das células à água de torneira.

No experimento realizado a 5°C, a eficácia do própolis, da água de coco e da clara de ovo foi sempre inferior a do leite desnatado e integral ($p < 0,001$), os quais foram melhores do que todos os outros meios experimentais ($p < 0,001$), exceto no período de 6h, quando a HBSS apresentou desempenho similar ($p > 0,05$). Quando o leite desnatado foi comparado ao integral, revelou melhores resultados somente após 96h ($p < 0,05$).

No experimento realizado a 20°C, a eficácia do própolis, da água de coco e da clara de ovo foi similar à da HBSS, Save-A-Tooth[®], leite desnatado e integral no período de 3h ($p > 0,05$). No período de 6h, o leite desnatado e integral e a HBSS foram mais efetivos do que os outros meios ($p < 0,001$). Já em 24 e 48h, a HBSS foi menos efetiva do que leite desnatado e integral ($p < 0,05$). Quando o leite desnatado foi comparado ao integral, mostrou melhores resultados a partir de 48h ($p < 0,001$).

Discussão

Nos últimos anos, a eficácia de meios de conservação naturais como própolis, clara de ovo e água de coco tem sido avaliada (Martin & Pileggi 2004, Ozan et al. 2007, Khademi et al. 2008, Gopikrishna et al. 2008ab). No entanto, nenhum estudo comparou, simultaneamente, a efetividade desses produtos com a dos já consagrados na literatura, como a HBSS e o leite.

Nesta pesquisa, foi verificado que leite desnatado e leite integral, a 5 e a 20°C, apresentaram melhor desempenho do que qualquer outra solução experimental. Estes resultados foram similares aos de Souza (2007), que demonstrou que leite desnatado a 20°C foi o meio mais efetivo por até 48h. Provavelmente, a eficácia do leite se deve à sua osmolalidade e pH fisiológicos (230-270 mOsm/Kg e 6,5-6,8, respectivamente), à presença de alguns nutrientes (Blomlöf 1981) e fatores de crescimento (Belford et al. 1995). Além disso, é importante ressaltar que o leite aqui utilizado foi do tipo UHT (ultra high temperature), considerado comercialmente estéril. Após 96h, a efetividade do leite desnatado foi melhor quando testada a 5°C. É possível que a temperatura mais baixa tenha retardado o declínio do seu pH (Blomlöf 1981), mantendo o ambiente mais fisiológico para a sobrevivência celular. Este resultado corrobora o de Sigalas et al. (2004) e Ashkenazi et al. (1999), os quais afirmaram que leite resfriado é mais adequado para a preservação da viabilidade celular. Independentemente da temperatura utilizada, não houve diferença significativa entre a efetividade do leite desnatado e integral, exceto a partir de 48h (experimento a 20°C) e de 96h (experimento a 5°C), períodos nos quais o leite desnatado mostrou melhores resultados. Outros autores observaram que, já a partir de 3h, leite com baixo conteúdo de gordura foi mais apropriado para a manutenção da viabilidade de fibroblastos periodontais do que leite com alto conteúdo de gordura (Harkacz et al. 1997). A gordura do leite serve de substrato para o crescimento bacteriano (Linton & Herper 2008). Até mesmo o leite considerado estéril (leite longa vida, ultrapasteurizado, UHT), depois de aberto, deve ser armazenado em baixas temperaturas, para evitar a sua contaminação e decomposição.

A 20°C, a HBSS, mostrou efetividade similar a do leite integral e desnatado nos períodos de 3 e 6h, tornando-se inferior nos períodos de 24 e 48h. Esses resultados corroboram os de Ozan et al. (2007) e contradizem os achados de outros autores, que afirmam que a HBSS é melhor do que o leite na conservação de células (Hiltz & Trope 1991, Huang et al. 1996). A 5°C, a eficácia da HBSS foi ainda pior. Provavelmente, nesta temperatura mais baixa, ocorre menor disponibilidade de componentes da solução, reduzindo a função mitocondrial e conseqüentemente a metabolização dos sais de tetrazólio.

Em relação ao Save-A-Tooth[®], os resultados foram desanimadores. Após 24h, sua eficácia diminuiu consideravelmente em ambas as temperaturas. Este achado corrobora os de outros autores que verificaram que o Save-A-Tooth[®] foi similar ao ambiente seco na conservação de fibroblastos periodontais depois de 12h (Olson et al. 1997) e similar à água depois de 24h (Souza 2007, Souza et al. 2009). A razão para os resultados obtidos com o Save-A-Tooth[®] é desconhecida. Embora meramente especulativo, é possível que 100 µL desse produto não contenha nutrientes suficientes para nutrir as células por muito tempo, conforme sugerido por Olson et al. (1997). Recentemente, Souza et al. (2009) demonstraram que a estocagem da HBSS interferiu negativamente na sua capacidade de manter a viabilidade de fibroblastos periodontais. É possível, portanto, que no presente estudo, o tempo decorrido desde a fabricação do Save-A-Tooth[®] até sua utilização tenha interferido na sua efetividade. Vale lembrar que, embora o fabricante não informe a data de fabricação, o prazo de validade do produto aqui utilizado se estendia até janeiro de 2012 (lote 8231).

A eficácia do própolis a 20°C foi similar à das outras soluções experimentais somente no período de 3h. Posteriormente, seu desempenho tornou-se inferior ao do leite desnatado, ao do leite integral e ao da HBSS. Estes achados discordam dos de Martin & Pileggi (2004) e Ozan et al. (2007), que mostraram que esse produto foi mais efetivo do que o leite e a HBSS. É possível que a diferença nos veículos utilizados para preparar o própolis, na temperatura de conservação e na técnica utilizada para avaliar a viabilidade celular em cada estudo, expliquem a discrepância de resultados. Em relação ao veículo, Ozan et al. (2007) empregaram solução de própolis veiculada em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o que deve ter melhorado sua efetividade. Já a solução de própolis avaliada neste estudo foi preparada com propilenoglicol, conforme sugerido por Gulinelli et al. (2008). É provável que a veiculação em propilenoglicol tenha interferido negativamente no desempenho do própolis, pois em um estudo paralelo foi observado que o efeito do propilenoglicol sobre a cultura celular foi similar ao da água de torneira (dados não apresentados).

A eficácia da clara de ovo, a 20°C, foi similar a de todas as soluções experimentais somente no período de 3h. Este resultado discorda do obtido por Khademi et al. (2008), os quais mostraram que a clara de ovo foi similar a HBSS e melhor do que o leite na manutenção da viabilidade de fibroblastos periodontais por até 12h.

A água de coco, a partir de 6h, mostrou-se menos efetiva do que o leite desnatado, leite integral e HBSS. Provavelmente seu baixo pH (5,5) interferiu em seu desempenho. Embora este achado concorde com o de Moreira-Neto et al. (2009), ele discorda dos de Gopikrishna et al. (2008a,b), que demonstraram maior efetividade da água de coco em relação ao leite e a HBSS. As diferenças de metodologias podem explicar essas controvérsias, pois enquanto neste estudo culturas de FLPH foram expostas aos diferentes meios por períodos de 3 a 120h, nos estudos de Gopikrishna et al. (2008a,b) dentes humanos recém-extraídos foram imersos nos meios experimentais por 45 min após terem permanecidos a seco por 30 min.

Geralmente, dentes avulsionados são armazenados em uma solução à temperatura ambiente. No entanto, temperaturas mais baixas têm a vantagem de reduzir o metabolismo celular (Barile, 1994) e de limitar o crescimento bacteriano (Ashkenazi et al. 1999). Segundo Sigalas et al. (2004) a conservação de um dente avulsionado em ambiente refrigerado é mais benéfica do que a conservação à temperatura ambiente. Este estudo foi realizado a 5 e a 20°C para avaliar o efeito da temperatura sobre a efetividade dos meios estudados. O teste de Mann-Whitney revelou diferença significativa dependendo do período e meio analisado. De um modo geral, o desempenho do própolis, da clara de ovo e da água de coco não sofreu influência da temperatura de estocagem utilizada. Já a temperatura mais baixa prejudicou a efetividade da HBSS e favoreceu a do leite desnatado e integral, a partir de 96 e 48h, respectivamente. Vale ressaltar que, apesar do leite desnatado e leite integral terem sido melhores a 5 do que a 20°C, nesses períodos seus desempenhos foram muito inferiores ao do controle-positivo (MEM).

De acordo com os resultados obtidos foi concluído que, em ambas as temperaturas, o leite desnatado foi o melhor meio de conservação, seguido pelo leite integral e HBSS. O própolis, a clara de ovo e a água de coco podem ser indicados para a conservação de fibroblastos periodontais por um período máximo de 3h.

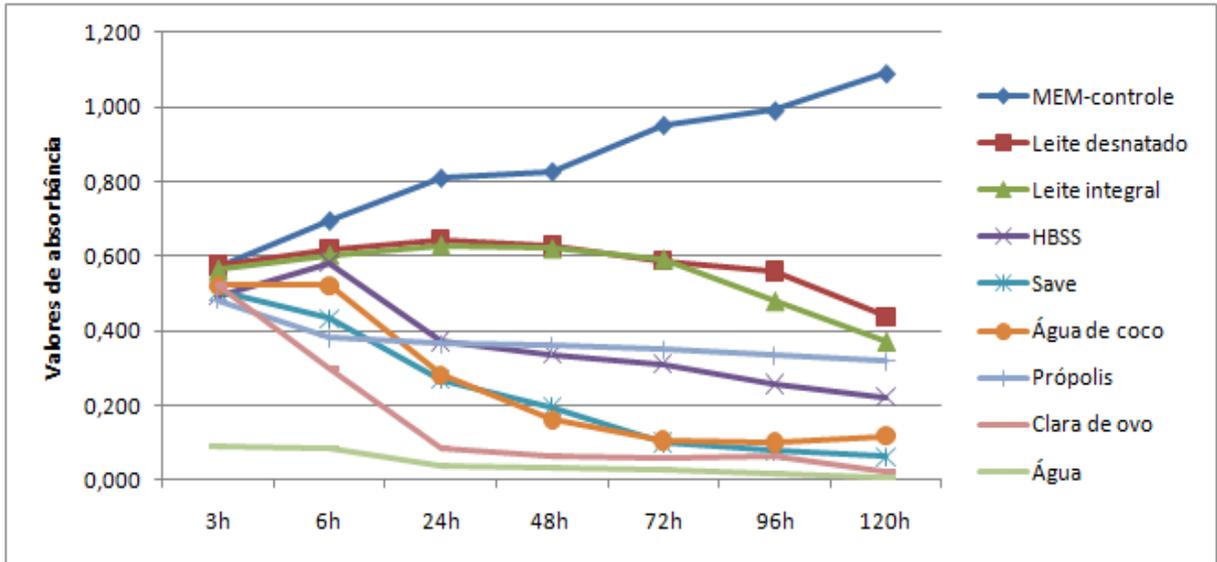


Fig. 1 Média dos valores de absorbância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 5°C nos diferentes meios e períodos de tempo.

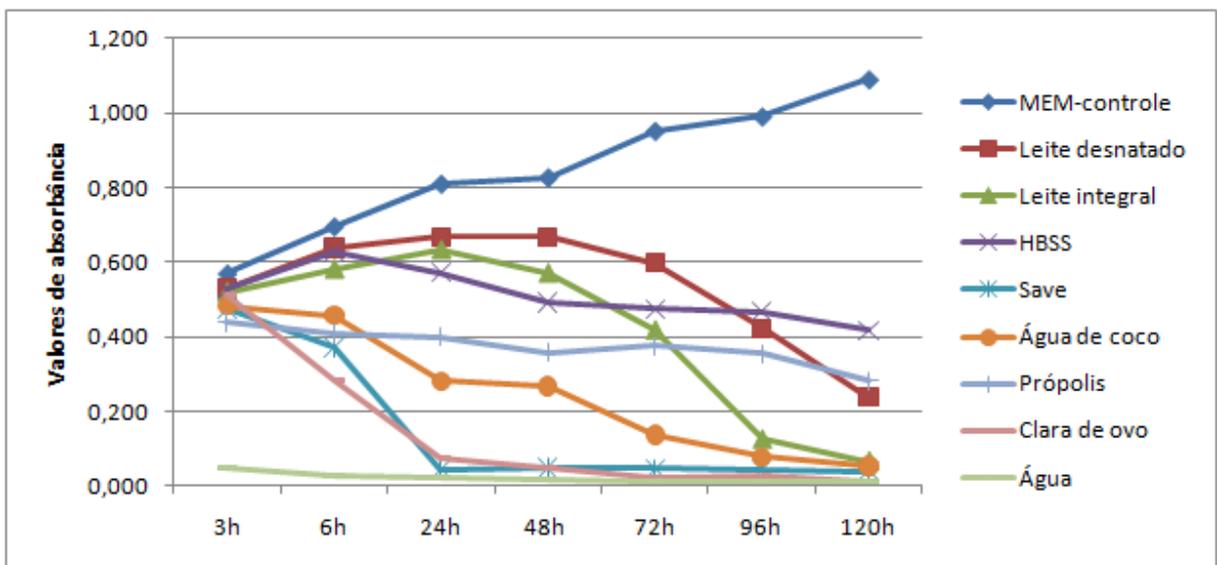


Fig. 2 Média dos valores de absorbância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 20°C nos diferentes meios e períodos de tempo.

Referências

1. Andreasen JO, Hjørting-Hansen E. Replantation of teeth. Part I. Radiographic and clinical study of 22 replanted anterior teeth in humans. *Acta Odontol Scand* 1966; 24: 263-86.
2. Andreasen JO. 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* 1981; 10: 43-53.
3. Gamson EK, Dumsha TC, Sydiskis R. The effect of drying time on periodontal ligament cell vitality. *J Endod* 1992; 18: 189.
4. Patil S, Dumsha TC, Sydiskis RJ. Determining periodontal ligament (PDL) cell vitality from exarticulated teeth stored in saline or milk using fluorescein diacetate. *Int Endod J* 1994; 27: 1-5.
5. Doyle DL, Dumsha TC, Sydiskis RJ. Effect of soaking in Hank' balanced salt solution or milk on PDL cell viability of dry stored human teeth. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14: 221-4.
6. Blomlöf L, Lindskog S, Anderson L, Hedström K-G, Hammarström L. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. *J Dent Res* 1983; 62: 912-6.
7. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hanks' balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8: 183-8.
8. American Association of Endodontists. Recommended Guidelines for the treatment of avulsed permanent tooth. Chicago, IL: American Association of Endodontists, 2004.
9. Olson BD, Mailhot JM, Anderson RW, Schuster GS, Weller RN. Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. *J Endod* 1997; 23: 676-9.
10. Marino TG, West LA, Liewehr FR, et al. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf- life milk. *J Endod* 2000; 26: 699-702.

11. SOUZA, Beatriz Dulcineia Mendes. **Comparação *in vitro* da efetividade de vários meios de conservação na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.** 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
12. SOUZA, Beatriz Dulcineia Mendes. **Meios de conservação de dentes avulsionados: estudo em cultura de células.** 2009. 136f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
13. Blomlöf L, Otteskog P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1980; 88: 436-40.
14. Blomlöf L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed Dent J* 1981; 8: 1-26.
15. Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L. Mitosis and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1983; **91**: 465-72.
16. Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC. Effects of long- term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endod* 1996; 22: 30-3.
17. Harkacz OM, Carnes DL, Walter WA. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* 1997; 23: 687-90.
18. Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE, Opperman LA. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2004; 20: 21-8.
19. 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* 1999; 15: 149-56.

20. Koo H, Gomes BPF, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and arnica Montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 141-8.
21. Gopikrishna V, Baweja PS, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. Comparison of coconut, water, propolis, HBSS and milk on PDL cell survival. *J Endod* 2008a; 34: 587-9.
22. Martin MP, Pileggi RA quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol* 2004; 20: 85-9.
23. Özan F, Polat ZA, Er K, Özan Ü, Deger O. Effect of propolis on survival of periodontal ligament cells: New storage media for avulsed teeth. *J Endod* 2007; 33: 570-3.
24. Khademi AA et al. A new storage medium for an avulsed tooth. *J Contemp Dent Pract* 2008; 9: 25-32.
25. Pinheiro AM et al. Caracterização química, físico-química, microbiológica e sensorial de diferentes marcas de água de coco obtidas pelo processo asséptico. *Rev Cienc Agron* 2005; 2: 209-214
26. Gopikrishna V, Thomas T, Kandaswamy D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008b; 105: 61-5.
27. Moreira-Neto JJS, Gondim JO, Raddi MSG, Pansani CA. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. *Int Endod J* 2009; 42: 827-30.
28. Belford DA, Rogers ML, Register GO, et al. Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. *In vitro Cell Dev Biol Animal* 1995; 31: 752-60.
29. Linton RH, Herper N. Survival and Growth of foodborne microorganisms in processed and individually wrapped cheese slices. *J Environ Health* 2008; 7: 31-7.

30. Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod Dent Traumatol* 1991; 7: 69-72.
31. Gulinelli JL et al. Effect of root surface treatment with propolis and fluoride in delayed tooth replantation in rats. *Dent Traumatol* 2008; 6: 651-7.
32. Barile FA. *Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods*. Boca Raton: CRC Press 1994; 12-4.

2.4 ARTIGO 4: Efeito de diferentes meios de conservação sobre a viabilidade e a capacidade proliferativa de fibroblastos do ligamento periodontal humano

Beatriz D. Mendes Souza, MSc¹, Wilson Tadeu Felipe, DDS, MSc, PhD¹, Cláudia Maria O. Simões, MSc, PhD², Mara Cristina S. Felipe, DDS, MSc, PhD¹.

¹ Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

² Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Resumo

Os objetivos deste estudo foram verificar a viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano (FLPH) após 24h de contato com leite desnatado, leite integral, solução salina balanceada de Hank (HBSS), Save-A-Tooth[®], própolis, clara de ovo e água de coco, a 5 e a 20°C, e verificar a capacidade de proliferação celular após a incubação em Meio Essencial Mínimo (MEM) a 37°C por 24, 48, 72, 96 e 120h. Células mantidas em MEM a 37°C e em água de torneira, a 5 e a 20°C, serviram como controle-positivo e negativo, respectivamente. A avaliação da viabilidade e da capacidade de proliferação celular foi realizada por meio do ensaio MTT. Os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis, Scheffé e Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). Os resultados demonstraram que, tanto a 5 como a 20°C, o leite desnatado e o leite integral mantiveram maior percentual de células viáveis. Quando os meios foram mantidos a 5°C, o leite desnatado e o leite integral proporcionaram maior capacidade de proliferação celular. Quando mantidos a 20°C, as células expostas à HBSS, leite desnatado e leite integral demonstraram, nos períodos de 24 e 48h, proliferação similar e superior a dos outros meios testados. A partir de 72h, a proliferação das células mantidas em HBSS foi superior à das mantidas em leite desnatado e integral. Foi possível concluir que, em ambas as temperaturas, os meios mais efetivos em manter a viabilidade celular (0h) foram o leite desnatado e o leite integral. Quando os meios foram mantidos a 5°C, o leite desnatado e o leite integral proporcionaram maior capacidade proliferativa aos FLPH. Quando mantidos a 20°C, a HBSS revelou os melhores resultados.

