

HUGO ALEXANDRE DE SOUSA

***“AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO EFEITO DE
DIFERENTES MEIOS DE CONSERVAÇÃO SOBRE O
LIGAMENTO PERIODONTAL DE DENTES
HUMANOS EXTRAÍDOS CIRURGICAMENTE”***

ARAÇATUBA

- 2004 -

HUGO ALEXANDRE DE SOUSA

***AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO EFEITO DE
DIFERENTES MEIOS DE CONSERVAÇÃO
SOBRE O LIGAMENTO PERIODONTAL DE
DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS
CIRURGICAMENTE***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, para obtenção do grau de Doutor em Odontologia – Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: **Prof. Dr. Antônio César Perri de Carvalho**

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOA/UNESP

Sousa, Hugo Alexandre

Avaliação microscópica do efeito de diferentes meios de conservação sobre o ligamento periodontal de dentes humanos extraídos cirurgicamente./ Hugo Alexandre de Sousa. — Araçatuba: [s.n.], 2004.

124 f. :il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2004.

Orientador: Prof. Dr. Antônio César Perri de Carvalho

1. Ligamento Periodontal 2. Traumatismo 3. Meio de conservação.

DADOS CURRICULARES

HUGO ALEXANDRE DE SOUSA

Nascimento : 24 de março de 1962 – Goiânia – GO

Filiação : Walterson Antônio de Sousa e Zilda Cardoso Machado de Sousa

1979 – 1982: Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia “João Prudente” – Anápolis – GO.

1983 – 1984: Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Bucomaxilofacial, nível de especialização, na Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – RJ.

1985 – 1986: Residência em Cirurgia Bucomaxilofacial na Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro – RJ.

1992 – 1996: Curso de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo – SP.

1989 – 2003: Professor de Cirurgia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

2000 – 2004: Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Bucomaxilofacial, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia – Câmpus de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais, *Zilda e Walterson*, que me deram e ensinaram tudo: amor, coragem e honestidade.

Aos meus filhos, *Mariana e Marcelo*, por darem tanto sentido a minha vida.

A você, *Ana Helena*.

Por você eu conseguiria até ficar alegre

Pintaria todo o céu de vermelho

Eu teria mais herdeiros que um coelho

Eu aceitaria a vida como ela é

Eu tomaria banho gelado no inverno

Eu mudaria até o meu nome

Eu viveria em greve de fome

Desejaria todo o dia a mesma mulher

Por você, por você

Todo meu amor

Frejat

A Deus

“que minha vida seja apenas uma
prece de gratidão a Ti.”

AGRADECIMENTOS

Como dizer “obrigado” quando há tantos a quem agradecer?

Ao *Prof. Antônio César Perri de Carvalho*, pela disponibilidade, seriedade, dedicação e empenho na orientação deste trabalho.

Ao *Prof. Paulo Perri de Carvalho*, pela magnitude e simplicidade reunidas em uma só pessoa. Grato pela acolhida e pelos ensinamentos.

Ao *Prof. Dr. Tetuo Okamoto*, pela receptividade, orientação, paciência e carinho.

Aos Professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP, pela gentil acolhida, pelo convívio e pela grande contribuição científica.

Aos funcionários da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP, pela disposição e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia, da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP, em especial, *Gilmar, Bernadete e Dirce*, pela amizade, atenção e grande eficiência no processamento histológico.

Aos funcionários da Secção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP, pelo empenho sempre acompanhado de um sorriso.

Aos funcionários da Secção de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia do Câmpus de

Araçatuba - UNESP, que sempre me atenderam com muita presteza e boa vontade.

Aos colegas do Curso de Doutorado: *Adolfo Embacmer Filho, Alessandra Marcondes Aranega, Edgard Franco Moraes Júnior, Luis Eduardo Marques Padovan, Samuel Profírio Xavier, Sônia Regina Panzarini, Cláudio Maldonado Pastori e Wesley Cabral Rocha*, pela oportunidade da convivência.

Aos Professores da Disciplina de Cirurgia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, pela compreensão durante a minha ausência.

A todos os meus amigos, em especial, a minha cunhada *Dra. Rita de Cássia Gonçalves de Alencar*, e a minha amiga *Dra. Aline Carvalho Batista* pelo apoio direto neste trabalho, pelo carinho e amizade.

Àqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste curso e desta tese, meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, na pessoa do Magnífico Reitor ***Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade.***

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do Digníssimo Diretor ***Prof. Dr. Paulo Roberto Boracin.***

Universidade Federal de Goiás, na pessoa da Magnífica Reitora ***Prof^a. Dra. Milca Severino Pereira.***

Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, na pessoa da Digníssima Diretora ***Prof^a. Dra. Luisa Isabel Taveira Rocha.***

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	16
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
3 PROPOSIÇÃO	58
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
4.1 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS	61
4.2 TRATAMENTO DOS DENTES EXTRAÍDOS.....	62
4.3 PROCESSAMENTO LABORATORIAL.....	63
4.4 PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DOS RESULTADOS.....	63
4.4.1 ANÁLISE DESCRITIVA	63
4.4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA	64
4.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
4.5 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO.....	65
5 RESULTADOS.....	66
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA.....	67
5.1.1 GRUPO I – LEITE BOVINO PASTEURIZADO	67
5.1.2 GRUPO II - CLARA DO OVO DE GALINHA	68
5.1.3 GRUPO III - SALIVA ARTIFICIAL.....	68
5.1.4 GRUPO IV – CONTROLE.....	69
5.2 ILUSTRAÇÕES DA ANÁLISE DESCRITIVA.....	70

5.2.1 GRUPO I - DO LEITE BOVINO PASTEURIZADO	70
5.2.2 GRUPO II - DA CLARA DO OVO DE GALINHA	73
5.2.3 GRUPO III - DA SALIVA ARTIFICIAL.....	76
5.2.4 GRUPO IV - CONTROLE.....	79
5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	82
6 DISCUSSÃO	90
6.1 DA METODOLOGIA.....	91
6.2 DOS RESULTADOS	94
7 CONCLUSÃO	102
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
RESUMO	114
ABSTRACT	117
ANEXO I	121
ANEXO II	123
ANEXO III	124

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Grupo I - Terço cervical - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Celularidade preservada, mas com esparsas áreas de redução do número de fibroblastos (HE-20X)..... 70
- Figura 2 - Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X) 70
- Figura 3 - Grupo I - Terço médio - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Redução da celularidade e discreta perda da nitidez dos feixes de fibras colágenas (HE-20X) 71
- Figura 4 - Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X) 71
- Figura 5 - Grupo I - Terço apical - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Celularidade preservada, mas com esparsas áreas de redução do número de fibroblastos e vasos dilatados com o endotélio preservado (HE-20X)..... 72
- Figura 6 - Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X) 72
- Figura 7 - Grupo II - Terço cervical - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Redução do número de fibroblastos, de células endoteliais, e desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE-20X)..... 73

Figura 8 - Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)	73
Figura 9 - Grupo II - Terço médio - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Redução do número de fibroblastos, e feixes de fibras colágenas envolvendo capilares e vênulas (HE-20X).....	74
Figura 10- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)	74
Figura 11- Grupo II - Terço apical - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Redução do número de fibroblastos e desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE-20X)	75
Figura 12- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)	75
Figura 13- Grupo III - Terço cervical - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Expressiva redução do número de fibroblastos, de células endoteliais e importante desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE-20X).....	76
Figura 14- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)	76
Figura 15- Grupo III - Terço médio - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Expressiva redução do número de fibroblastos, de células endoteliais e importante desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE-20X).....	77
Figura 16- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)	77

Figura 17- Grupo III - Terço apical - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Expressiva redução do número de fibroblastos, presença de restos celulares e importante desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE-20X).....	78
Figura 18- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)	78
Figura 19- Grupo IV - Terço cervical - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Celularidade preservada, com vascularização normal e feixes de fibras colágenas nítidos (HE-20X).....	79
Figura 20- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)	79
Figura 21- Grupo IV - Terço médio - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Fibroblastos e células endoteliais preservados. Presença de vasos sanguíneos com características normais (HE-20X)	80
Figura 22- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)	80
Figura 23- Grupo IV - Terço apical - Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Celularidade preservada e com vascularização normal (HE-20X).....	81
Figura 24- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)	81

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Média, desvio-padrão e número de amostras, referentes à avaliação quantitativa do número de células, por mm^2 , dos terços cervicais do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação 82
- Tabela 2 - Análise de variância referente à avaliação quantitativa das células do terço cervical do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação 83
- Tabela 3 - Comparações individuais, após aplicação do teste de Tukey, entre os terços cervicais dos diferentes grupos, quanto à avaliação quantitativa do número de células do ligamento periodontal, por mm^2 , proporcionada pelos diferentes meios de conservação 83
- Tabela 4 - Média, desvio-padrão e número de amostras, referentes à avaliação quantitativa do número de células, por mm^2 , dos terços médios, do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação 84
- Tabela 5 - Análise de variância referente à avaliação quantitativa das células do terço médio do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação 84
- Tabela 6 - Comparações individuais, após aplicação do teste de Tukey, entre os terços médios dos diferentes grupos, quanto à avaliação quantitativa das células do ligamento periodontal, por mm^2 , proporcionada pelos diferentes meios de conservação 85

Tabela 7 - Média, desvio-padrão e número de amostras, referentes à avaliação quantitativa do número de células, por mm ² , dos terços apicais do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação	86
Tabela 8 - Análise de variância referente à avaliação quantitativa das células do terço apical, do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação.....	86
Tabela 9 - Comparações individuais, após aplicação do teste de Tukey, entre os terços apicais dos diferentes grupos, quanto à avaliação quantitativa das células, por mm ² , do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação	86
Tabela 10- Média, desvio-padrão e número de amostras, referentes à avaliação quantitativa do número de células, por mm ² , do ligamento periodontal de cada grupo, proporcionada pelos diferentes meios de conservação	87
Tabela 11- Análise de variância referente à avaliação quantitativa da células do ligamento periodontal, entre grupos, proporcionada pelos diferentes meios de conservação	87
Tabela 12- Comparações individuais, após aplicação do teste de Tukey, entre as amostras dos diferentes grupos, quanto à avaliação quantitativa das células, por mm ² , do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação	88