Palavras chaves

Avulsão dentária, fibroblastos do ligamento periodontal, meios de conservação.

Introdução

Nos casos de avulsão dental, a viabilidade das células que permanecem aderidas à superfície radicular deve ser preservada até que o reimplante possa ser realizado. Isso permite que células viáveis proliferem e colonizem áreas desnudas da raiz, minimizando a incidência de anquilose e reabsorção radicular (Ashkenazi et al. 1999, Ashkenazi et al. 2000). Se o reimplante imediato não for possível, é importante que o dente avulsionado seja mantido em um meio que preserve a viabilidade e, principalmente, a capacidade de proliferação celular.

A HBSS, capaz de preservar a viabilidade celular por longo período de tempo (Hiltz & Trope 1991, Trope & Friedman 1992) e indicada para a conservação de dentes avulsionados,

está disponível no comércio internacional com o nome de Save-A-Tooth[®] (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA).

O leite é reconhecido como meio adequado por apresentar osmolalidade fisiológica, pH neutro, e fornecer alguns nutrientes (Blomlöf 1981) e fatores de crescimento às células (Belford et al. 1995). Harkacz et al. (1997) sugeriram que leite com baixo conteúdo de gordura é mais apropriado para manter a viabilidade celular do que leite com alto conteúdo de gordura.

Nos últimos anos, produtos naturais como o própolis, a clara de ovo e a água de coco foram avaliados como possíveis meios de conservação. O própolis possui propriedades antimicrobianas, fungicidas e anti-inflamatórias (Koo et al. 2000). Alguns estudos revelaram que essa solução foi similar ou até melhor do que a HBSS na manutenção da viabilidade de FLPH (Martin & Pileggi 2004, Ozan et al. 2007, Gopikrishna et al. 2008a). Rica em proteínas, principalmente albumina e facilmente obtível, a clara de ovo se revelou tão efetiva quanto a HBSS na conservação de fibroblastos periodontais por até 12h (Khademi et al. 2008). A água de coco, além de estéril, possui proteínas, vitaminas, sais minerais e osmolalidade fisiológica (Nadanasabapathy & Kumar 1999). Enquanto Gopikrishna et al. (2008a,b) relataram que a água de coco foi superior ao leite e à HBSS na manutenção da viabilidade celular, Moreira-Neto et al. (2009) mostraram superioridade do leite.

Como não há pesquisas que tenham avaliado a capacidade de proliferação das células após a exposição a esses novos meios de conservação, os objetivos deste estudo foram avaliar a viabilidade celular após 24h de contato com leite desnatado, leite integral, solução salina balanceada de Hank (HBSS), Save-A-Tooth[®], própolis, clara de ovo e água de coco, mantidos, a 5 e a 20°C, e verificar a capacidade de proliferação celular após a incubação em MEM a 37°C, por 24, 48, 72, 96 e 120h.

Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Protocolo 073/08).

FLPH foram cultivados em garrafas de cultura celular com MEM (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab, Brazil) e 1% de penicilina sódica (10.000 UI), de estreptomicina (10mg) e de anfotericina B (25µg) (PSA) (Cultilab, Brazil) em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de O₂ em atmosfera umedecida (Fanem, HF 212, São Paulo, SP, Brasil). As células foram subcultivadas a cada 5 dias, até a obtenção de número suficiente para a realização dos experimentos. Foram utilizadas células da quinta a

décima passagem. Em um estudo piloto foi determinado o número ideal de células por cavidade (4×10^3 células por cavidade).

Para os experimentos, a 5 e a 20°C, o MEM foi aspirado das cavidades das placas de cultura e as células foram expostas a 100 µL de: leite longa vida desnatado (UHT, Parmalat, São Paulo, SP, Brazil) (pH 6,8); leite longa vida integral (UHT, Parmalat, Brazil) (pH 6,8); HBSS (pH 7,2); Save-A-Tooth® (Phoenix-Lazerus, Shartlesville, PA, EUA) (pH 7); água de coco (pH 5,5); própolis 20% veiculado em propilenoglicol (pH 6); clara de ovo (pH 8,7) e água de torneira (pH 7,6) (controle-negativo). Células conservadas a 37°C em MEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA, serviram como controle-positivo para verificação do crescimento celular. Cada um dos meios foi testado em 11 cavidades de cada placa de cultura e o experimento foi repetido 3 vezes em dias independentes.

Após 24h de exposição, os meios de conservação foram removidos e as cavidades lavadas com 100 µL de solução tampão fosfato (PBS). Em uma das placas, a viabilidade celular foi verificada imediatamente (0h) pelo Ensaio Colorimétrico com Sal de Tetrazólio (MTT). Nas placas restantes, logo após a lavagem com PBS, as cavidades foram preenchidas com 100 µL de MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PSA. As placas foram, então, incubadas a 37°C, por 24, 48, 72, 96 e 120h, sem troca do meio. Desde o início dos experimentos, a cultura celular foi monitorada por meio de microscópio ótico invertido (100x, Diaphot, Nikon, Tokyo, Japão) e fotografada regularmente para acompanhamento.

A capacidade de proliferação celular foi avaliada, também, pelo ensaio MTT. Para isso, após cada período (0h – viabilidade celular, 24-120h – proliferação celular), o MEM foi substituído por 50 µL de solução de MTT (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA) + MEM (1mg/mL em MEM). As placas foram incubadas a 37°C por 4h e, em seguida, a solução foi retirada e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados. As placas foram, então, agitadas levemente de 2 a 5 min para solubilizar a formazana. A leitura dos valores de absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan MS 352, Haverhill, MA, USA) a 540 nm.

A análise estatística dos dados registrados foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Scheffé. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os resultados obtidos a 5 e a 20°C. O nível de significância foi de 5%.

Resultados

As médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade e da capacidade de proliferação das células mantidas nos diferentes meios e períodos de conservação, encontram-se expressas nas Figuras 1 (5°C) e 2 (20°C). O teste de Kruskal-Wallis revelou que, para ambas as situações, houve diferença significativa em função do tempo e meio analisado.

Em relação à viabilidade celular (0h), tanto a 5 como a 20°C, os melhores meios foram o leite desnatado e o leite integral, e os piores foram a água de coco, o Save-A-Tooth® e a clara de ovo. Enquanto a 5°C a efetividade do própolis foi superior à da HBSS ($p < 0,001$), a 20°C a efetividade desses produtos foi similar ($p = 1,000$).

Em relação à proliferação, avaliada de 24 a 120h, as células mantidas por 24h em MEM apresentaram maior capacidade proliferativa do que as mantidas nos outros produtos ($p < 0,001$). A 5°C, as células mantidas em leite desnatado e em leite integral apresentaram maior capacidade de proliferação do que as mantidas nos outros meios testados. A 20°C, a proliferação das células mantidas inicialmente em leite desnatado, leite integral e HBSS foi similar por até 48h ($p > 0,05$). A partir de 72h, as células que ficaram em contato com a HBSS mostraram maior capacidade proliferativa ($p < 0,001$).

Independentemente da temperatura, os resultados obtidos com a manutenção inicial das células em leite desnatado e em leite integral foram similares em qualquer período de tempo ($p > 0,05$).

Tanto a 5 como a 20°C, a menor capacidade de proliferação foi observada nas células que ficaram em contato com própolis, água de coco, Save-A-Tooth®, clara de ovo e água de torneira.

Discussão

A manutenção da viabilidade e da capacidade proliferativa dos fibroblastos do ligamento periodontal é fundamental para o reparo pós-reimplante. Além de depender do meio empregado, ela depende também do tempo e da temperatura de conservação. (Blomlöf & Otteskog 1980). Geralmente, dentes avulsionados são armazenados em uma solução à temperatura ambiente. No entanto, temperaturas mais baixas têm a vantagem de reduzir o metabolismo celular (Barile 1994) e de limitar o crescimento bacteriano (Ashkenazi et al. 1999). Já foi demonstrado que a conservação em ambiente refrigerado é mais benéfica para a manutenção da capacidade de proliferação celular do que a conservação à temperatura ambiente (Sigalas et al. 2004). Este estudo foi realizado a 5 e a 20°C para avaliar o efeito da temperatura sobre a efetividade dos meios testados e permitir comparações.

Efeito da temperatura

Em relação à viabilidade celular (0h), todos os meios experimentais conservaram mais células viáveis quando mantidos a 5°C, com exceção da HBSS, cuja efetividade não foi afetada pela temperatura. Em relação à capacidade proliferativa, avaliada de 24 a 120h após a incubação em MEM, as células mantidas a 5°C em leite desnatado, leite integral, Save-A-Tooth[®], própolis, clara de ovo e água de coco mostraram capacidade de proliferação similar à registrada quando foram mantidas nos mesmos meios a 20°C. Já as células que foram previamente mantidas em HBSS a 20°C mostraram maior capacidade de proliferação do que as mantidas a 5°C. Estes resultados discordam dos de Sigalas et al. (2004), que afirmaram que a conservação em um meio refrigerado proporciona melhores condições de proliferação celular do que a conservação à temperatura ambiente. A divergência dos resultados pode ser decorrente dos diferentes tempos de exposição, pois, neste estudo, as células ficaram em contato com os meios por 24h, enquanto que no de Sigalas et al. (2004), o contato ocorreu por apenas 1h.

Viabilidade celular (0h)

Com exceção do controle-positivo (MEM), em ambas as temperaturas o leite desnatado e o leite integral foram os meios mais efetivos na conservação da viabilidade celular (0h), revelando, inclusive, superioridade sobre a HBSS. Ozan et al. (2007), Souza (2007) e Souza et al. (2009a) também relataram que após 24h de contato, o leite mostrou melhor desempenho quando comparado à HBSS. Por outro lado, outros autores relataram que a efetividade da HBSS é maior (Sigalas et al. 2004) ou similar (Ashkenazi et al. 1999) a do leite. Provavelmente, diferenças no tipo de leite, no tempo de contato dos meios com as células e nas técnicas de avaliação podem justificar essas discrepâncias. Enquanto Sigalas et al. (2004) empregaram um período de apenas 1h de exposição aos meios, neste estudo foi utilizado um período de 24h. Ashkenazi et al. (1999) avaliaram a viabilidade celular pela técnica do corante azul de tripano. Nesta pesquisa foi utilizado o ensaio MTT. Conforme alguns autores (Tatmall et al. 1990, Souza 2007, Moreira-Neto 2009), a técnica do corante azul de tripano é menos sensível, pois não é capaz de identificar a condição metabólica das células não coradas. Recentemente, Souza (2007) avaliou o efeito de diferentes meios de conservação sobre a viabilidade de fibroblastos periodontais por meio das duas técnicas. Enquanto o ensaio MTT detectou diferença significativa na efetividade dos produtos avaliados, pela técnica do corante azul de tripano todos os meios apresentaram efetividade similar.

Segundo o fabricante, o Save-A-Tooth[®] permite a conservação do dente avulsionado por até 24h. No entanto, os resultados deste estudo revelaram que, tanto a 5 como a 20°C, este produto mostrou desempenho tão desfavorável quanto o da água de torneira. Este achado corrobora os de outros autores que verificaram que a efetividade do Save-A-Tooth[®], para a conservação de células, foi similar à água depois de 12h (Olson et al. 1997) e 24h (Souza 2007, Souza et al. 2009a, Souza et al. 2009b).

Em relação aos produtos naturais (própolis, clara de ovo e água de coco), os resultados também foram desanimadores. Estes achados concordam com os de Moreira-Neto et al. (2009), que afirmaram que o leite, no período de 4h, foi superior a água de coco, e com os de Souza et al. (2009a), que demonstraram que o própolis, a clara de ovo e a água de coco são meios aceitáveis por apenas 3h de conservação. Por outro lado, estes resultados são diferentes dos de Martin & Pileggi (2004), Ozan et al. (2007), Khademi et al. (2008) e Gopikrishna et al. (2008a,b). Novamente, é provável, que as discrepâncias de resultados sejam devidas às diferentes metodologias. Enquanto nesta pesquisa FLPH foram mantidos em contato com os diferentes meios, nos estudos desses autores (Martin & Pileggi 2004, Khademi et al. 2008, Gopikrishna et al. 2008a,b) dentes recém-extraídos foram imersos nos meios experimentais. Avaliando a efetividade do própolis, Ozan et al. (2007) revelou superioridade deste produto em relação ao leite e à HBSS. Embora esses autores tenham empregado metodologia semelhante à deste estudo, inclusive o mesmo período de contato (24h), eles empregaram solução de própolis veiculada em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), o que deve ter melhorado sua efetividade. Já a solução de própolis avaliada neste estudo foi preparada com propilenoglicol, que pode ter interferido negativamente no desempenho do própolis, conforme mencionado por Souza et al. (2009a).

Capacidade de proliferação

Para a avaliação da capacidade proliferativa, logo após 24h de contato os meios foram substituídos por MEM e as placas incubadas a 37°C para restabelecer as condições ideais de cultura e permitir a verificação de suas condições de recuperação e proliferação. Durante todo o período experimental (0-120h), as culturas foram monitoradas e fotografadas. Conforme pode ser observado nas Figuras 1 e 2, as células mantidas por 24h em leite desnatado, leite integral e em HBSS (principalmente a 20°C) conservaram, até certo ponto, a capacidade de recuperação, já que a posterior incubação em MEM permitiu a proliferação. A análise das fotografias tomadas do início ao fim do experimento confirmam esses dados (Fig. 3), ou seja,

à medida em que se observou o aumento do número de células, maiores foram os valores de absorvância correspondentes.

As células mantidas em leite desnatado e em leite integral a 5°C mostraram maior capacidade de proliferação do que as mantidas nos outros meios experimentais. Estes achados discordam dos de Ashkenazi et al. (1999), que mostraram que células mantidas por 8 e 24h em HBSS e leite, ambos a 4°C, apresentaram capacidade mitogênica similar. Também discordam dos de Sigalas et al. (2004), que revelaram que células armazenadas por 1h em HBSS refrigerada apresentaram maior capacidade de proliferação do que as armazenadas em leite refrigerado. Novamente aqui, essas discrepâncias podem ser devidas às diferentes técnicas de avaliação. Enquanto neste estudo foi utilizado o ensaio MTT, Ashkenazi et al. (1999) e Sigalas et al. (2004) utilizaram a técnica com Timidina e a técnica de exclusão do corante Azul de Tripano, respectivamente.

A 20°C, as células mantidas em HBSS mostraram capacidade de proliferação similar a das mantidas em leite desnatado e em leite integral até 48h, e significativamente superior a partir de 72h. Parece que a temperatura de 20°C permite maior disponibilidade dos componentes da HBSS às células, as quais mantêm, apesar de reduzidas, suas funções vitais. Ao serem incubadas em MEM a 37°C, as células recuperaram sua capacidade de proliferação. Este resultado pode ter relevância clínica, já que células conservadas em HBSS a 20°C poderiam ter maior capacidade mitogênica após o reimplante dental, culminando com maiores chances de reparo e sucesso no tratamento.

Independentemente da temperatura, as células mantidas em própolis, clara de ovo, água de coco e Save-A-Tooth[®] apresentaram capacidade proliferativa bastante inferior àquelas armazenadas em leite desnatado, leite integral e HBSS (Figs 1, 2 e 3).

Baseado nos resultados obtidos foi possível concluir que, em ambas as temperaturas, os meios mais efetivos em manter a viabilidade celular (0h) foram o leite desnatado e o leite integral. Quando os meios foram mantidos a 5°C, o leite desnatado e o leite integral proporcionaram maior capacidade proliferativa aos FLPH. Quando mantidos a 20°C, a HBSS revelou os melhores resultados.

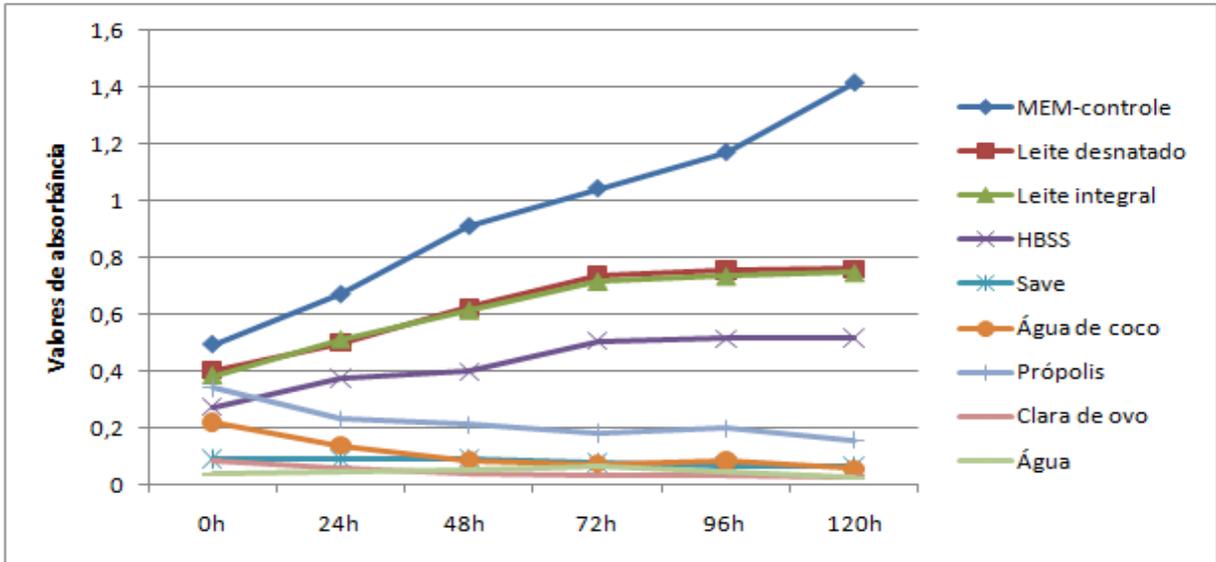


Fig. 1 Média dos valores de absorbância, representativa da viabilidade (0h) e da capacidade de proliferação (24-120h) de FLPH mantidos a 5°C, nos diferentes meios.

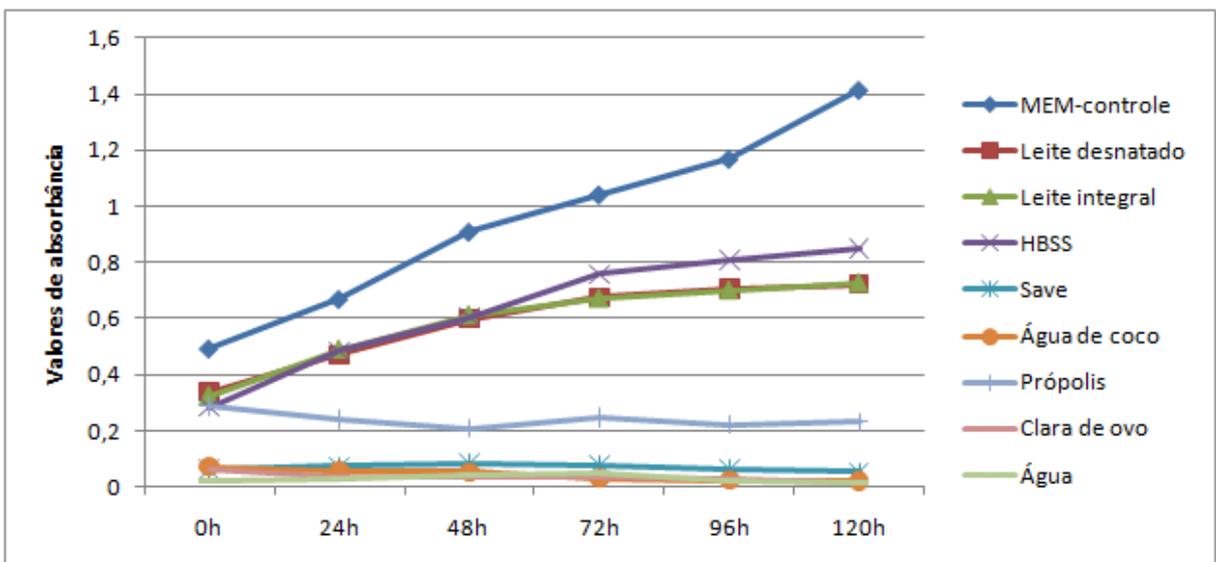


Fig. 2 Média dos valores de absorbância, representativa da viabilidade (0h) e da capacidade de proliferação (24-120h) de FLPH mantidos a 20°C, nos diferentes meios.

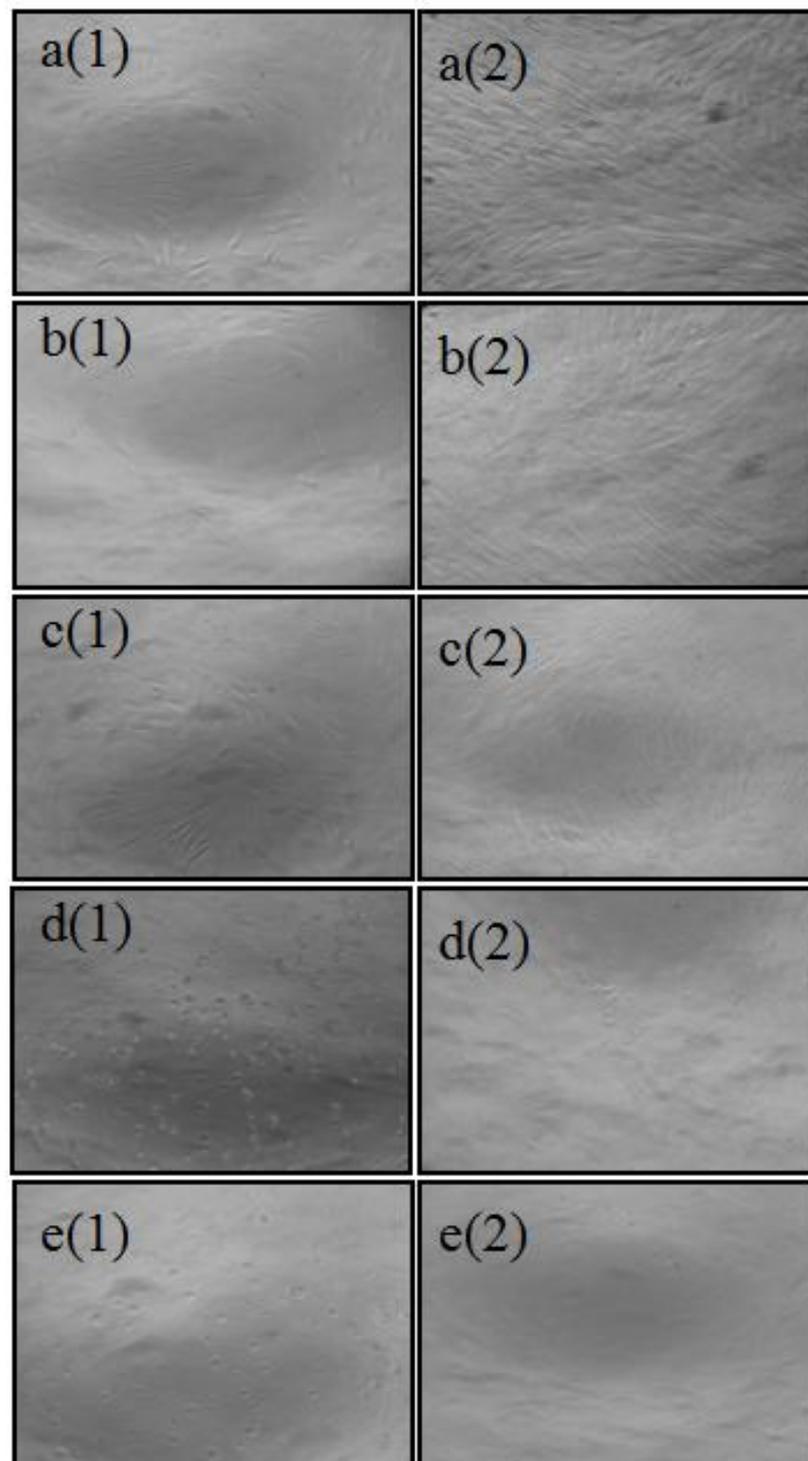


Fig. 3 - Imagens de fotomicrografias de FLPH conservados em diferentes meios (100x). (a) MEM a 37°C; (b) HBSS a 20°C; (c) leite desnatado a 5°C; (d) Save-A-Tooth[®] a 20°C; (e) água de torneira a 20°C; (1) após 24h de contato; (2) após 120h de incubação em MEM a 37°C. Note, em a(2), b(2) e em c(2), aumento do número de células, morfologicamente normais. Note, em d(2) e em e(2), diminuição do número de células, as quais se apresentam com morfologia alterada.

Referências

1. 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* 1999; 15: 149-56.
2. 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* 2000; 16: 63-70.
3. Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod Dent Traumatol* 1991; 7: 69-72.
4. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hanks' balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8: 183-8.
5. Blomlöf L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed Dent J* 1981; 8: 1-26.
6. Belford DA, Rogers ML, Register GO, et al. Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. *In vitro Cell Dev Biol Animal* 1995; 31: 752-60.
7. Harkacz OM, Carnes DL, Walter WA. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* 1997; 23: 687-90.
8. Koo H, Gomes B, PFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and arnica Montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000; 45: 141-8.
9. Martin MP, Pileggi RA quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol* 2004; 20: 85-9.

10. Özán F, Polat ZA, Er K, Özán Ü, Deger O. Effect of própolis on survival of periodontal ligament cells: New storage media for avulsed teeth. J Endod 2007; 33: 570-3.
11. Gopikrishma V, Baweja PS, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. Comparison of coconut, water, própolis, HBSS and milk on PDL cell survival. J Endod 2008a; 34: 587-9.
12. Khademi AA et al. A new storage medium for an avulsed tooth. J Contemp Dent Pract 2008; 9: 25-32.
13. Nadanasabapathy S, Kumar R. Physicochemical constituents of tender coconut (cocos nucifera) water. Indian J Agr Sci 1999; 10: 750-1.
14. Gopikrishma V, Thomas T, Kandaswamy D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2008b; 105: 61-5.
15. Moreira-Neto JJS, Gondim JO, Raddi MSG, Pansani CA (2009) Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. Int Endod J 2009; 42: 827-30.
16. Blomlöf L, Otteskog P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. Scand J Dent Res 1980; 88: 436-40.
17. Barile F. A. Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods. Boca Raton: CRC Press 1994; 12-4.
18. Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE, Opperman LA. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. Dent Traumatol 2004; 20: 21-8.
19. SOUZA, Beatriz Dulcineia Mendes. **Comparação *in vitro* da efetividade de vários meios de conservação na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.** 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

20. SOUZA, Beatriz Dulcineia Mendes. **Meios de conservação de dentes avulsionados: estudo em cultura de células.** 2009. 136f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. (a)

21. Tatmall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. *Skin Pharmacol* 1990; 3: 157-63.

22. SOUZA, Beatriz Dulcineia Mendes. **Meios de conservação de dentes avulsionados: estudo em cultura de células.** 2009. 136f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. (b)

3 CONCLUSÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos nos diferentes experimentos deste trabalho foi possível concluir que:

- 1) a renovação do leite foi capaz de prolongar a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH somente quando realizada, a cada 48h, no leite mantido a 5°C.
- 2) o tempo de estocagem da HBSS influenciou negativamente a sua capacidade de manter a viabilidade de FLPH.
- 3) em ambas as temperaturas, o leite desnatado foi o melhor meio de conservação, seguido pelo leite integral e HBSS. O própolis, a clara de ovo e a água de coco podem ser indicados para a conservação de fibroblastos periodontais por um período máximo de 3h.
- 4) em ambas as temperaturas, os meios mais efetivos em manter a viabilidade celular (0h) foram o leite desnatado e o leite integral. Quando os meios foram mantidos a 5°C, o leite desnatado e o leite integral proporcionaram maior capacidade proliferativa aos FLPH. Quando mantidos a 20°C, a HBSS revelou os melhores resultados.

REFERÊNCIAS¹

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. Recommended Guidelines for the treatment of avulsed permanent tooth. Chicago, IL: American Association of Endodontists, 2004.

ANDREASEN, J. O; HJØRTING-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. 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.

ANDREASEN, J. O.; ANDREASEN F.M.; ANDERSSON L. **Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth**. 4.ed.Oxford: Blackwell Munksgaard, p. 444, 2007.

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.

BARILE F. A. **Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods**. CRC Press, Boca Raton, p. 12-14, 1994.

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.

¹ Baseada na NBR 6023:2002 da ABNT

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.

CHENG, P. C.; WONG, G. Honey bee propolis: prospects in medicine. **Bee World**, v.77, p.8-15, 1996.

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.

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

GOPIKRISHMA, V. et al. Comparison of coconut, water, própolis, HBSS and milk on PDL cell survival. **J. Endod.**, Baltimore, v.34, n.5, p.587-89, May 2008.

GOPIKRISHMA, V.; THOMAS, T.; KANDASWAMY, D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. **Oral Surg. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodont.**, St. Louis, v.105, p.61-65, Feb. 2008.

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.

KHADEMI A. A. et al. A new storage for na avulsed tooth. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v.9, n.6, p.25-35, Sep. 2008

KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and arnica Montana against oral pathogens. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v. 45, p.141-148, 2000

KRASNER, P. Management of tooth avulsion in the school setting. **J. Sch. Nurs.**, v.8, n.1, p. 20-6, Feb. 1992.

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. **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.

MOREIRA-NETO, J. J. S. et al. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.42, n.9, p.827-830, Sep. 2009.

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.

NADANASABAPATHY, S.; KUMAR R. Physicochemical constituents of tender coconut (cocos nucifera) water. **Indian J. Agr. Sci.** v.69, p. 750-751, 1999.

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.

OZAN, F. et al. Effect of própolis on survival of periodontal ligament cells: new storage media for avulsed teeth. **J. Endod.**, Baltimore, v.33, p.570-573, 2007.

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.

ROCHA, M. J. C.; CARDOSO, M. Traumatized permanent teeth in Brazilian children assisted at the Federal University of Santa Catarina, Brazil. **Dent. Traumatol.**, v. 17, p 245-249, 2001.

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. **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 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. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, Berlin, v.33, p.813-823, 1995.

SOUZA, Beatriz Dulcineia Mendes. **Comparação *in vitro* da efetividade de vários meios de conservação na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.** 2007. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SOUZA B. D. M. et al. Effect of temperature and milk replacement on human periodontal ligament fibroblast viability. 2009 No prelo.

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.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Figuras

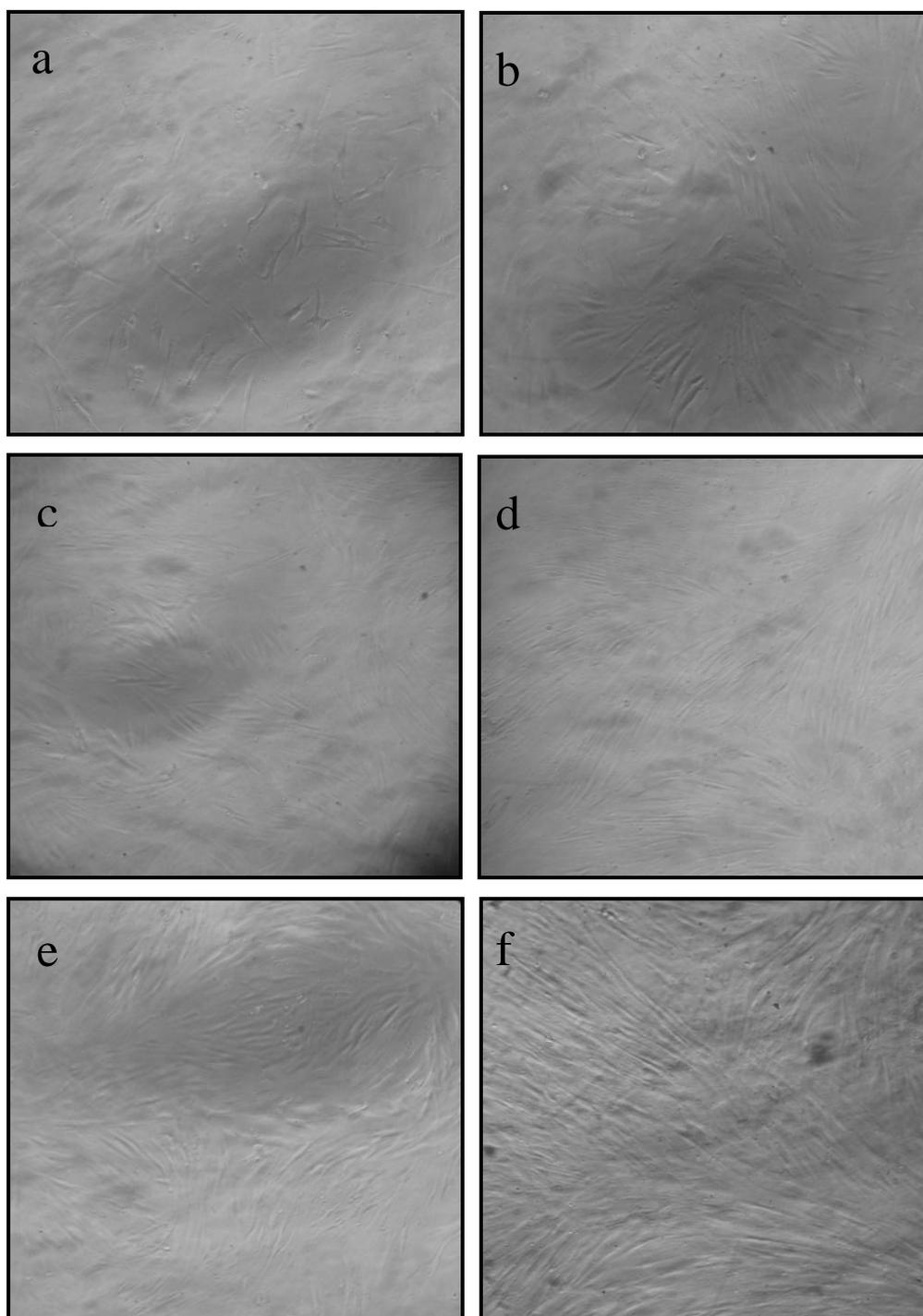


Figura 1 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Cultura inicial (a); após 24h de contato com MEM a 37°C (b); após reincubação em MEM a 37°C por 24h (c), 48h (d), 72h (e) e 120h (f).

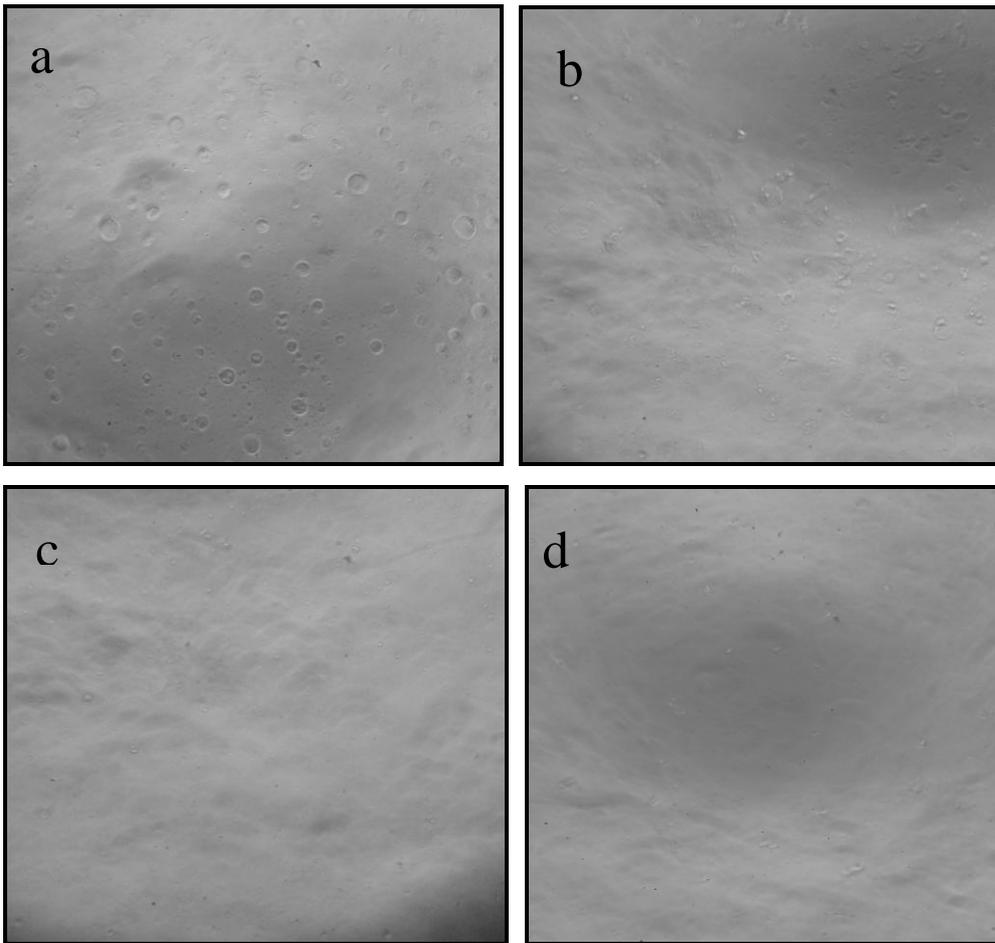


Figura 2 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Após 24h de contato com água de torneira a 20°C (a); após incubação em MEM a 37°C por 24 h (b), 72h (c) e 120h (d).