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Estudos de Andreasen (1985)⁵ demonstraram que 30,0% das crianças sofrem algum tipo de traumatismo na primeira dentição até os 7 anos de idade e 22,0% na dentição permanente até a faixa etária de 14 anos, considerando somente os dentes anteriores. Assim sendo, mais de 50,0% das crianças até 14 anos sofrem algum tipo de traumatismo, desde uma simples fratura de esmalte até a avulsão dentária.

A avulsão, segundo Ferreira (1986)²⁵, é a extração de parte de um órgão por arrancamento. Avulsão dentária é considerada como a completa exarticulação do dente de seu alvéolo. Cerca de 15,0% das lesões traumáticas resultam em avulsão, preferencialmente na faixa etária entre 7 e 10 anos (Andreasen, 1985)⁵.

A literatura referente ao assunto confirma que o primeiro órgão do corpo humano a ser transplantado foi um dente. A primeira descrição de um dente transplantado data do século 9 d.c (Kusek, 1965)³⁵. Histologicamente, todo dente reimplantado mostra algum grau de alteração no ligamento periodontal. A presença de um ligamento periodontal intacto é o fator mais importante para assegurar o reparo de um dente transplantado ou reimplantado (Barret; Kenny, 1997)¹⁴.

O reparo do ligamento periodontal após o reimplante de dentes avulsionados tem sido examinado em uma série de estudos. O resultado desses estudos mostra que somente em 25,0% dos casos o reparo acontece (Andreasen, 1975; Andreasen et al., 1995; Andreasen; Andreasen, 2001)^{8,12,9}.

Quando o ligamento periodontal é rompido no momento da avulsão, a porção ligada à parede alveolar mantém sua vascularização permanecendo íntegra. Entre as duas porções do ligamento periodontal rompido, forma-se um coágulo sangüíneo que mantém o dente umedecido, além de servir como substrato para a proliferação do tecido conjuntivo. A porção do ligamento periodontal que permanece aderida ao cemento perde a sua nutrição que deverá

ser reparada às expensas dos vasos sangüíneos que invadem o coágulo. Assim, enquanto a revascularização não se refaz, o ligamento periodontal nas proximidades do cemento pode manter sua integridade, em pontos onde o mecanismo de nutrição por difusão for eficiente e sofrer degeneração nos outros locais (Gabrielli, 1988)²⁶.

O reimplante imediato é um dos fatores que mais contribuem para o reparo do ligamento periodontal. Quando o dente é reimplantado imediatamente após a avulsão, a taxa de reparo do ligamento periodontal varia de 85,0% a 97,0% (Andreasen et al., 1995)¹².

Não obstante o reimplante imediato seja o tratamento ideal para o restabelecimento do suprimento de nutrientes para as células do ligamento periodontal da superfície radicular, algumas situações, infelizmente, podem retardar o reimplante. Quando isto ocorre, o dente deve ser conservado em um meio que mantenha a viabilidade das células do ligamento periodontal até que o tratamento possa ser realizado (Harkacz; Carnes Jr.; Walker III, 1997)²⁹.

Em animais experimentais foi demonstrado reparo quase idêntico do dente reimplantado imediatamente e dentes reimplantados com 18 minutos de atraso (Andreasen, 1981)⁶. No entanto, um estudo clínico recente relatou que o reimplante imediato, mesmo após cinco minutos, foi o fator mais crítico para o reparo periodontal. Além disso, esse estudo também relatou que o atraso do reimplante, mesmo sendo tão pouco quanto de oito minutos, pode tornar a probabilidade de reparo periodontal menor que 50,0% (Andreasen et al., 1995)¹².

Dentre as alterações pós-operatórias observadas em reimplantes dentários tardios, a literatura é concordante no sentido de que a reabsorção cemento-dentinária torna-se a mais significativa, não só pela sua constância mas também por constituir uma das maiores causas de insucesso (Gabrielli, 1988)²⁶. Estudos clínicos em humanos e experimentais em animais têm demonstrado que a reabsorção está diretamente relacionada com período de tempo extra-alveolar (Andreasen, 1981)⁶.

Segundo Blomlöf et al. (1983)¹⁹, as lesões causadas pela avulsão levam à reabsorção superficial de 1,0% a 10,0% dos casos, mas não levam a reabsorções inflamatórias ou por substituição. Esses tipos de reabsorções são

influenciadas por fatores, como, período de tempo extra-alveolar e as condições de conservação do dente avulsionado.