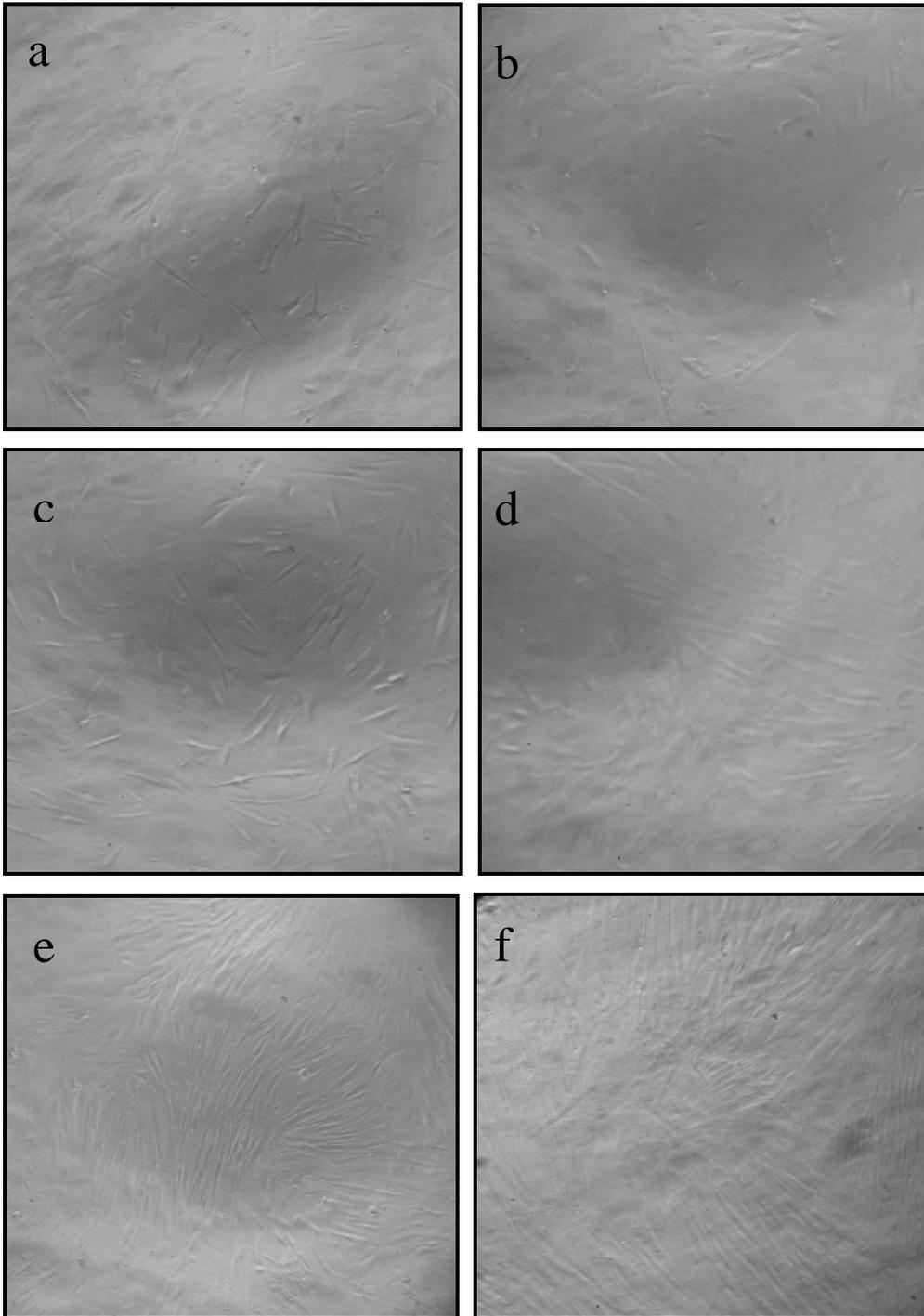


Figura 3 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Cultura inicial (a); após 24h de contato com HBSS a 20°C (b); após incubação em MEM a 37°C por 24h (c), 48h (d), 72h (e) e 120h (f).

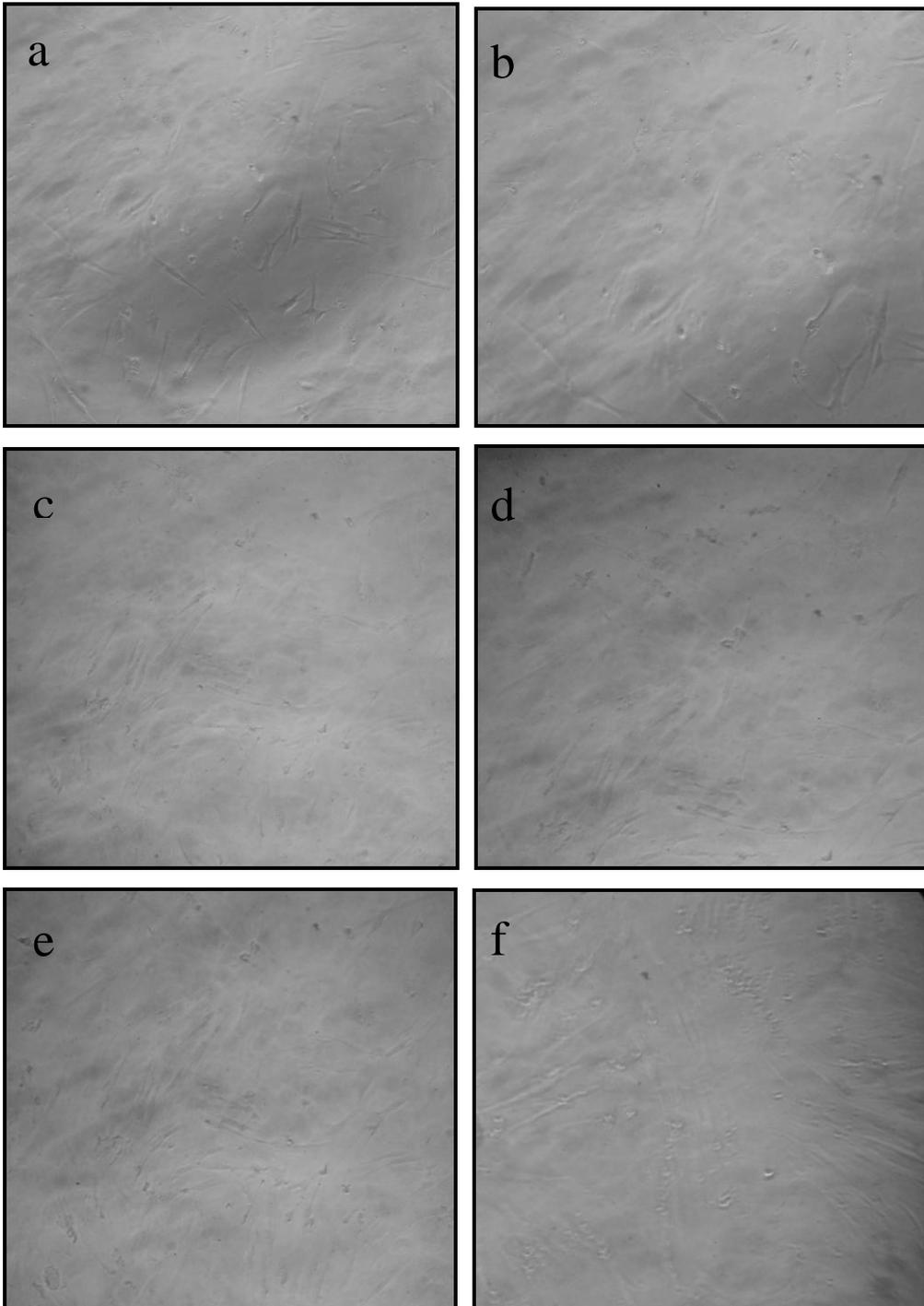


Figura 4 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Cultura inicial (a); após 24h de contato com HBSS a 5°C (b); após incubação em MEM a 37°C por 24h (c), 48h (d), 72h (e) e 120h (f).

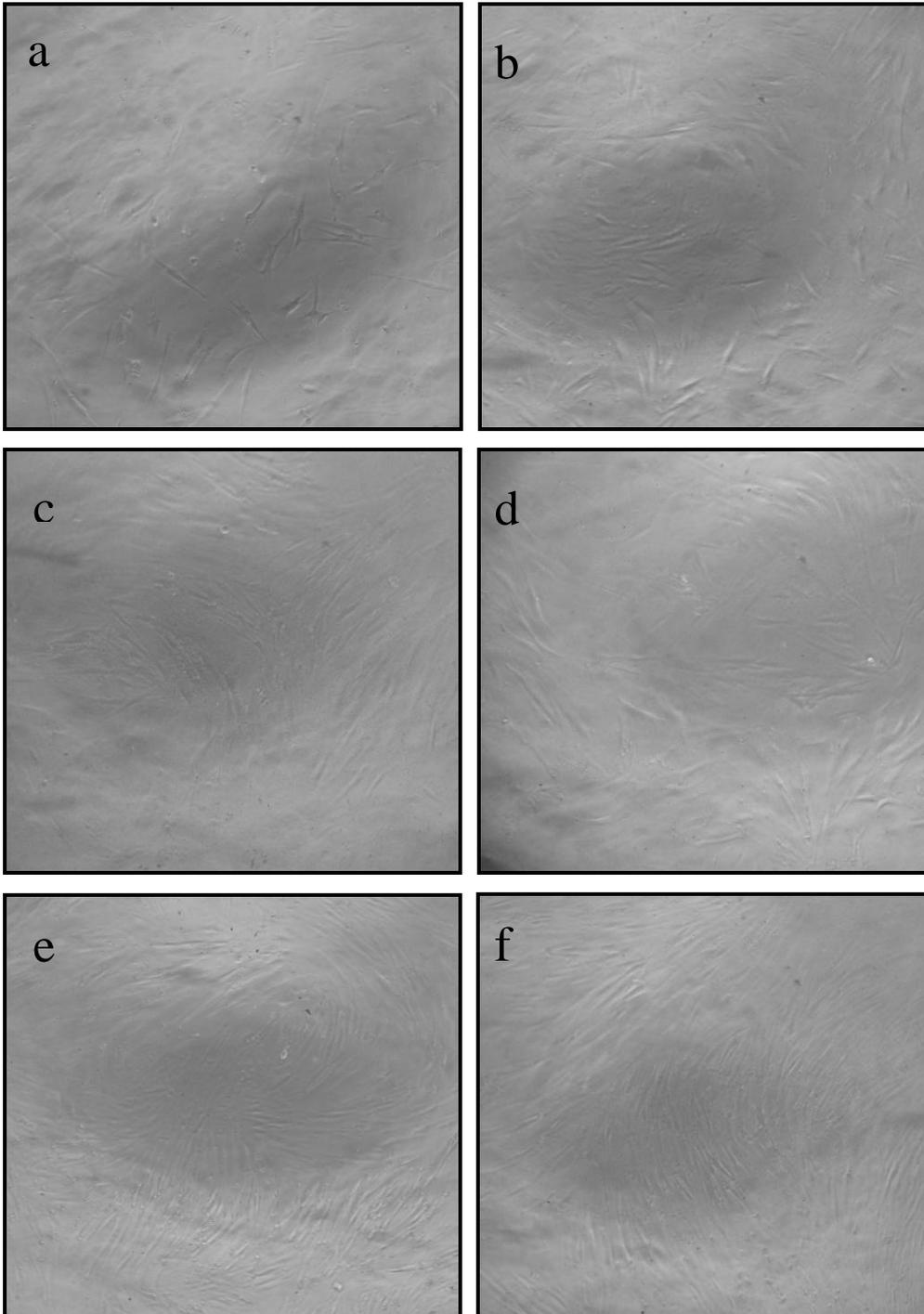


Figura 5 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Cultura inicial (a); após 24h de contato com leite desnatado a 5°C (b); após incubação em MEM a 37°C por 24h (c), 48h (d), 72h (e) e 120h (f).

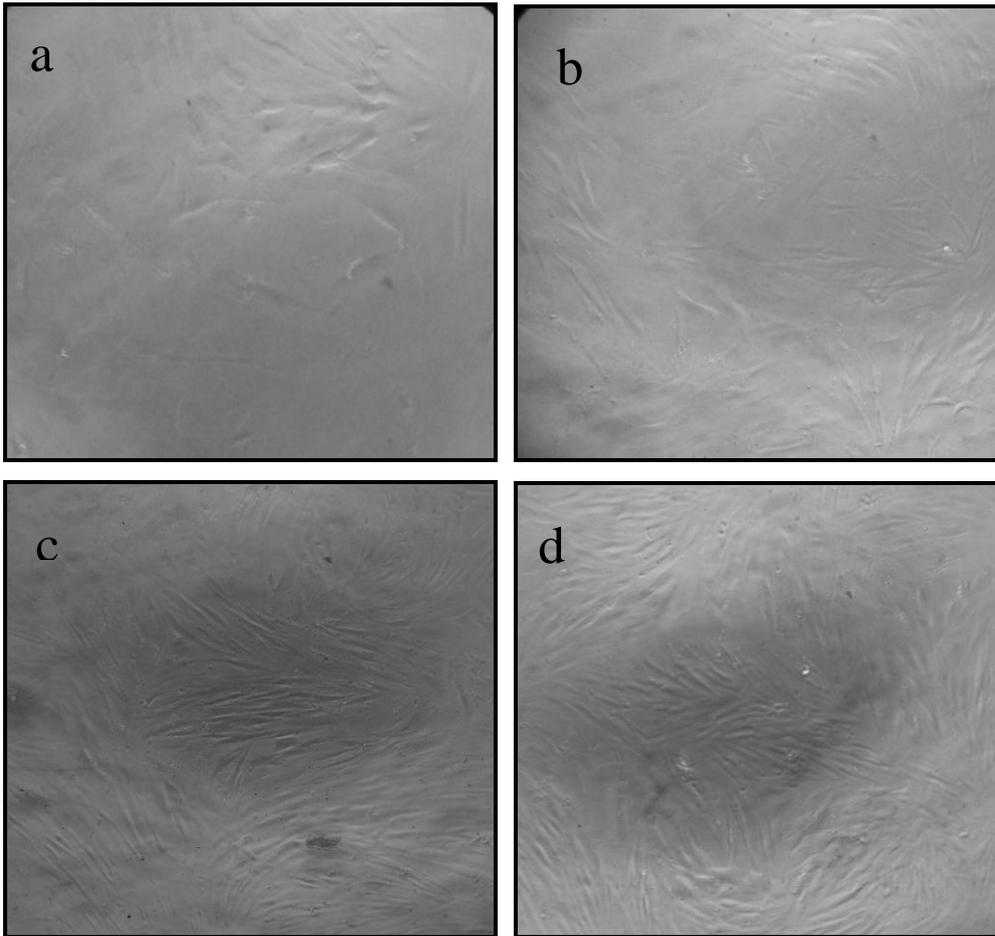


Figura 6 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Após 24h de contato com leite integral a 5°C (a); após incubação em MEM a 37°C por 24 h (b), 72h (c) e 120h (d).

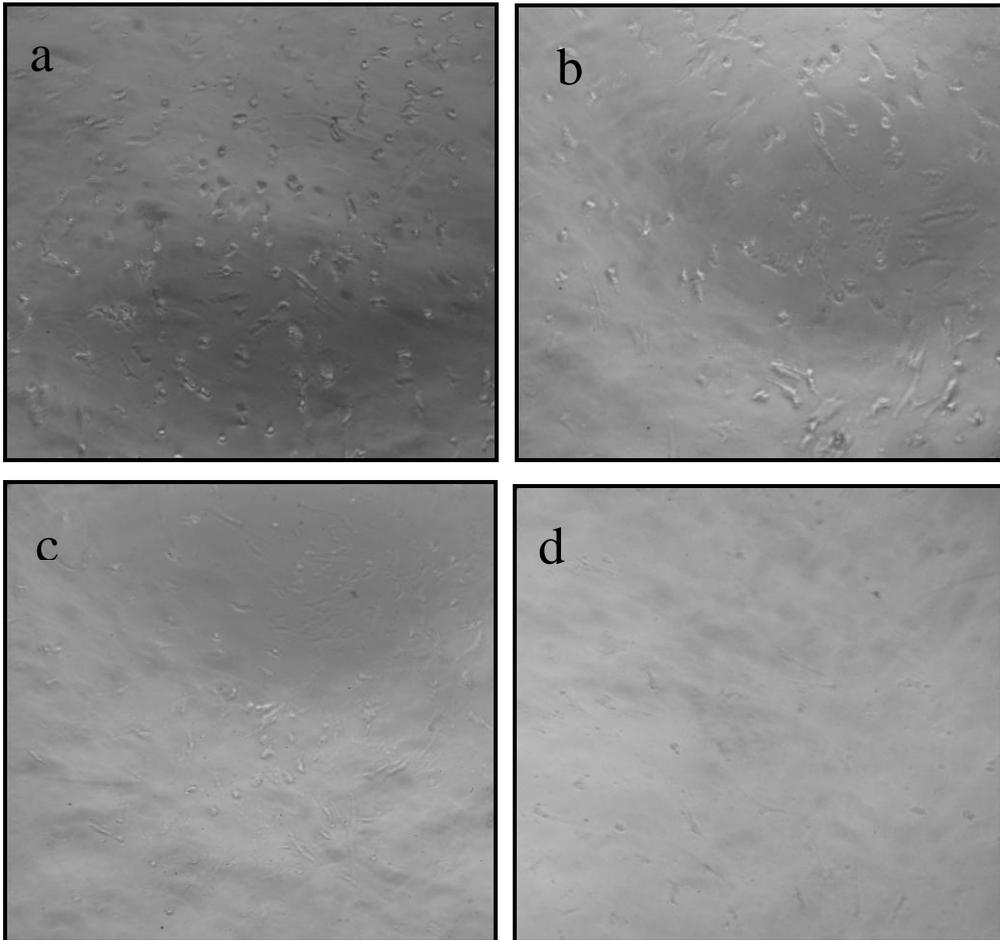


Figura 7 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Após 24h de contato com Save-A-Tooth[®] a 20°C (a); após incubação em MEM a 37°C por 24 h (b), 72h (c) e 120h (d).

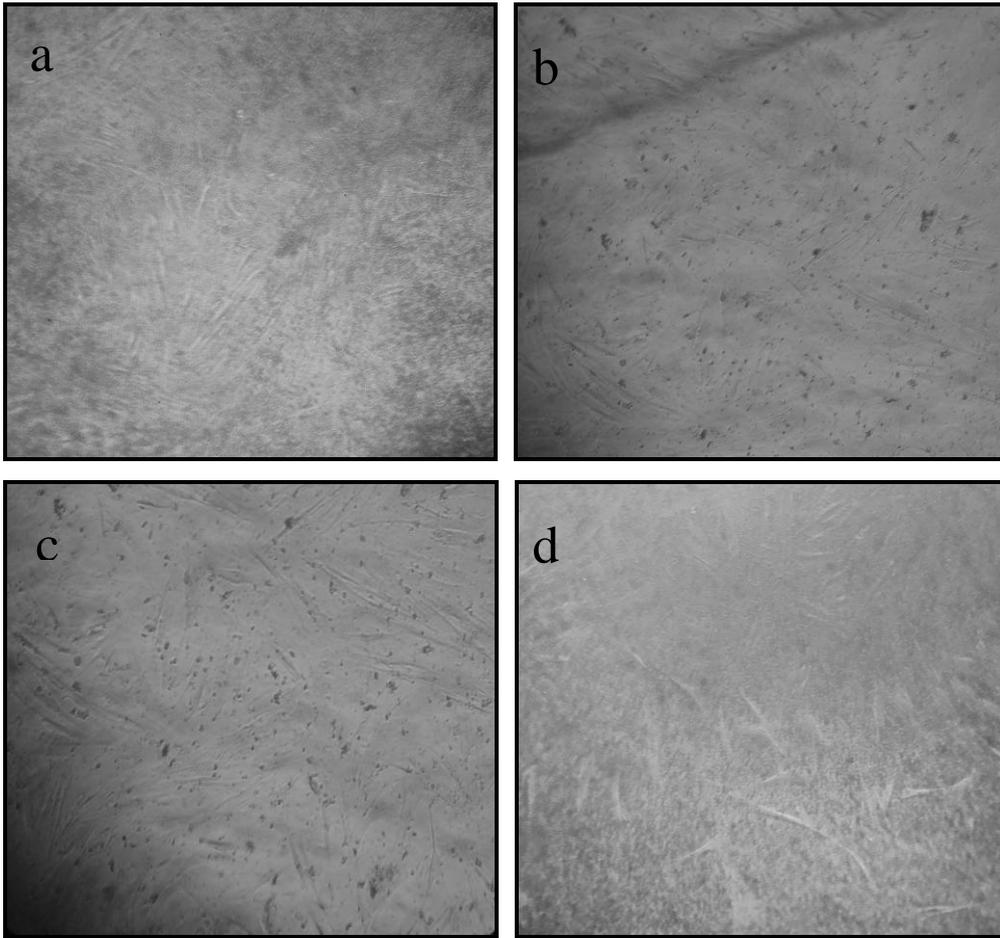


Figura 8 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Após 24h de contato com própolis a 20°C (a); após incubação em MEM a 37°C por 24 h (b), 72h (c) e 120h (d).

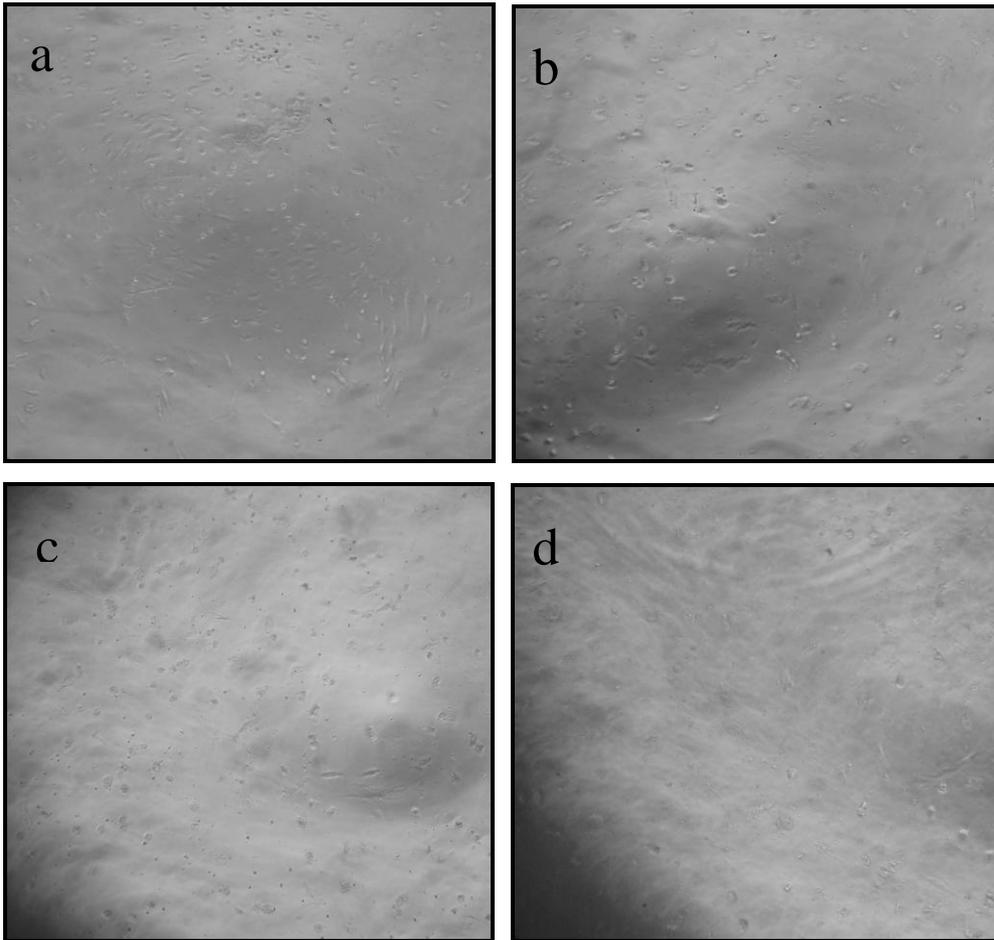


Figura 9 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Após 24h de contato com clara de ovo a 20°C (a); após incubação em MEM a 37°C por 24 h (b), 72h (c) e 120h (d).

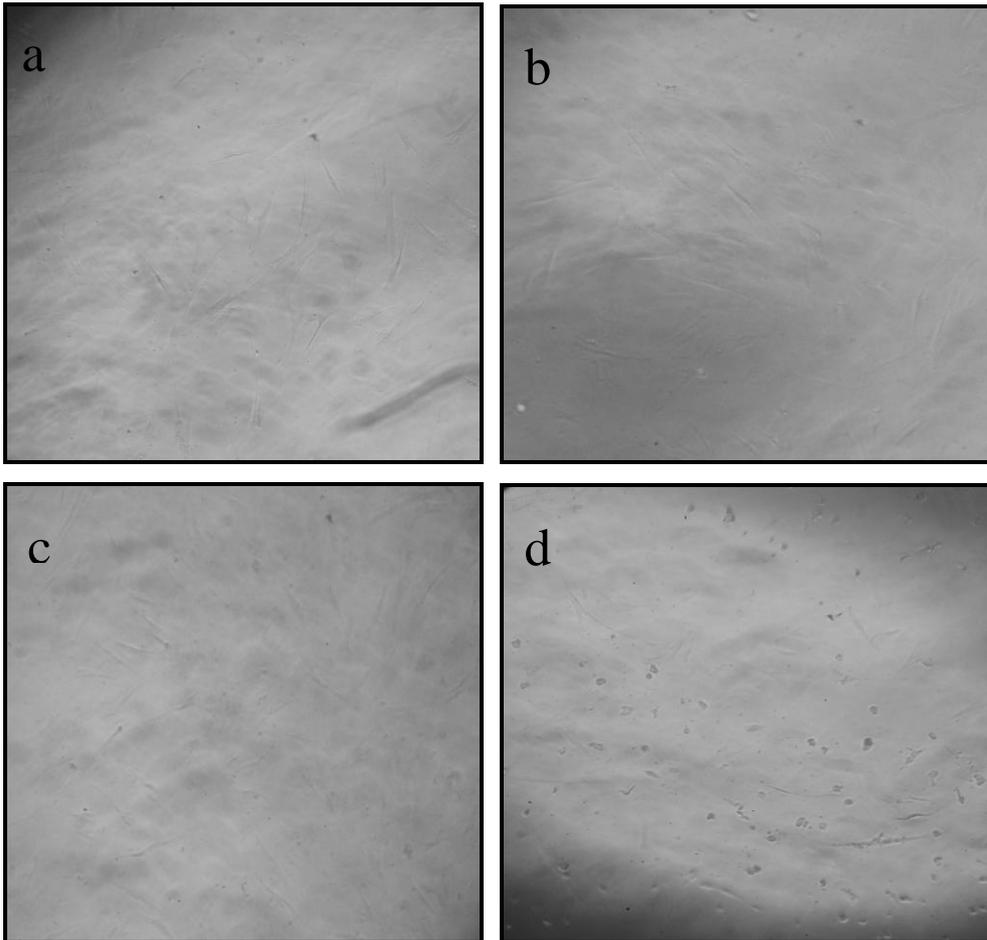


Figura 10 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x). Após 24h de contato com água de coco a 5°C (a); após incubação em MEM a 37°C por 24 h (b), 72h (c) e 120h (d).

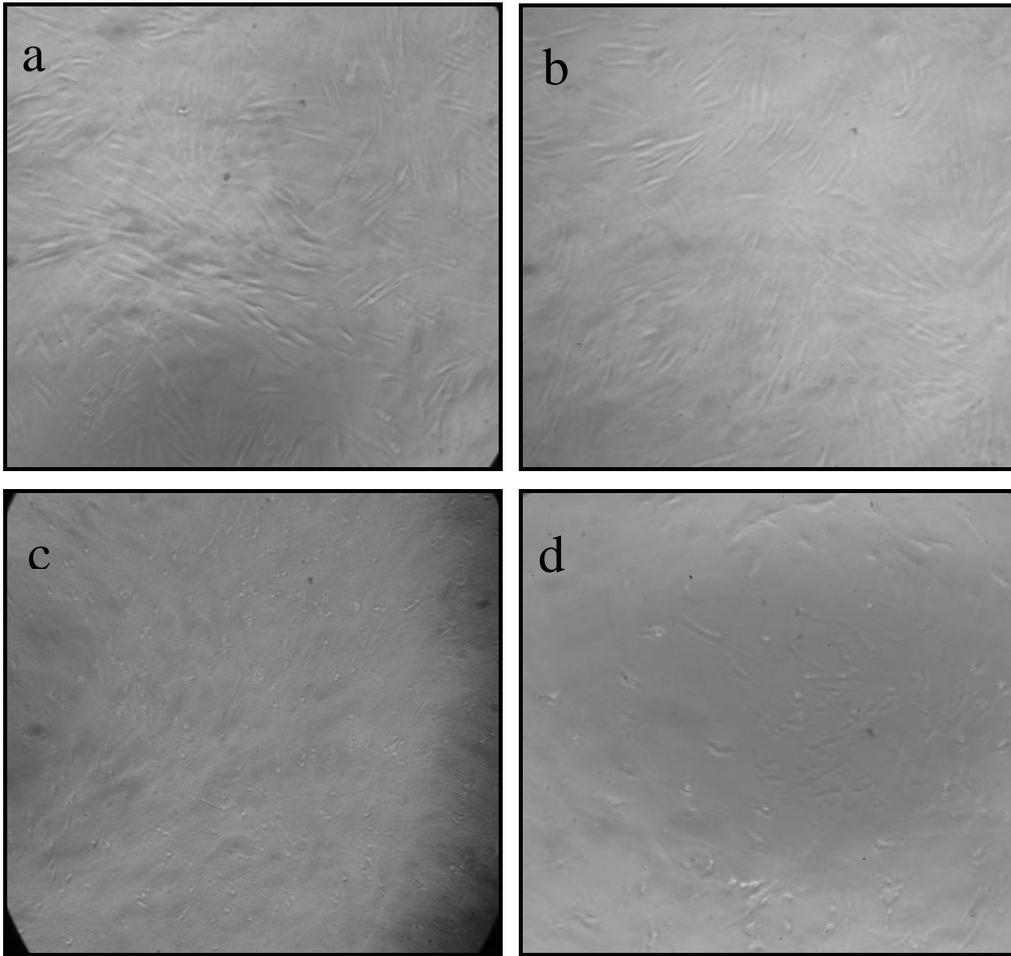


Figura 11 - Imagens de fotomicrografias de FLPH (100x), após 72h de contato, a 20°C, com HBSS (a), HBSS 6M (b), HBSS 12M (c) e Save-A-Tooth® (d).

APÊNDICE B - Análise estatística

Através do programa estatístico Stata 9.0 (Stata CorpLP, College Station, TX, USA), as médias dos valores de absorvância das cavidades de cada grupo 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 experimento a 20 e a 5°C.

APÊNDICE C - Tabelas

Tabela 1 - Resultados da análise comparativa da média dos valores de absorvância obtidos pelo método colorimétrico MTT, após a conservação dos fibroblastos periodontais, a 5 e a 20°C, nos diferentes meios e períodos.

	5° C	20° C	p*
24h			
Água	0.040 (0.009)	0.024 (0.004)	<0.001
Leite não renovado	0.668 (0.077)	0.710 (0.059)	0.083
Leite Renov. 12/12h	0.622 (0.047)	0.651 (0.061)	0.049
48h			
Água	0.031 (0.006)	0.018 (0.003)	<0.001
Leite não renovado	0.631 (0.054)	0.668 (0.059)	0.109
Leite Renov. 12/12h	0.584 (0.059)	0.494 (0.060)	<0.001
Leite Renov. 24/24h	0.610 (0.058)	0.557 (0.092)	0.011
72h			
Água	0.029 (0.006)	0.012 (0.002)	<0.001
Leite não renovado	0.594 (0.049)	0.555 (0.052)	0.003
Leite Renov. 12/12h	0.413 (0.054)	0.247 (0.038)	<0.001
Leite Renov. 24/24h	0.556 (0.066)	0.319 (0.053)	<0.001
Leite Renov. 48/48h	0.667 (0.097)	0.510 (0.047)	<0.001
96h			
Água	0.018 (0.004)	0.012 (0.003)	<0.001
Leite não renovado	0.540 (0.052)	0.379 (0.044)	<0.001
Leite Renov. 12/12h	0.347 (0.068)	0.133 (0.027)	<0.001
Leite Renov. 24/24h	0.459 (0.078)	0.203 (0.041)	<0.001
Leite Renov. 48/48h	0.614 (0.062)	0.381 (0.069)	<0.001
120h			
Água	0.007 (0.002)	0.010 (0.002)	<0.001
Leite não renovado	0.412 (0.054)	0.196 (0.041)	<0.001
Leite Renov. 12/12h	0.277 (0.058)	0.070 (0.015)	<0.001
Leite Renov. 24/24h	0.413 (0.082)	0.071 (0.014)	<0.001
Leite Renov. 48/48h	0.505 (0.090)	0.231 (0.045)	<0.001

* teste de Mann-Whitney

Tabela 2 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 24h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado
Água	.769879 0.000		
Leite não renovado	.162545 0.000	.607333 0.000	
Leite renovado 12/12	.188333 0.000	.581545 0.000	.025788 0.363

Tabela 3 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 48h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado	Leite renovado 12/12
Água	.796061 0.000			
Leite não renovado	.195848 0.000	.600212 0.000		
Leite renovado 12/12	.24303 0.000	.55303 0.000	.047182 0.022	
Leite renovado 24/24	.217424 0.000	.578636 0.000	.021576 0.654	.025606 0.037

Tabela 4 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 72h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado	Leite renovado 12/12	Leite renovado 24/24
Água	.922242 0.000				
Leite não renovado	.357576 0.000	.564667 0.000			
Leite renovado 12/12	.539061 0.000	.383182 0.000	.181485 0.000		
Leite renovado 24/24	.395788 0.000	.526455 0.000	.038212 0.239	.143273 0.000	
Leite renovado 48/48	.285152 0.000	.637091 0.000	.072424 0.000	.253909 0.000	.110636 0.000

Tabela 5 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 96h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado	Leite renovado 12/12	Leite renovado 48/48
Água	.97303 0.000				
Leite não renovado	.451697 0.000	.521333 0.000			
Leite renovado 12/12	.644909 0.000	.328121 0.000	.193212 0.000		
Leite renovado 24/24	.532879 0.000	.440152 0.000	.081182 0.000	.11203 0.000	
Leite renovado 48/48	.377273 0.000	.595758 0.000	.074424 0.000	.267636 0.000	.155606 0.000

Tabela 6 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 120h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado	Leite renovado 12/12	Leite renovado 24/24
Água	1.08448 0.000				
Leite não renovado	.679727 0.000	.404758 0.000			
Leite renovado 12/12	.814273 0.000	.270212 0.000	.134545 0.000		
Leite renovado 24/24	.678667 0.000	.405818 0.000	.001061 1.000	.135606 0.000	
Leite renovado 48/48	.586394 0.000	.498091 0.000	.093333 0.000	.227879 0.000	.092273 0.000

Tabela 7 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 24h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado
Água	.786394 0.000		
Leite não renovado	.100091 0.000	.686303 0.000	
Leite renovado 12/12	.159333 0.000	.627061 0.000	.059242 0.001

Tabela 8 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 48h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado	Leite renovado 12/12
Água	.809303 0.000			
Leite não renovado	.15897 0.000	.650333 0.000		
Leite renovado 12/12	.333333 0.000	.47597 0.000	.174364 0.000	
Leite renovado 24/24	.270485 0.000	.538818 0.000	.111515 0.000	.062848 0.005

Tabela 9 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 72h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado	Leite renovado 12/12	Leite renovado 24/24
Água	.940182 0.000				
Leite não renovado	.396303 0.000	.543879 0.000			
Leite renovado 12/12	.705091 0.000	.235091 0.000	.308788 0.000		
Leite renovado 24/24	.632576 0.000	.307606 0.000	.236273 0.000	.072515 0.000	
Leite renovado 48/48	.441667 0.000	.498515 0.000	.045364 0.000	.263424 0.000	.190909 0.000

Tabela 10 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 96h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado	Leite renovado 12/12	Leite renovado 24/24
Água	.97997 0.000				
Leite não renovado	.61203 0.000	.367939 0.000			
Leite renovado 12/12	.85803 0.000	.121939 0.000	.246 0.000		
Leite renovado 24/24	.788667 0.000	.191303 0.000	.176636 0.000	.069364 0.000	
Leite renovado 48/48	.610515 0.000	.369455 0.000	.001515 1.000	.247515 0.000	.178152 0.000

Tabela 11 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 120h.