O prolongado período de conservação a seco leva a todos os tipos de reabsorção, um fenômeno também registrado nos estudos em macacos (Andreasen, 1981)⁶. A maior influência do período extra-alveolar a seco aparece imediatamente pela necrose das células do ligamento periodontal. Mesmo períodos curtos a seco (30 minutos) mostram severas perdas das células do ligamento periodontal (Andreasen; Bodin, 1990)¹⁰.

O efeito negativo do período a seco sobre o reparo do ligamento periodontal parece ser mais marcante quando comparado ao da polpa. Conservação a seco do dente avulsionado por um período entre 10 e 20 minutos resulta em 24,0% de reparo do ligamento periodontal e em 36,0% de reparo da polpa. Esse fenômeno é provavelmente relatado pelo fato de que a polpa, em contraste com o ligamento periodontal, está mais protegida contra os efeitos deletérios da dissecação (Andreasen; Borum; Andreasen, 1995)¹¹.

Esses resultados são concordantes com um estudo recente *in vitro* que examinou a influência do tempo extra bucal e do meio de conservação na capacidade de proliferação das células progenitoras do ligamento periodontal. Após 30 minutos a seco, em temperatura ambiente, a porcentagem de células viáveis foi menor do que 3,0%. Os achados desse estudo sugerem que o prognóstico desfavorável para dentes reimplantados, mesmo após período de tempo extra bucal curto, pode ser devido ao rápido declínio na capacidade proliferativa das células do ligamento periodontal (Lekic et al., 1996)³⁷.

Se o reimplante imediato não é possível, se a manutenção a seco é extremamente prejudicial, dentes avulsionados devem ser conservados em um meio fisiológico. É aconselhado armazenar o dente avulsionado em meio úmido com a finalidade de manter-se a vitalidade do ligamento periodontal (Hammer; Reed; Stanley, 1970)²⁸. O resultado da desidratação é freqüentemente a anquilose do dente avulsionado devido a um período extra bucal de mais de 15 minutos, incidência essa que diminui quando o período extra bucal decorre no meio úmido (Cvek; Granath; Hollender, 1974)²³.

Vários trabalhos indicaram que a saliva era melhor meio de conservação do que a seco. Para Blomlöf; Otteskog (1980)¹⁶, a saliva é um bom meio de conservação para períodos extra-alveolares curtos. Após a conservação em saliva por uma hora, menos de 50,0% das células podem ser recuperadas. Depois de três horas, a 37°C em saliva, todas as células estão mortas.

De quatrocentos casos clínicos de dentes avulsionados pesquisados por Andreasen et al. (1995)¹², a maioria foi armazenada na cavidade bucal (em saliva), os outros meios foram solução salina e água de torneira. A utilização clínica de saliva como meio de conservação, apesar da sua disponibilidade, tem como desvantagem o risco de o paciente engolir o dente avulsionado, além da atividade dos microrganismos e das enzimas salivares.

A conservação em água de torneira, por ser hipotônica e contaminada, tem mostrado ser tão danosa para as células do ligamento periodontal quanto a seco. A solução salina tem se mostrado boa por curtos períodos de tempo, no entanto, nem sempre está disponível no local onde os acidentes ocorrem, o que limita o seu uso (Blomlöf et al., 1983)¹⁹.

Após estudos de Blomlöf; Otteskog (1980)¹⁶, Blomlöf; Lindskog; Hammarström (1981)¹⁷ e Blomlöf et al. (1983)²⁰ abriu-se boa perspectiva para utilização clínica do leite como meio de conservação de dentes avulsionados.

Comparações entre o leite e a saliva avaliando-se a viabilidade das células do ligamento periodontal têm mostrado ser o leite superior à saliva. Estudos avaliando a viabilidade de fibroblastos retirados do ligamento periodontal de dentes humanos extraídos, e colocados em cultura de células após a estocagem em leite, concluíram que o leite é melhor que a saliva, não apenas em relação ao número de células viáveis, mas também na capacidade de recuperá-las. O número de células viáveis, após uma a três horas de estocagem em leite, diminuiu somente em 30,0% (Blomlöf; Otteskog, 1980)¹⁶. Para esses autores, o leite é um bom meio de conservação para períodos extra bucais mais longos (até 6 horas) porque contém também substâncias nutritivas como, aminoácidos, carboidratos, além de o leite comercial ser pasteurizado.

Blomlöf; Lindskog; Hammarström (1981)¹⁷ verificaram que, após oito semanas do reimplante de dentes de macacos conservados em leite por 1, 2 e 3 horas, houve menos reabsorção do dente armazenado no leite do que na saliva. Observaram também que a inflamação do ligamento periodontal aumentou com o maior tempo de conservação no leite, assim como na saliva, mas a reação inflamatória foi maior na saliva.

Estudos têm sido conduzidos para examinar características do leite, bem como de outros meios, os quais facilitam a viabilidade das células do ligamento periodontal. Osmolaridade, pH e condutividade foram avaliados e tem sido sugerido que a composição química do meio é menos importante que a osmolaridade (Lindskog; Blomlöf, 1982)³⁹.