	MEM 37	Água	Leite não renovado	Leite renovado 12/12	Leite renovado 24/24
Água	1.08164 0.000				
Leite não renovado	.896121 0.000	.185515 0.000			
Leite renovado 12/12	1.02212 0.000	.059515 0.003	.126 0.000		
Leite renovado 24/24	1.02055 0.000	.061091 0.002	.124424 0.000	.001576 1.000	
Leite renovado 48/48	.861182 0.000	.220455 0.000	.034939 0.267	.160939 0.000	.159364 0.000

Tabela 12 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 3h.

	MEM 37	Água	HBSS	Save	HBSS 6M
Água	.522273 0.000				
HBSS	.027061 0.251	.495212 0.000			
Save	.03997 0.015	.482303 0.000	.012909 0.910		
HBSS 6M	.041 0.011	.481273 0.000	.013939 0.879	.00103 1.000	
HBSS 12M	.04703 0.002	.475242 0.000	.01997 0.604	.007061 0.994	.00603 0.997

Tabela 13 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 6h.

	MEM 37	Água	HBSS	Save	HBSS 6M
Água	.667485 0.000				
HBSS	.120939 0.000	.546545 0.000			
Save	.324333 0.000	.343152 0.000	.203394 0.000		
HBSS 6M	.180576 0.000	.486909 0.000	.059636 0.000	.143758 0.000	
HBSS 12M	.169424 0.000	.498061 0.000	.048485 0.006	.154909 0.000	.011152 0.970

Tabela 14 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 24h.

	MEM 37	Água	HBSS	Save	HBSS 6M
Água	.786394 0.000				
HBSS	.246727 0.000	.539667 0.000			
Save	.757909 0.000	.028485 0.218	.511182 0.000		
HBSS 6M	.338273 0.000	.448121 0.000	.091545 0.000	.419636 0.000	
HBSS 12M	.330182 0.000	.456212 0.000	.083455 0.000	.427727 0.000	.008091 0.989

Tabela 15 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 48h.

	MEM 37	Água	HBSS	Save	HBSS 6M
Água	.809303 0.000				
HBSS	.322273 0.000	.48703 0.000			
Save	.777758 0.000	.031545 0.104	.455485 0.000		
HBSS 6M	.400303 0.000	.409 0.000	.07803 0.000	.377455 0.000	
HBSS 12M	.397061 0.000	.412242 0.000	.074788 0.000	.380697 0.000	.003242 1.000

Tabela 16 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 72h.

	MEM 37	Água	HBSS	Save	HBSS 6M
Água	.940182 0.000				
HBSS	.449909 0.000	.490273 0.000			
Save	.900879 0.000	.039303 0.013	.45097 0.000		
HBSS 6M	.538788 0.000	.401394 0.000	.088879 0.000	.362091 0.000	
HBSS 12M	.751152 0.000	.18903 0.000	.301242 0.000	.149727 0.000	.212364 0.000

Tabela 17 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 96h.

	MEM 37	Água	HBSS	Save	HBSS 6M
Água	.97997 0.000				
HBSS	.502909 0.000	.477061 0.000			
Save	.951697 0.000	.028273 0.323	.448788 0.000		
HBSS 6M	.600879 0.000	.379091 0.000	.09797 0.000	.350818 0.000	
HBSS 12M	.84703 0.000	.132939 0.000	.344121 0.000	.104667 0.000	.246152 0.000

Tabela 18 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 120h.

	MEM 37	Água	HBSS	Save	HBSS 6M
Água	1.08164 0.000				
HBSS	.671273 0.000	.410364 0.000			
Save	1.05812 0.000	.023515 0.833	.386848 0.000		
HBSS 6M	.749182 0.000	.332455 0.000	.077909 0.001	.308939 0.000	
HBSS 12M	.984909 0.000	.096727 0.000	.313636 0.000	.073212 0.000	.235727 0.000

Tabela 19 - Resultados da análise comparativa das médias dos valores de absorvância obtidos pelo método colorimétrico MTT, após a conservação dos fibroblastos periodontais, a 5 e a 20°C, nos diferentes meios e períodos.

	5° C	20° C	p*
3h			
Água	0.091 (0.015)	0.046 (0.007)	<0.001
Leite Desnatado	0.576 (0.068)	0.530 (0.078)	0.078
Leite Integral	0.565 (0.026)	0.520 (0.057)	<0.001
HBSS	0.494 (0.063)	0.527 (0.069)	0.038
Save-A-tooth®	0.530 (0.039)	0.476 (0.059)	<0.001
Água de coco	0.522 (0.045)	0.483 (0.054)	0.004
Própolis	0.483 (0.033)	0.440 (0.044)	<0.001
Clara de ovo	0.522 (0.028)	0.513 (0.050)	0.457
6h			
Água	0.083 (0.012)	0.028 (0.005)	<0.001
Leite Desnatado	0.619 (0.046)	0.638 (0.044)	0.133
Leite Integral	0.603 (0.068)	0.582 (0.053)	0.191
HBSS	0.583 (0.064)	0.628 (0.047)	<0.001
Save-A-tooth®	0.432 (0.043)	0.371 (0.052)	<0.001
Água de coco	0.521 (0.084)	0.457 (0.099)	0.006
Própolis	0.380 (0.029)	0.408 (0.034)	<0.001
Clara de ovo	0.300 (0.058)	0.284 (0.038)	0.442
24h			
Água	0.040 (0.009)	0.024 (0.004)	<0.001
Leite Desnatado	0.644 (0.074)	0.667 (0.056)	0.121
Leite Integral	0.629 (0.057)	0.634 (0.074)	0.969
HBSS	0.372 (0.040)	0.572 (0.049)	<0.001
Save-A-tooth®	0.269 (0.058)	0.045 (0.009)	<0.001
Água de coco	0.282 (0.056)	0.281 (0.056)	0.653
Própolis	0.365 (0.028)	0.400 (0.041)	<0.001
Clara de ovo	0.083 (0.015)	0.076 (0.014)	0.133
48h			
Água	0.031 (0.006)	0.018 (0.003)	<0.001
Leite Desnatado	0.627 (0.057)	0.668 (0.059)	0.009
Leite Integral	0.620 (0.063)	0.571 (0.071)	0.004
HBSS	0.336 (0.037)	0.492 (0.031)	<0.001
Save-A-tooth®	0.196 (0.039)	0.048 (0.009)	<0.001
Água de coco	0.161 (0.033)	0.267 (0.050)	0.773
Própolis	0.360 (0.046)	0.358 (0.046)	<0.001
Clara de ovo	0.065 (0.011)	0.047 (0.009)	<0.001
72h			
Água	0.029 (0.006)	0.011 (0.002)	<0.001
Leite Desnatado	0.588 (0.055)	0.598 (0.060)	0.379
Leite Integral	0.592 (0.092)	0.418 (0.067)	<0.001
HBSS	0.311 (0.034)	0.475 (0.056)	<0.001
Save-A-tooth®	0.100 (0.017)	0.046 (0.010)	<0.001
Água de coco	0.105 (0.018)	0.137 (0.031)	<0.001
Própolis	0.349 (0.050)	0.375 (0.064)	0.0568
Clara de ovo	0.061 (0.012)	0.024 (0.006)	<0.001
96h			
Água	0.018 (0.004)	0.012 (0.003)	<0.001
Leite Desnatado	0.560 (0.069)	0.422 (0.046)	<0.001
Leite integral	0.480 (0.055)	0.125 (0.020)	<0.001
HBSS	0.257 (0.028)	0.468 (0.076)	<0.001
Save-A-tooth®	0.080 (0.016)	0.042 (0.010)	<0.001

Água de coco	0.101 (0.022)	0.077 (0.015)	<0.001
Própolis	0.333 (0.055)	0.355 (0.066)	0.096
Clara de ovo	0.063 (0.014)	0.026 (0.006)	<0.001
120h			
Água	0.007 (0.002)	0.010 (0.002)	<0.001
Leite Desnatado	0.437 (0.061)	0.237 (0.047)	<0.001
Leite integral	0.372 (0.074)	0.066 (0.015)	<0.001
HBSS	0.222 (0.036)	0.416 (0.063)	<0.001
Save-A-tooth®	0.062 (0.012)	0.040 (0.010)	<0.001
Água de coco	0.117 (0.017)	0.054 (0.011)	<0.001
Própolis	0.318 (0.047)	0.282 (0.053)	<0.001
Clara de ovo	0.021 (0.004)	0.014 (0.003)	<0.001

* teste de Mann-Whitney

Tabela 20 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 3h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.476576 0.000								
L.D.	.007758 1.000	.484333 0.000							
L.I.	.00297 1.000	.473606 0.000	.010727 0.999						
HBSS	.073424 0.000	.403152 0.000	.081182 0.000	.070455 0.000					
Save	.037727 0.016	.438848 0.000	.045485 0.000	.034758 0.019	.035697 0.175				
Coco	.045667 0.015	.430909 0.000	.053424 0.001	.042697 0.035	.27758 0.559	.007939 1.000			
Propo	.085 0.000	.391576 0.000	.092758 0.000	.08203 0.000	.011576 0.998	.047273 0.089	.039333 0.081		
Clara	.046091 0.013	.430485 0.000	.053848 0.001	.043121 0.031	.027333 0.583	.008364 1.000	.000424 1.000	.038909 0.089	
Propi	.540758 0.000	.064182 0.067	.548515 0.000	.537788 0.000	.467333 0.000	.50303 0.000	.495091 0.000	.455758 0.000	.494667 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 21 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 6h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.611848 0.000								
L.D.	.075667 1.000	.536182 0.000							
L.I.	.092212 0.000	.519636 0.000	.016545 0.995						
HBSS	.112273 0.000	.499576 0.000	.036606 0.493	.020061 0.980					
Save	.26303 0.000	.348818 0.000	.187364 0.000	.170818 0.000	.150758 0.000				
Coco	.174394 0.000	.437455 0.000	.098727 0.000	.082182 0.000	.062121 0.005	.088636 0.000			
Propo	.314576 0.000	.297273 0.000	.238909 0.000	.222364 0.000	.202303 0.000	.051545 0.058	.140182 0.000		
Clara	.395424 0.000	.216424 0.000	.319758 0.000	.303212 0.000	.283152 0.000	.132394 0.000	.22103 0.000	.080848 0.000	
Propi	.652485 0.000	.040636 0.324	.576818 0.000	.560273 0.000	.540212 0.000	.389455 0.000	.478091 0.000	.337909 0.000	.257061 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 22 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 24h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.769879 0.000								
L.D.	.166273 0.000	.603606 0.000							
L.I.	.181667 0.000	.588212 0.000	.015394 0.995						
HBSS	.438152 0.000	.331727 0.000	.271879 0.000	.256485 0.000					
Save	.541727 0.000	.228152 0.000	.375455 0.000	.360061 0.000	.103576 0.000				
Coco	.528303 0.000	.241576 0.000	.36203 0.000	.346636 0.000	.090152 0.000	.013424 0.998			
Propo	.445758 0.000	.324121 0.000	.279485 0.000	.264091 0.000	.007606 1.000	.09597 0.000	.082545 0.000		
Clara	.727636 0.000	.042242 0.186	.561364 0.000	.54597 0.000	.289485 0.000	.185909 0.000	.199333 0.000	.281879 0.000	
Propi	.771455 0.000	.001576 1.000	.605182 0.000	.589788 0.000	.333303 0.000	.229727 0.000	.243152 0.000	.325697 0.000	.043818 0.144

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 23 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 48h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.796061 0.000								
L.D.	.199636 0.000	.596424 0.000							
L.I.	.207121 0.000	.588939 0.000	.007485 1.000						
HBSS	.490788 0.000	.305273 0.000	.291152 0.000	.283667 0.000					
Save	.631515 0.000	.164545 0.000	.431879 0.000	.424394 0.000	.140727 0.000				
Coco	.666485 0.000	.129576 0.000	.466848 0.000	.459364 0.000	.175697 0.000	.03497 0.328			
Propo	.467273 0.000	.328788 0.000	.267636 0.000	.260152 0.000	.023515 0.861	.164242 0.000	.199212 0.000		
Clara	.761909 0.000	.034152 0.366	.562273 0.000	.554788 0.000	.271121 0.000	.130394 0.000	.095424 0.000	.294636 0.000	
Propi	.790909 0.000	.005152 1.000	.591273 0.000	.583788 0.000	.300121 0.000	.159394 0.000	.124424 0.000	.323636 0.000	.029 0.626

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 24 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 72h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.922242 0.000								
L.D.	.363515 0.000	.558727 0.000							
L.I.	.359636 0.000	.562606 0.000	.003879 1.000						
HBSS	.640273 0.000	.28197 0.000	.276758 0.000	.280636 0.000					
Save	.851636 0.000	.070606 0.000	.488121 0.000	.492 0.000	.211364 0.000				
Coco	.846848 0.000	.075394 0.000	.483333 0.000	.487212 0.000	.206576 0.000	.004788 1.000			
Propo	.603152 0.000	.319091 0.000	.239636 0.000	.243515 0.000	.037121 0.182	.248485 0.000	.243697 0.000		
Clara	.890606 0.000	.031636 0.420	.527091 0.000	.53097 0.000	.250333 0.000	.03897 0.128	.043758 0.043	.287455 0.000	
Propi	.922424 0.000	.000182 1.000	.558909 0.000	.562788 0.000	.282152 0.000	.070788 0.000	.075576 0.000	.319273 0.000	.031818 0.411

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 25 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 96h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.97303 0.000								
L.D.	.431485 0.000	.541545 0.000							
L.I.	.511061 0.000	.46197 0.000	.079576 0.000						
HBSS	.734182 0.000	.238848 0.000	.302697 0.000	.223121 0.000					
Save	.911152 0.000	.061879 0.000	.479667 0.000	.400091 0.000	.17697 0.000				
Coco	.890939 0.000	.082091 0.000	.459455 0.000	.379879 0.000	.156758 0.000	.020212 0.890			
Propo	.658788 0.000	.314242 0.000	.227303 0.000	.147727 0.000	.075394 0.998	.252364 0.000	.232152 0.000		
Clara	.928909 0.000	.044121 0.078	.497424 0.000	.417848 0.000	.194727 0.000	.017758 0.950	.03797 0.093	.270121 0.000	
Propi	.965818 0.000	.007212 1.000	.534333 0.000	.454758 0.000	.4231636 0.000	.054667 0.000	.074879 0.000	.30703 0.000	.036909 0.118

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 26 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 120h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	1.08448 0.000								
L.D.	.654697 0.000	.429788 0.000							
L.I.	.719212 0.000	.365273 0.000	.064515 0.004						
HBSS	.869242 0.000	.215242 0.000	.214545 0.000	.15003 0.000					
Save	1.02921 0.000	.055273 0.036	.374515 0.000	.31 0.000	.15997 0.000				
Coco	.974667 0.000	.109818 0.000	.31997 0.000	.255455 0.000	.105424 0.000	.054545 0.042			
Propo	.774091 0.000	.310394 0.000	.119394 0.000	.054879 0.039	.095152 0.000	.255121 0.000	.200576 0.000		
Clara	1.07052 0.000	.01397 0.999	.415818 0.000	.351303 0.000	.201273 0.000	.041303 0.340	.095848 0.000	.296424 0.000	
Propi	1.07076 0.000	.0613727 0.999	.416061 0.000	.351545 0.000	.201515 0.000	.041545 0.331	.096091 0.000	.296667 0.000	.000242 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 27 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 3h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.522273 0.000								
L.D.	.037727 0.435	.484545 0.000							
L.I.	.047697 0.112	.474576 0.000	.00997 1.000						
HBSS	.040667 0.314	.0481606 0.000	.002939 1.000	.00703 1.000					
Save	.091727 0.000	.430545 0.000	.054 0.133	.04403 0.201	.051061 0.060				
Coco	.084909 0.000	.437364 0.000	.047182 0.122	.037212 0.457	.044242 0.194	.006818 1.000			
Propo	.127364 0.000	.394909 0.000	.089636 0.133	.079667 0.162	.086697 0.089	.035636 0.528	.042455 0.250		
Clara	.054727 0.028	.467545 0.000	.017 0.994	.00703 1.000	.014061 0.999	.037 0.467	.030182 0.759	.072636 0.245	
Propi	.540091 0.000	.017818 0.991	.502364 0.000	.492394 0.000	.499424 0.000	.448364 0.000	.455182 0.000	.412727 0.000	.485364 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 28 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 6h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.667485 0.000								
L.D.	.057333 0.009	.610152 0.000							
L.I.	.113424 0.000	.554061 0.000	.056091 0.073						
HBSS	.067303 0.000	.600182 0.000	.00997 1.000	.046121 0.110					
Save	.324333 0.000	.343152 0.000	.267 0.000	.210909 0.000	.25703 0.000				
Coco	.23797 0.015	.429515 0.000	.180636 0.000	.124545 0.000	.170667 0.000	.086364 0.000			
Propo	.287394 0.000	.380091 0.000	.230061 0.000	.17397 0.000	.220091 0.000	.036939 0.412	.049424 0.039		
Clara	.411424 0.000	.256061 0.000	.354091 0.000	.298 0.000	.344121 0.000	.087091 0.000	.173455 0.000	.12403 0.000	
Propi	.666939 0.000	.000545 1.000	.609606 0.000	.553515 0.000	.599636 0.000	.342606 0.000	.428971 0.000	.379545 0.000	.255515 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 29 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 24h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.786394 0.000								
L.D.	.143455 0.000	.642939 0.000							
L.I.	.176333 0.000	.610061 0.000	.032879 0.509						
HBSS	.237909 0.000	.548485 0.000	.094455 0.000	.061576 0.001					
Save	.764939 0.000	.021455 0.939	.621485 0.000	.588606 0.000	.52703 0.000				
Coco	.528818 0.000	.257576 0.000	.385364 0.000	.352485 0.000	.290909 0.000	.236121 0.000			
Propo	.410182 0.000	.376212 0.000	.266727 0.000	.233848 0.000	.172273 0.000	.354758 0.000	.0118636 0.000		
Clara	.734485 0.013	.051909 0.000	.59103 0.000	.558152 0.000	.496576 0.000	.030455 0.627	.205667 0.000	.324303 0.000	
Propi	.787303 0.000	.000909 1.000	.643848 0.000	.61097 0.000	.549394 0.000	.022364 0.921	.258485 0.000	.377121 0.000	.052818 0.013

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 30 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 48h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.809303 0.000								
L.D.	.15897 0.000	.650333 0.000							
L.I.	.256485 0.000	.552818 0.000	.097515 0.000						
HBSS	.334636 0.000	.474667 0.000	.175667 0.000	.078152 0.000					
Save	.779576 0.000	.029727 0.614	.620606 0.000	.523091 0.000	.444939 0.000				
Coco	.560182 0.000	.249121 0.000	.401212 0.000	.303697 0.000	.225545 0.000	.219394 0.000			
Propo	.469212 0.000	.340091 0.000	.310242 0.000	.212727 0.000	.134576 0.000	.310364 0.000	.09097 0.000		
Clara	.780424 0.000	.028879 0.655	.621455 0.000	.523939 0.000	.445788 0.000	.000848 1.000	.220242 0.000	.311212 0.000	
Propi	.805424 0.000	.003879 1.000	.646455 0.000	.548939 0.000	.470788 0.000	.025848 0.791	.245242 0.000	.336212 0.000	.025 0.823

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 31 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 72h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.940455 0.000								
L.D.	.353909 0.000	.586545 0.000							
L.I.	.534152 0.000	.406303 0.000	.180242 0.000						
HBSS	.477121 0.000	.463333 0.000	.123212 0.000	.05703 0.001					
Save	.906091 0.000	.034364 0.306	.552182 0.000	.371939 0.000	.42897 0.000				
Coco	.814727 0.000	.125727 0.000	.460818 0.000	.280576 0.000	.337606 0.000	.091364 0.000			
Propo	.576909 0.000	.363545 0.000	.223 0.000	.042758 0.002	.099788 0.000	.329182 0.000	.237818 0.000		
Clara	.927364 0.000	.013091 0.997	.573455 0.000	.393212 0.000	.450242 0.000	.021273 0.905	.112636 0.000	.350455 0.000	
Propi	.928545 0.000	.011909 0.998	.574636 0.000	.394394 0.000	.451424 0.000	.022455 0.871	.113818 0.000	.351636 0.000	.001182 0.060

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 32 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 96h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.979879 0.000								
L.D.	.56903 0.000	.410848 0.000							
L.I.	.866212 0.000	.113667 0.000	.297182 0.000						
HBSS	.523485 0.000	.456394 0.000	.045545 0.014	.342727 0.000					
Save	.949182 0.000	.030697 0.385	.380152 0.000	.08297 0.000	.425697 0.000				
Coco	.914424 0.000	.065455 0.000	.345394 0.000	.048212 0.006	.390939 0.000	.034758 0.200			
Propo	.0636818 0.000	.343061 0.000	.067788 0.000	.229394 0.000	.113333 0.000	.312364 0.000	.277606 0.000		
Clara	.965879 0.000	.014 0.991	.396848 0.000	.099667 0.000	.442394 0.000	.016697 0.969	.051455 0.002	.329061 0.000	
Propi	.96497 0.000	.014909 0.986	.395939 0.000	.098758 0.000	.441485 0.000	.015788 0.979	.050545 0.003	.328152 0.000	.000909 1.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 33 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 120h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	1.08164 0.000								
L.D.	.855061 0.000	.4226576 0.000							
L.I.	1.02533 0.000	.056303 0.011	.170273 0.000						
HBSS	.675636 0.000	.406 0.000	.179424 0.000	.349697 0.000					
Save	1.05218 0.000	.029455 0.742	.197121 0.000	.026848 0.837	.376545 0.000				
Coco	1.03764 0.000	.044 0.154	.182576 0.000	.012303 0.999	.362 0.000	.014545 0.997			
Propo	.809273 0.000	.272364 0.000	.045788 0.114	.216061 0.000	.133636 0.000	.242909 0.000	.228364 0.000		
Clara	1.07806 0.000	.003576 1.000	.223 0.000	.052727 0.027	.402424 0.000	.025879 0.866	.040424 0.265	.268788 0.000	
Propi	1.07197 0.000	.009667 1.000	.216909 0.000	.046636 0.097	.396333 0.000	.019788 0.975	.034333 0.525	.262697 0.000	.006091 1.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Propi: propilenoglicol

Tabela 34 - Resultados da análise comparativa das médias dos valores de absorvância obtidos pelo ensaio colorimétrico MTT, representativas da viabilidade (0h) e da capacidade de proliferação (24-120h) de fibroblastos periodontais mantidos, a 5 e a 20°C, por 24h, nos diferentes meios.

	5° C	20° C	p*
0h			
Água	0.037 (0.007)	0.023 (0.004)	<0.001
Leite Desnatado	0.403 (0.038)	0.339 (0.051)	<0.001
Leite Integral	0.384 (0.052)	0.324 (0.056)	<0.001
HBSS	0.275 (0.043)	0.285 (0.034)	0.195
Save-A-tooth®	0.092 (0.019)	0.062 (0.012)	<0.001
Água de coco	0.221 (0.035)	0.072 (0.015)	<0.001
Própolis	0.342 (0.038)	0.228 (0.032)	<0.001
Clara de ovo	0.087 (0.015)	0.061 (0.013)	<0.001
24h			
Água	0.049 (0.009)	0.030 (0.006)	<0.001
Leite Desnatado	0.501 (0.072)	0.472 (0.072)	0.110
Leite Integral	0.512 (0.103)	0.489 (0.069)	0.290
HBSS	0.375 (0.068)	0.484 (0.051)	<0.001
Save-A-tooth®	0.091 (0.018)	0.075 (0.015)	<0.001
Água de coco	0.140 (0.028)	0.057 (0.011)	<0.001
Própolis	0.231 (0.045)	0.240 (0.044)	0.419
Clara de ovo	0.058 (0.012)	0.034 (0.007)	<0.001
48h			
Água	0.054 (0.011)	0.044 (0.010)	<0.001
Leite Desnatado	0.626 (0.081)	0.598 (0.046)	0.182
Leite Integral	0.615 (0.063)	0.612 (0.043)	0.667
HBSS	0.399 (0.075)	0.605 (0.064)	<0.001
Save-A-tooth®	0.093 (0.019)	0.084 (0.014)	0.067
Água de coco	0.087 (0.017)	0.053 (0.011)	<0.001
Própolis	0.212 (0.042)	0.209 (0.038)	0.837
Clara de ovo	0.040 (0.008)	0.035 (0.007)	0.079
72h			
Água	0.066 (0.012)	0.048 (0.009)	<0.001
Leite Desnatado	0.739 (0.100)	0.676 (0.094)	0.064
Leite Integral	0.717 (0.108)	0.671 (0.058)	0.243
HBSS	0.507 (0.081)	0.758 (0.089)	<0.001
Save-A-tooth®	0.079 (0.013)	0.079 (0.016)	0.734
Água de coco	0.075 (0.015)	0.030 (0.008)	<0.001
Própolis	0.182 (0.022)	0.248 (0.035)	<0.001
Clara de ovo	0.033 (0.007)	0.036 (0.009)	0.133
96h			
Água	0.047 (0.010)	0.020 (0.004)	<0.001
Leite Desnatado	0.757 (0.099)	0.707 (0.109)	0.049
Leite Integral	0.735 (0.082)	0.701 (0.035)	0.051
HBSS	0.515 (0.109)	0.808 (0.129)	<0.001
Save-A-tooth®	0.067 (0.014)	0.064 (0.013)	0.169
Água de coco	0.085 (0.017)	0.024 (0.005)	<0.001
Própolis	0.200 (0.037)	0.223 (0.035)	0.082
Clara de ovo	0.032 (0.006)	0.032 (0.007)	0.918
120h			
Água	0.024 (0.004)	0.017 (0.004)	<0.001
Leite Desnatado	0.761 (0.048)	0.721 (0.076)	0.073
Leite integral	0.747 (0.081)	0.727 (0.060)	0.373

HBSS	0.517 (0.087)	0.850 (0.120)	<0.001
Save-A-tooth®	0.066 (0.013)	0.053 (0.012)	<0.001
Água de coco	0.058 (0.012)	0.022 (0.005)	<0.001
Própolis	0.159 (0.031)	0.232 (0.031)	<0.001
Clara de ovo	0.028 (0.006)	0.014 (0.003)	<0.001

* teste de Mann-Whitney

Tabela 35 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 5°C, nos diferentes meios pelo período de 24h (0h).

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.455909 0.000								
L.D.	.090576 0.000	.365333 0.000							
L.I.	.109606 0.000	.346303 0.000	.01903 0.871						
HBSS	.218424 0.000	.237485 0.000	.127848 0.000	.108818 0.000					
Save	.400848 0.000	.055061 0.000	.310273 0.000	.291242 0.019	.182424 0.000				
Coco	.272364 0.000	.183545 0.000	.181788 0.000	.162758 0.000	.053939 0.000	.128485 0.000			
Propo	.151121 0.000	.304788 0.000	.060545 0.000	.041515 0.022	.067303 0.000	.249727 0.000	.121242 0.000		
Clara	.40597 0.000	.049939 0.001	.315394 0.000	.296364 0.000	.187545 0.000	.005121 1.000	.133606 0.000	.254848 0.000	

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 36 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 5°C, e incubados em MEM a 37°C por 24h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.620364 0.000								
L.D.	.168273 0.000	.452091 0.000							
L.I.	.157848 0.000	.462515 0.000	.010424 1.000						
HBSS	.294455 0.000	.325909 0.000	.126182 0.000	.136606 0.000					
Save	.578818 0.000	.011545 0.342	.410545 0.000	.42097 0.000	.284364 0.000				
Coco	.530061 0.000	.090303 0.000	.361788 0.000	.372212 0.000	.235606 0.000	.048758 0.137			
Propo	.438818 0.000	.181545 0.000	.270545 0.000	.28097 0.000	.144364 0.000	.14 0.000	.091242 0.000		
Clara	.611576 0.000	.008788 1.000	.443303 0.000	.453727 0.000	.317121 0.000	.032758 0.689	.081515 0.000	.172758 0.000	

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 37 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 5°C, e incubados em MEM a 37°C por 48h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.855758 0.000								
L.D.	.283939 0.000	.571818 0.000							
L.I.	.295333 0.000	.560424 0.000	.011394 0.999						
HBSS	.511152 0.000	.344606 0.000	.227212 0.000	.215818 0.000					
Save	.817091 0.000	.038667 0.233	.533152 0.000	.521758 0.000	.305939 0.000				
Coco	.823303 0.000	.032455 0.492	.539364 0.000	.52797 0.000	.312152 0.000	.006212 1.000			
Propo	.698333 0.000	.157424 0.000	.414394 0.000	.403 0.000	.187182 0.000	.118758 0.000	.12497 0.000		
Clara	.870424 0.000	.014667 0.992	.586485 0.000	.575091 0.000	.359273 0.000	.053333 0.243	.047121 0.194	.172091 0.000	

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 38 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 5°C, e incubados em MEM a 37°C por 72h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.977818 0.000								
L.D.	.304848 0.000	.672971 0.000							
L.I.	.326879 0.000	.650939 0.000	.02203 0.984						
HBSS	.536121 0.000	.441697 0.000	.231273 0.000	.209242 0.000					
Save	.964727 0.000	.013091 1.000	.659879 0.000	.637848 0.000	.428606 0.000				
Coco	.968212 0.000	.009606 1.000	.663364 0.000	.641333 0.000	.432091 0.000	.003485 1.000			
Propo	.861848 0.000	.11597 0.000	.557 0.000	.53497 0.000	.325727 0.000	.102879 0.000	.106364 0.000		
Clara	1.01076 0.000	.032939 0.835	.705909 0.000	.683879 0.000	.474636 0.000	.04603 0.412	.042545 0.533	.148909 0.000	

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 39 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 5°C, e incubados em MEM a 37°C por 96h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	1.12352 0.000								
L.D.	.413606 0.000	.709909 0.000							
L.I.	.435788 0.000	.687727 0.000	.022182 0.988						
HBSS	.656091 0.000	.467424 0.000	.242485 0.000	.220303 0.000					
Save	1.10403 0.000	.019485 0.995	.690424 0.000	.668242 0.000	.447939 0.000				
Coco	1.08603 0.000	.037485 0.765	.672424 0.000	.650242 0.000	.29939 0.000	.018 0.997			
Propo	.970515 0.000	.153 0.000	.556909 0.000	.534727 0.000	.314424 0.000	.133515 0.000	.115515 0.000		
Clara	1.13909 0.000	.015576 0.999	.725485 0.000	.703303 0.000	.483 0.000	.035061 0.827	.053061 0.280	.168576 0.000	

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 40 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 5°C, e incubados em MEM a 37°C por 120h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	1.39161 0.000								
L.D.	.654848 0.000	.736758 0.000							
L.I.	.669091 0.000	.722515 0.000	.014242 0.997						
HBSS	.899212 0.000	.492394 0.000	.244364 0.000	.230121 0.000					
Save	1.35042 0.000	.041182 0.294	.695576 0.000	.681333 0.000	.451212 0.000				
Coco	1.35761 0.000	.034 0.583	.702758 0.000	.688515 0.000	.458394 0.000	.007182 1.000			
Propo	1.25673 0.000	.134879 0.000	.601879 0.000	.587636 0.000	.357515 0.000	.093697 0.000	.100879 0.000		
Clara	1.38779 0.000	.003818 1.000	.732939 0.000	.718697 0.000	.488576 0.000	.037364 0.441	.030182 0.736	.131061 0.000	

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 41 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorbância, representativas da viabilidade de fibroblastos periodontais mantidos a 20°C, nos diferentes meios pelo período de 24h (0h).

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo	Clara
Água*	.470576 0.000								
L.D.	.154182 0.000	.316394 0.000							
L.I.	.169606 0.000	.30097 0.000	.015424 0.951						
HBSS	.207848 0.000	.262727 0.000	.053667 0.000	.038242 0.039					
Save	.431667 0.000	.038909 0.032	.277485 0.000	.262061 0.000	.223818 0.000				
Coco	0.421152 0.000	.049424 0.583	.26697 0.000	.251545 0.000	.213303 0.000	.010515 0.996			
Propo	.204818 0.000	.265758 0.000	.050636 0.000	.035212 0.029	.00303 1.000	.226848 0.000	.216333 0.000		
Clara	.431818 0.000	.038758 .034	.277636 0.000	.262212 0.000	.22397 0.000	.000152 1.000	.010667 0.996	.227 0.000	

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 42 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 20°C, e incubados em MEM a 37°C por 24h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo
Água*	.639879 0.000							
L.D.	.197606 0.000	.442273 0.000						
L.I.	.180758 0.000	.7459121 0.000	.016848 0.975					
HBSS	.185455 0.000	.454424 0.000	.012152 0.997	.004697 1.000				
Save	.594758 0.000	.045121 0.045	.397152 0.000	.414 0.000	.409303 0.000			
Coco	.612545 0.000	.027333 0.683	.414939 0.000	.431788 0.000	.427091 0.000	.017788 0.965		
Propo	.430061 0.000	.209818 0.000	.232455 0.000	.249303 0.000	.244606 0.000	.164697 0.000	.182485 0.000	
Clara	.635879 0.000	.004 1.000	.438273 0.000	.455121 0.000	.450424 0.000	.041121 0.123	.023333 0.843	.205818 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 43 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 20°C, e incubados em MEM a 37°C por 48h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo
Água*	.865939 0.000							
L.D.	.312242 0.000	.553697 0.000						
L.I.	.29803 0.000	.567909 0.000	.014212 0.963					
HBSS	.305 0.000	.560939 0.000	.007242 1.000	.00697 1.000				
Save	.826576 0.000	.039364 0.018	.514333 0.000	.528545 0.000	.521576 0.000			
Coco	.857485 0.000	.008455 0.999	.545242 0.000	.559455 0.000	.552485 0.000	.030909 0.175		
Propo	.700848 0.000	.165091 0.000	.388606 0.000	.402818 0.000	.395848 0.000	.125727 0.000	.156636 0.000	
Clara	.874727 0.000	.008788 0.999	.562485 0.000	.576697 0.000	.569727 0.000	.048152 0.001	.017242 0.889	.173879 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 44 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 20°C, e incubados em MEM a 37°C por 72h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo
Água*	.995455 0.000							
L.D.	.367303 0.000	.628152 0.000						
L.I.	.372697 0.000	.622758 0.000	.005394 1.000					
HBSS	.285212 0.000	.710242 0.000	.082091 0.000	.087485 0.000				
Save	.964515 0.000	.030939 0.794	.597212 0.000	.591818 0.000	.679303 0.000			
Coco	1.01297 0.000	.017515 0.993	.645667 0.000	.640273 0.000	.727758 0.000	.048455 0.186		
Própo	.795182 0.000	.200273 0.000	.427879 0.000	.422485 0.000	.50997 0.000	.169333 0.000	.217788 0.000	
Clara	1.00761 0.000	.012152 0.999	.640303 0.000	.634909 0.000	.722394 0.000	.043091 0.346	.005364 1.000	.212424 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 45 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 20°C, e incubados em MEM a 37°C por 96h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo
Água*	1.15082 0.000							
L.D.	.464152 0.000	.686667 0.000						
L.I.	.470182 0.000	.680636 0.000	.00603 1.000					
HBSS	.362939 0.000	.787879 0.000	.101212 0.000	.107242 0.000				
Save	1.10715 0.000	.043667 0.587	.643 0.000	.63697 0.000	.744212 0.000			
Coco	1.1467 0.000	.004121 1.000	.682545 0.000	.6476515 0.000	.783758 0.000	.039545 0.717		
Propo	.947788 0.000	.20303 0.000	.483636 0.000	.477606 0.000	.584848 0.000	.159364 0.000	.198909 0.000	
Clara	1.13891 0.000	.011909 1.000	.674758 0.000	.668727 0.000	.77597 0.000	.031758 0.901	.007788 1.000	.191121 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

Tabela 46 - Resultados do teste de Scheffé ($p < 0,05$) da análise comparativa das médias dos valores de absorvância, representativas da capacidade de proliferação de fibroblastos periodontais, previamente mantidos nos diferentes meios a 20°C, e incubados em MEM a 37°C por 120h.