O leite foi sugerido como um meio de estocagem para dentes avulsionados, principalmente por ter uma osmolaridade fisiológica. A osmolaridade do leite é de 250,0 mOsm/kg, próxima a do soro, sendo a da saliva menor que 60,0 ou 70,0 mOsm/kg.

Do levantamento de quatrocentos casos de avulsão dentária realizado por Andreasen et al. (1995)¹² nenhum dente foi armazenado no leite. Embora o leite seja mencionado como meio de conservação alternativo à saliva e à solução salina em estudos experimentais *in vitro* ou em animais, as suas implicações em termos clínicos não foram ainda verificadas.

Para Rozenfarb; Kupietzky; Shey (1997)⁵⁰ são necessárias outras alternativas para substituição do leite bovino quando da sua indisponibilidade. Esses autores encontraram resultados semelhantes ao do leite quando utilizaram a albumina do ovo de galinha para preservação de fibroblastos de pele humana.

O guia da Associação Americana de Endodontia (1994)³ recomendou para tratamento de dentes permanentes avulsionados a solução salina balanceada de Hank (HBSS) como o meio de armazenamento mais adequado, mas, não estando esta disponível, o leite é sugerido, seguido de solução salina, saliva e água.

Estudos avaliando a utilização da HBSS como meio de conservação foram realizados por Trope; Friedman (1992)⁵³. A HBSS é um meio utilizado para cultura de tecidos e estende significativamente o período de

vitalidade das células. A 3M (3M Health Care – St Paul, USA) desenvolveu um dispositivo denominado *save a tooth* que permite acondicionar e remover o dente avulsionado sem causar dano adicional às fibras do ligamento periodontal. Trope; Friedman (1992)⁵³ afirmam que, quando um dente avulsionado é colocado imediatamente na HBSS, o tempo passa a não ser um fator crítico. Em um tempo extra-alveolar de até 24 horas nesta solução, não foi detectado o aparecimento de nenhuma reabsorção.

Vários estudos avaliaram o uso da solução salina da HBSS e do Viaspan como meios para preservação da integridade das células do ligamento periodontal (Hiltz; Trope, 1991; Doyle; Dumsha; Sydiskis, 1998)^{30,24}. O Viaspan (Belzer VW-CSS, Du Pont Pharmaceuticals – Wilmington, EUA) é normalmente utilizado para o transporte de órgãos a serem transplantados. Hiltz; Trope (1991)³⁰ compararam a HBSS e o Viaspan com o leite, utilizando células fibroblásticas humanas *in vitro*. Os resultados mostraram que, até as seis primeiras horas, não houve diferença significativa entre os três meios. Após esse período, as propriedades do Viaspan e da HBSS se sobrepuseram às do leite. A osmolaridade da HBSS está entre 270,0 e 290,0 mOsm/kg e a do Viaspan é de 320,0 mOsm/kg.

Apesar da existência de meios de estocagem de qualidade superior, tais como HBSS e Viaspan, a falta de disponibilidade desses produtos no lugar e na hora do acidente fazem a sua recomendação questionável.

Estudos têm mostrado experimentalmente que dentes envolvidos com filme de plástico por uma hora não apresentaram mais reabsorções do que dentes que foram reimplantados imediatamente (Blomlöf et al., 1983)¹⁹. Do levantamento realizado por Andreasen et al. (1995)¹², de quatrocentos dentes avulsionados cinco tinham sido envolvidos por filme de plástico e todos apresentavam reabsorção. Devido ao limitado número de casos, as razões não puderam ser determinadas.

Trabalhos experimentais foram também realizados em ratos, empregando-se a gelatina incolor, com maior ou menor diluição em água (Panzarini; Saad Neto, 2001)⁴⁵ e a solução de água de coco verde (Aguiar, 2002)¹ como meios alternativos de conservação de dentes avulsionados. No

entanto, os resultados mostraram-se inferiores quando comparados com o leite bovino.

Admite-se que a vida média do dente reimplantado em condições favoráveis seja de cinco a dez anos. O sucesso tem sido utilizado para referir a presença de um dente reimplantado que está livre das indesejáveis seqüelas, como: anquilose, reabsorção, infecção ou patologias periapicais. Sobrevivência tem sido inapropriadamente usada como sinônimo de sucesso. Sobrevivência ou tempo de função clínica é o tempo entre o reimplante e a extração e não pode ser considerada sucesso (Andreasen et al., 1995)¹².

O fato de o leite ser considerado na literatura um meio apropriado para a conservação de dentes é fundamentado basicamente em pesquisas laboratoriais e em animais que diferem de seres humanos. Existem poucos trabalhos utilizando a clara do ovo de galinha como meio para conservação de dentes avulsionados, sendo este, no entanto, um meio facilmente disponível (Velasco-Bohórquez, 1993; Carvalho Júnior, 1995; Rozenfarb; Kupietzky; Shey, 1997)^{54,21,50}. Ainda, em 2001, Andreasen; Andreasen indicaram a saliva como o melhor meio de conservação.

Embora amplamente estudados, os reimplantes apresentam muitas questões a serem ainda esclarecidas. As publicações recentes voltam-se para as respostas biológicas que ocorrem após os reimplantes. A literatura, muito longe de equacionar os problemas relacionados aos meios de conservação de dentes avulsionados, ao contrário, estimulou a realização deste estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Em 1980, Blomlöf et al.¹⁸ testaram as propriedades do leite para conservação da vitalidade das células do ligamento periodontal. Vinte e três incisivos superiores de sete macacos foram utilizados. Imediatamente após a extração, 21 dentes foram colocados em tubos de cultura de tecidos, contendo 10,0 mL de leite, saliva ou solução salina, e estocados por uma, duas ou três horas a 20°C. Dois dentes por grupo foram armazenados por uma ou duas horas, ao mesmo tempo que o grupo armazenado por três horas contendo três dentes cada. Os dois dentes restantes foram usados como controle e congelados imediatamente após a extração. Após os períodos de armazenamento, os dentes foram lavados em solução salina e congelados. Secções transversais em cinco níveis diferentes foram feitas nas raízes. A seguir, os cortes foram submetidos à coloração histoquímica para lactase e succinase desidrogenase, utilizadas para sinalizar células vitais. Os cortes foram examinados por dois observadores e a intensidade da coloração foi calculada. Os resultados evidenciaram que, com o passar do tempo, havia uma perda rápida da atividade enzimática das células do ligamento periodontal armazenadas em saliva. No leite, mesmo após três horas, houve somente uma perda insignificante da atividade enzimática. Concluíram que o leite pareceu oferecer melhores condições de estocagem para dentes avulsionados do que a solução salina e a saliva.

Continuando a linha de pesquisa, Blomlöf; Otteskog (1980)¹⁶ avaliaram então a viabilidade das células do ligamento periodontal, após a conservação em leite ou saliva. A saliva foi coletada de quatro indivíduos, sem doença periodontal, e estocadas a -20°C. Foram obtidas culturas de células de ligamento periodontal humano e adicionados 2,0 mL de saliva, leite ou meio de Eagle. As culturas de células foram armazenadas a 4°C, 20°C e 37°C, por períodos de 60, 120 e 180 minutos. A viabilidade foi avaliada após as culturas terem sido tripsinizadas e o número total de células contadas. O diâmetro das células foi mensurado, usando-se uma microescala ocular para avaliação do

edemaciamento. A largura das zonas de células livres foi mensurada a cada dia, por dez dias, para avaliação do reparo, utilizando-se um microscópio invertido Leitz. Os resultados mostraram, após a estocagem em saliva, que o número de células viáveis decresceu com o aumento do tempo e da temperatura. O mesmo não ocorreu após a conservação no leite, uma vez que quase todas as células permaneceram viáveis em todos os períodos experimentais. O diâmetro das células aumentou em aproximadamente 30,0%, após armazenamento na saliva, e permaneceu do mesmo tamanho, após armazenamento no meio de Eagle e no leite. Na cultura com meio de Eagle, o reparo da ferida experimental foi obtido após três dias; um período de cultivo adicional de um a dois dias foi necessário para refazer a zona de células livres quando o meio foi o leite. Após quatro dias de estocagem na saliva, a aparência da zona de células livres era a mesma e a largura foi mensurada com dificuldade. Concluíram que o leite foi superior à saliva como meio de conservação.

Um ano depois, em 1981, Blomlöf; Lindskog; Hammarström¹⁷ avaliaram o reparo periodontal de dentes de macacos reimplantados, após armazenamento em leite ou em saliva. Nove macacos foram usados nesse experimento. Dois incisivos laterais inferiores de cada macaco foram extraídos. Um dos incisivos foi colocado no leite e o contralateral na saliva, em tubos de cultura de tecido. Quatro dos seis dentes remanescentes foram imediatamente reimplantados e dois foram deixados a seco por uma hora antes do reimplante. Após uma, duas ou três horas no leite ou na saliva, os dentes foram lavados em solução salina e reimplantados. A contenção foi realizada e, após oito semanas, os animais foram sacrificados. Os dentes foram removidos em bloco, fixados, desmineralizados, embebidos em parafina, seccionados e corados pela hematoxilina e eosina. Todos os cortes foram examinados em microscópio óptico e avaliados de acordo com Andreasen (1975)⁸. Os resultados mostraram mais intensa inflamação no ligamento periodontal dos dentes conservados a seco e que tinham permanecido na saliva por três horas. As reabsorções inflamatórias aumentaram com o tempo de conservação na saliva bem como no leite. A área de reabsorção, após conservação no leite, foi significativamente menor do que após a conservação na saliva, em todos os períodos de tempo. Blomlöf; Lindskog; Hammarström (1981)¹⁷ concluíram que todo dente avulsionado

deveria ser reimplantado imediatamente. Quando isto não for possível, deve ser conservado em um meio com osmolaridade semelhante a do leite; se o leite não estiver disponível, para evitar ressecamento, deve ser armazenado em saliva.