	MEM 37	Água	L.D.	L.I.	HBSS	Save	Coco	Propo
Água*	1.399 0.000							
L.D.	.695 0.000	.704 0.000						
L.I.	.689485 0.000	.709515 0.000	.005515 1.000					
HBSS	.565909 0.000	.833091 0.000	.129091 0.000	.123576 0.000				
Save	1.36297 0.000	.03603 0.671	.66797 0.000	.673485 0.000	.797061 0.000			
Coco	1.39397 0.000	.00503 1.000	.69897 0.000	.704485 0.000	.828061 0.000	.031 0.829		
Propo	1.18376 0.000	.215242 0.000	.488758 0.000	.494273 0.000	.617848 0.000	.179212 0.000	.210212 0.000	
Clara	1.40152 0.000	.002515 1.000	.706515 0.000	.71203 0.000	.835606 0.000	.038545 0.578	.007545 1.000	.217758 0.000

*Água: água de torneira

L.D.: leite desnatado

L.I.: leite integral

Save: Save-A-Tooth®

Coco: água de coco

Propo: própolis

Clara: clara de ovo

APÊNDICE D - Gráficos

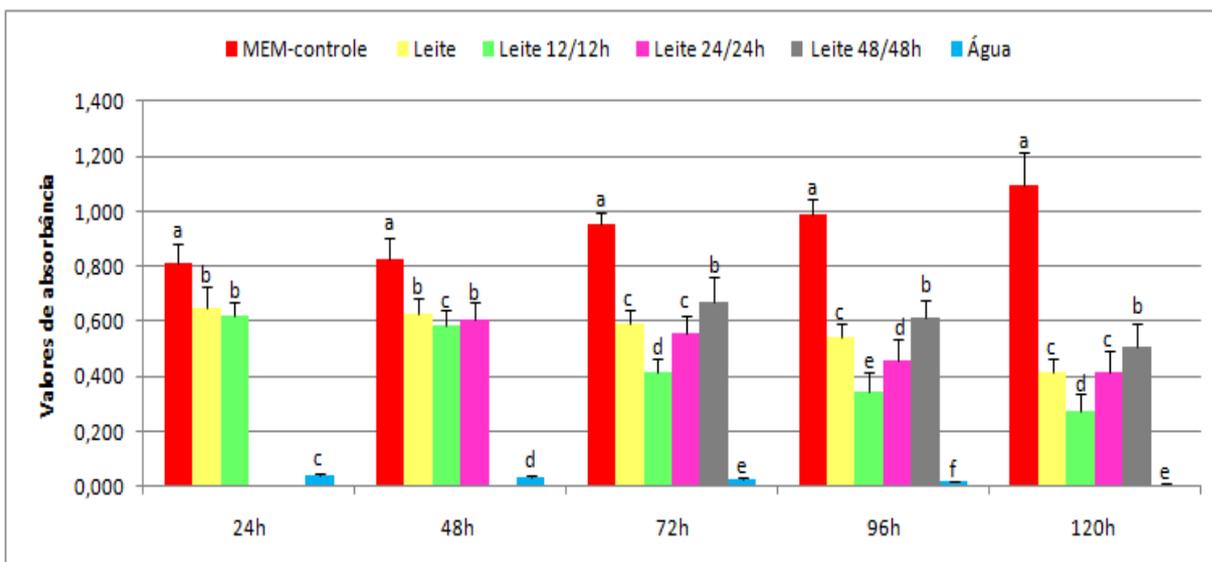


Gráfico 1 - Média dos valores de absorvância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 5°C nos diferentes meios e períodos de tempo. *Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

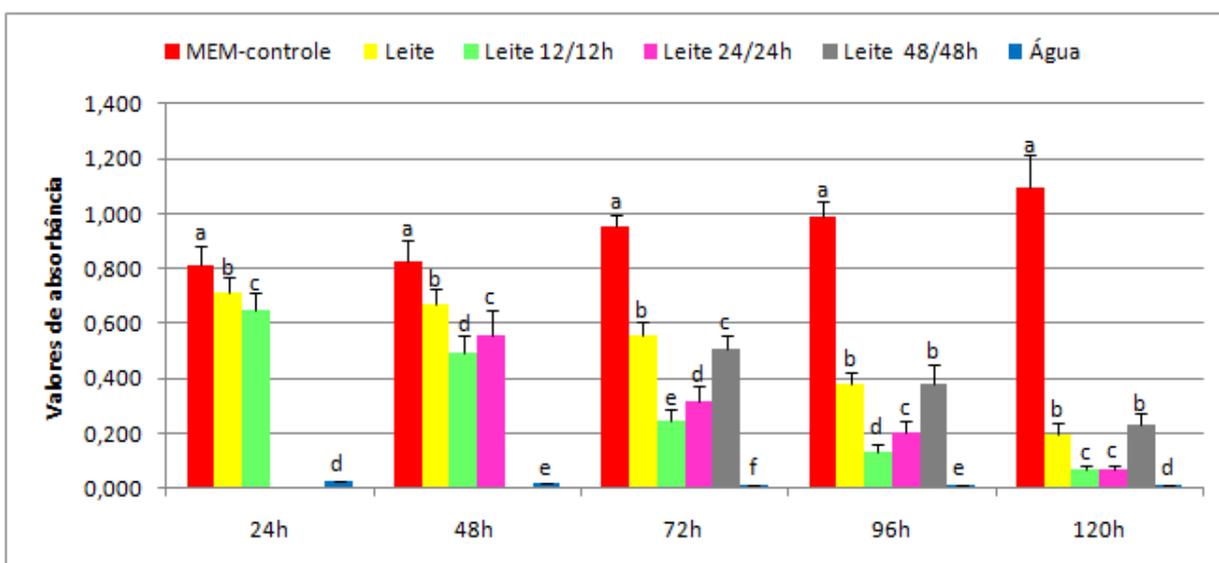


Gráfico 2 - Média dos valores de absorvância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 20°C nos diferentes meios e períodos de tempo. *Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

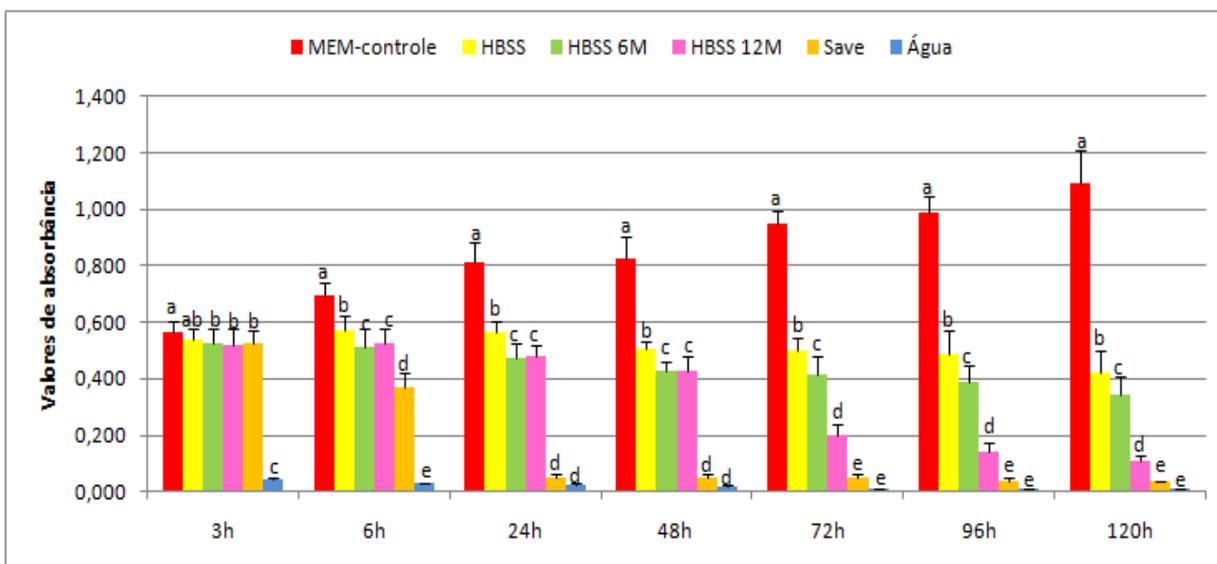


Gráfico 3 - Média dos valores de absorvância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 20°C nos diferentes meios e períodos de tempo. *Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

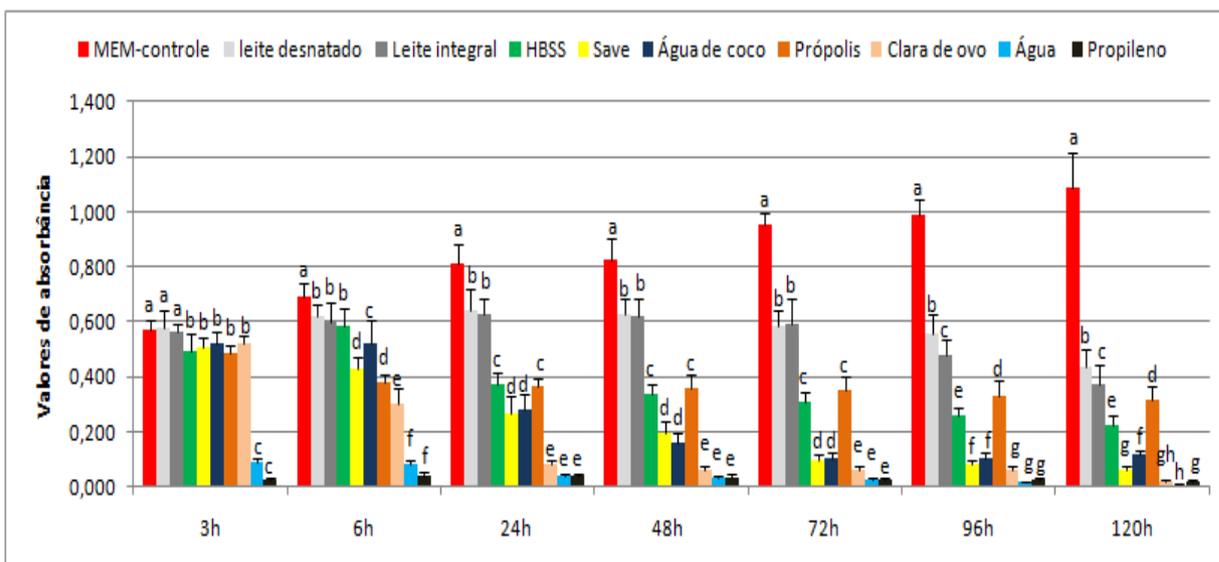


Gráfico 4 - Média dos valores de absorbância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 5°C nos diferentes meios e períodos de tempo. *Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

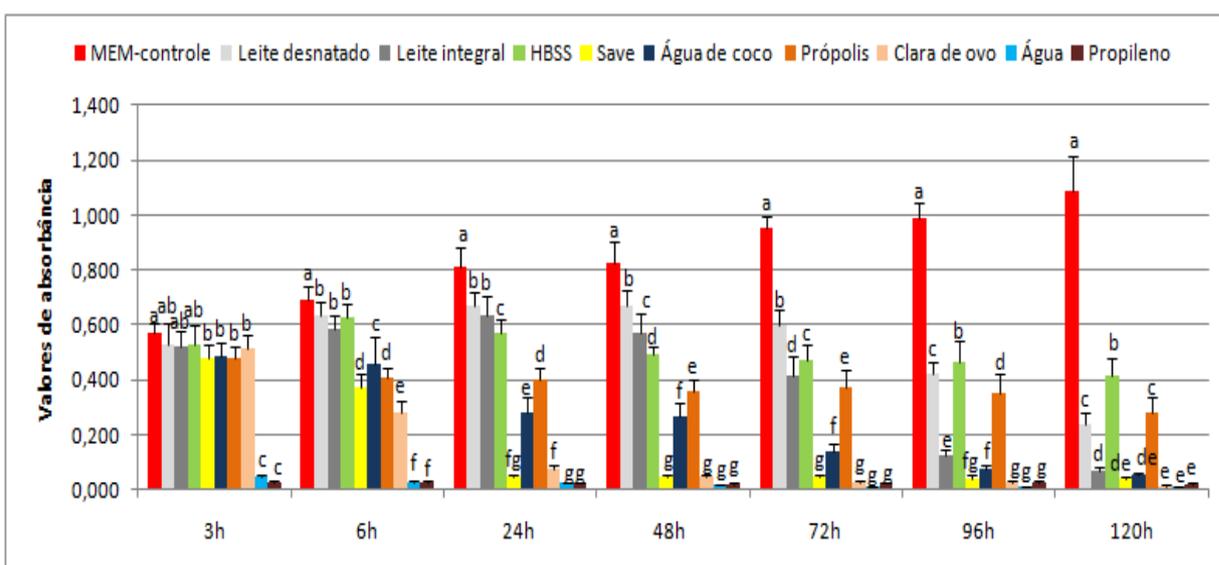


Gráfico 5 - Média dos valores de absorbância, representativa da viabilidade dos FLPH mantidos a 20°C nos diferentes meios e períodos de tempo. *Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

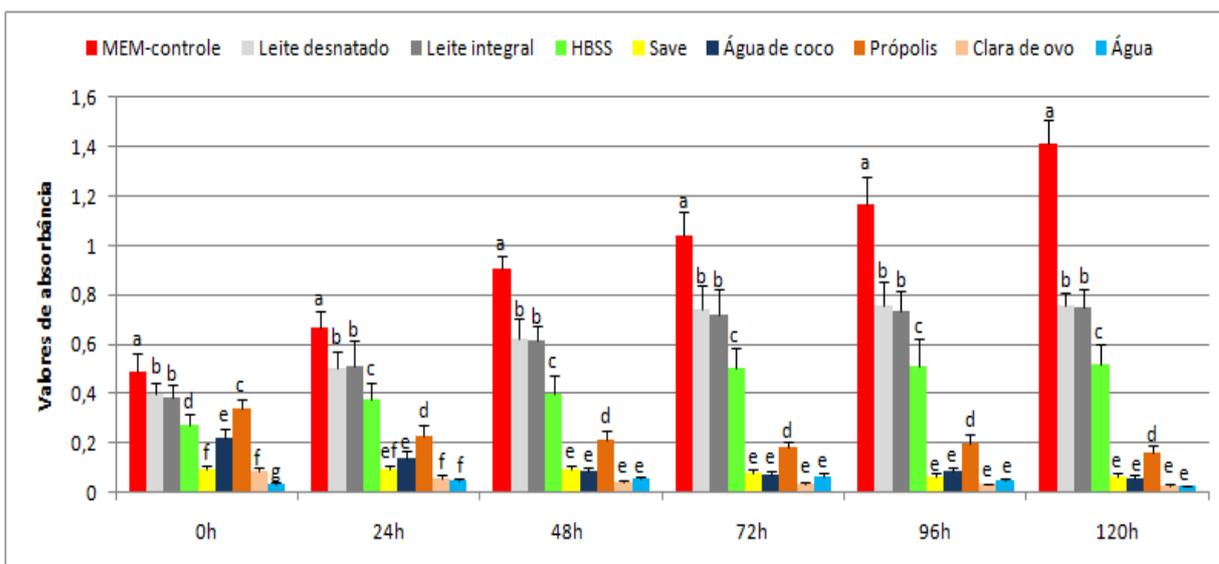


Gráfico 6 - Média dos valores de absorvância, representativa da viabilidade (0h) e da capacidade de proliferação (24-120h) de FLPH para cada meio testado, a 5°C. *Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

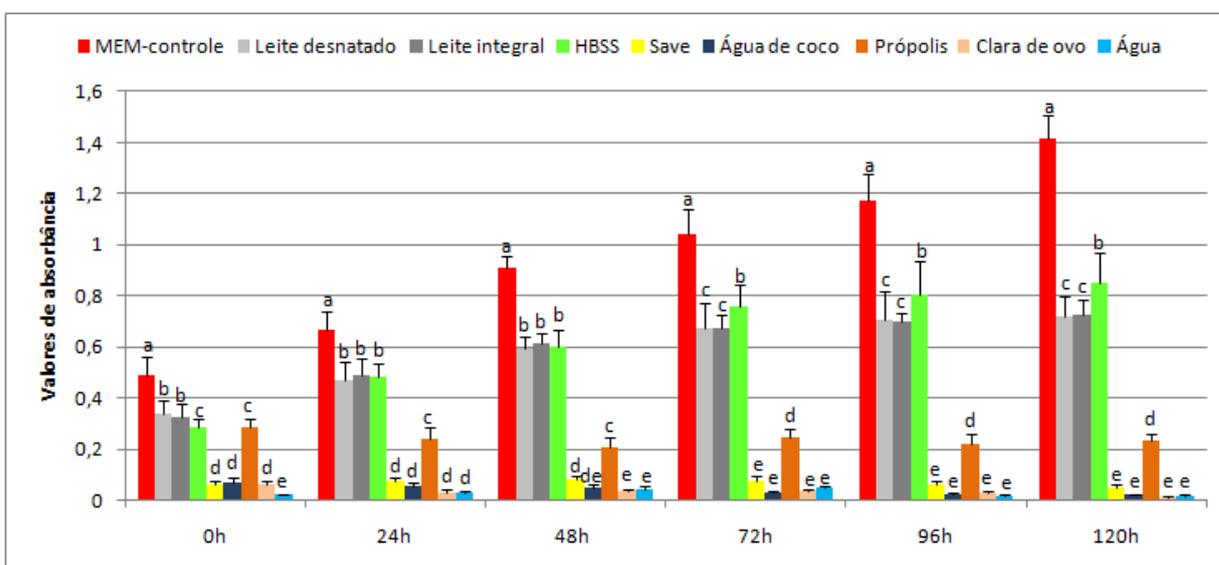
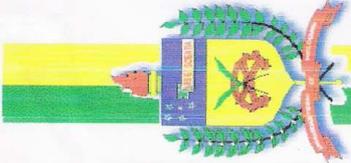


Gráfico 7 - Média dos valores de absorvância, representativa da viabilidade (0h) e da capacidade de proliferação (24-120h) de FLPH para cada meio testado, a 20°C. *Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as médias de cada meio de conservação, num determinado período de tempo.

ANEXO

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa
Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 062

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

APROVADO

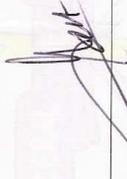
PROCESSO: 074/08 FR- 188677

TÍTULO: Avaliação do efeito de temperatura de conservação e da renovação do leite sobre a manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.

AUTORES: Mara Cristina Santos Felipe, Wilson Tadeu Felipe, Beatriz Dulcineia M. S. Kremer.

DEPARTAMENTO: CIE/CCS/UFSC.

FLORIANÓPOLIS, 30 de Maio de 2008.


 Coordenador do CEPSH - Prof.º Washington Portela de Souza



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

CERTIFICADO N° 094

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

APROVADO

PROCESSO: 108/08 FR- 195154

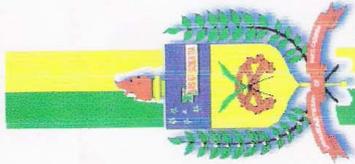
TÍTULO: Avaliação do efeito do tempo de estocagem da solução salina balanceada de Hank (HBSS) sobre a manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.

AUTORES: Mara Cristina Santos Felipe, Wilson Tadeu Felipe e Beatriz Dulcineia Mendes de Souza.

DEPARTAMENTO.: Odontologia/CCS/UFSC.

FLORIANÓPOLIS, 30 de junho de 2008.

Coordenador do CEPSH/UFSC - Prof.º Washington Portela de Souza



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró - Reitoria de Pesquisa
Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 061

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

APROVADO

PROCESSO: 073/08 FR- 188679

TÍTULO: Comparação do efeito de diferentes temperaturas de cultivo e meios de conservação na manutenção da viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal humano.

AUTORES: Mara Cristina Santos Felipe, Wilson Tadeu Felipe, Beatriz Dulcineia M. S. Kremer.

DEPARTAMENTO: CIF/CCS/UFSC.

FLORIANÓPOLIS, 30 de Maio de 2008.

Coordenador do CEPSH - Prof.º Washington Portela de Souza