Andreasen, em 1981⁶, utilizou incisivos de macacos para examinar a influência do período de armazenamento extra-alveolar no desenvolvimento de reabsorção. Foram extraídos 151 incisivos laterais inferiores com formação radicular completa. Os meios experimentais utilizados consistiram em diferentes formas de armazenamento: 1. a seco; 2. em solução salina; 3. em saliva; 4. em água de torneira. Após terem sido armazenados por períodos de 0, 18, 30, 60, 90 e 120 minutos, em temperatura ambiente, os dentes foram reimplantados. Os incisivos centrais vizinhos serviram como controle. Os animais foram sacrificados após oito semanas e a porção anterior da maxila foi preparada para exame histométrico. As condições periodontais foram classificadas, segundo Andreasen (1975), em: normal; com inflamação do ligamento periodontal sem reabsorção radicular; reabsorção de superfície; reabsorção inflamatória; reabsorção por substituição (anquilose). Os resultados mostraram que a reabsorção de superfície não foi maior que 11,0% independente das condições de armazenamento. A conservação de dentes em solução salina e saliva foi seguida por uma frequência moderada de reabsorção inflamatória (10,7% a 19,0%), que aumentou após 90 e 120 minutos (24,0% a 31,7%); o armazenamento em água de torneira resultou em 35,0% desse tipo de reabsorção, após 120 minutos. Dentes deixados a seco mostraram alta frequência de reabsorção inflamatória (61,0%), após 30 minutos. A reabsorção por substituição esteve mais relacionada com a exposição dos dentes a seco, tornando-se proeminente (19,5%), após 60 minutos. A água de torneira favoreceu o aumento da reabsorção por substituição que foi de 23,5%, após 120 minutos. Um menor percentual (33,0%) de ligamento periodontal normal foi verificado, após 120 minutos, em dentes colocados em água de torneira, comparando-se ao uso da solução salina e saliva (61,7% e 61,0% respectivamente). Concluiu-se que a preservação de dentes em saliva, antes do reimplante, é importante quando o armazenamento em solução salina, em situação clínica, não for possível.

Lindskog; Blomlöf (1982)³⁹ verificaram *in vitro* os efeitos de

meios de armazenamento com osmolaridades e composições diferentes na viabilidade e integridade da membrana celular. Os meios de conservação utilizados consistiram em água de torneira, solução de sucrose com duas osmolaridades diferentes, saliva humana, leite com baixo teor de gordura, solução salina e meio de cultura de tecido. Foram obtidas culturas de células de ligamento periodontal humano. As soluções experimentais foram adicionadas às placas de cultura incubadas a 20°C, por períodos de 15, 60 e 180 minutos. Foi utilizado um osmômetro para a análise da osmolaridade. As células foram examinadas sob microscopia eletrônica e contadas com o auxílio do hemocítmetro. A osmolaridade do meio de cultura de tecido, solução salina e leite variou entre 242-291 mOsm/kg. A saliva apresentou uma osmolaridade de 71 mOsm/kg e a água de torneira de 16 mOsm/kg. O meio de cultura de tecido manteve a membrana celular intacta e a adesão entre as células. As células armazenadas em solução isotônica de sucrose, em solução salina ou leite mostraram pequenos orifícios nas membranas celulares que apareceram após 15 minutos. A saliva e a solução de sucrose (66 mOsm/kg) determinaram uma marcante redução no número de células, após 15 minutos, bem como o afrouxamento da adesão celular, mas o dano mais severo às membranas foi verificado no armazenamento das células em saliva. Após 60 minutos, a membrana das células do grupo da saliva apresentou sulcos, onde bactérias foram freqüentemente encontradas. O armazenamento de células do ligamento periodontal em água de torneira, por 15 minutos, resultou na completa desintegração da membrana celular. Em relação à viabilidade celular, o armazenamento em leite, em solução salina ou em sucrose isotônica não reduziu acentuadamente o número de células viáveis. Ao contrário, a manutenção das células em saliva, por três horas, proporcionou viabilidade de apenas 10,0%; a solução de sucrose, com 66 mOsm/kg, em período similar, manteve 35,0% de células viáveis. Não houve sobrevivência celular em três horas de armazenamento em água de torneira. Concluíram os autores que a composição do meio de armazenamento seria de menor importância na manutenção da viabilidade e integridade da membrana celular, em períodos superiores a três horas, se esse meio possuísse osmolaridade fisiológica.

Matsson et al. (1982)⁴¹ realizaram um estudo experimental em cães

para determinar se incisivos permanentes avulsionados mantidos a seco e, a seguir, imersos em solução isotônica (solução salina balanceada de Hank), apresentavam melhor reparo do ligamento periodontal. A amostra foi constituída de 36 dentes com formação radicular completa, divididos em seis categorias em condições diferentes de armazenamento extra-alveolar. Foi extraído de cada animal um incisivo para formação de cada uma das seis categorias. Os dentes extraídos foram deixados sob as seguintes condições: 1. a seco, em temperatura ambiente, por períodos de 15, 30 e 60 minutos; 2. em meio úmido (solução salina balanceada de Hank), entre 5°C e 10°C, por 30 e 60 minutos; 3. combinações de exposição a seco, seguida pela conservação em meio úmido. O tratamento endodôntico foi realizado uma semana após o reimplante. Os cães foram sacrificados três meses após o reimplante dos dentes e as pré-maxilas submetidas ao tratamento histológico. As superfícies radiculares seccionadas foram classificadas em: 1. normal; 2. reabsorção com anquiloze; 3. reabsorção sem anquiloze. Os referidos autores observaram que os dentes deixados a seco por 15 minutos, seguidos ou não de armazenamento em meio úmido, bem como aqueles colocados diretamente em solução isotônica mostraram sítios sem reabsorção variando entre 82,0% e 86,0%. Com o aumento do tempo de exposição a seco para 30 minutos, com posterior manutenção dos dentes em meio úmido durante o mesmo período, o nível de sítios normais reduziu para 75,0%. Sessenta minutos de exposição a seco resultou na diminuição de 50,0% de sítios normais. A ausência de anquiloze foi verificada quando os dentes foram deixados a seco por 15 minutos, seguindo-se o armazenamento em solução isotônica por 30 minutos, bem como a imersão direta dos dentes em meio úmido. O aumento do tempo de exposição a seco para 30 minutos com armazenamento em solução de Hank, durante tempo similar, resultou em 5,0% de sítios de reabsorção com anquiloze, o que aumentou consideravelmente para 13,0%, quando os dentes permaneceram a seco por 60 minutos. Concluíram parecer vantajoso que dentes avulsionados, mantidos a seco por 15 minutos ou mais, sejam colocados em solução isotônica por cerca de 30 minutos antes do reimplante.

Blomlöf et al. (1983)²⁰ estudaram o uso do leite como meio de armazenamento para dentes avulsionados durante longos períodos extra-

alveolares. Foram extraídos quarenta incisivos superiores de macacos, submetidos a endodontia fora do alvéolo, antes de serem armazenados e reimplantados. Os meios de conservação utilizados foram leite pasteurizado e saliva humana. Vinte dentes constituíram o grupo do leite e dezesseis dentes o grupo da saliva. Os períodos experimentais foram de duas e seis horas. Oito dentes foram reimplantados imediatamente e quatro dentes deixados a seco, por uma hora. O sacrifício dos animais ocorreu oito semanas após o reimplante dentário. As porções anteriores das maxilas foram preparadas para análise histológica. As reações teciduais foram avaliadas de acordo com a classificação de Andreasen (1975)⁸. O grupo do leite, após seis horas, apresentou reparo periodontal semelhante (79,0%) àquele do grupo da saliva e do leite, após duas horas de armazenamento (85,0% e 90,0%, respectivamente). O reimplante imediato dos dentes resultou em 94,0% de reparo. A reabsorção de superfície foi maior no período de seis horas tanto no grupo da saliva (26,0%) quanto no grupo do leite (21,0%), em relação ao período de duas horas. Esse tipo de reabsorção foi verificado em 14,0% dos dentes armazenados em saliva e em 10,0% dos dentes mantidos no leite. Entretanto, a reabsorção de superfície foi menor no período extra-alveolar de seis horas de armazenamento em leite ou saliva do que no período de uma hora a seco (34,0%). Maiores áreas de anquilose foram encontradas no armazenamento em saliva por seis horas (40,0%) e nos dentes deixados a seco (51,0%). Menores áreas de anquilose foram detectadas no grupo da saliva em duas horas de armazenamento (1,0%). O grupo do leite mostrou ausência de anquilose. Concluíram os autores que o leite é superior à saliva como meio de armazenamento de dentes avulsionados.

Lindskog; Blomlöf; Hammarström (1983)⁴⁰ testaram *in vitro* o leite e a saliva como meio de conservação de dentes de macacos. Os dentes extraídos foram mantidos nos meios por 1, 3 e 6 horas. No grupo controle, os dentes foram extraídos e mantidos em temperatura ambiente, por 60 minutos e, a seguir, em todos os grupos os dentes foram lavados e incubados no meio de cultura com Timidina-H³ por 24 horas. Os dentes foram fixados e preparados para auto-radiografia com a técnica da emulsão líquida. Durante o período de conservação foram medidos a osmolaridade, a condutividade, o pH do meio e o número de bactérias viáveis. Os resultados, no microscópio eletrônico de

varredura, mostraram numerosas bactérias aderidas ao ligamento periodontal, quando o meio de conservação foi a saliva, e nenhuma bactéria foi encontrada quando o meio de conservação foi o leite. A condutividade e pH do leite e da saliva foram similares enquanto a osmolaridade do leite foi muito maior. Os dentes foram seccionados e avaliados com auto-radiografia. A superfície do ligamento periodontal foi rapidamente lesada quando conservada em saliva. Os cementoblastos incorporaram Timidina-H³ após seis horas de conservação no leite, mas não quando conservados na saliva pelo mesmo período de tempo. Os autores concluíram que a baixa osmolaridade combinada com bactérias torna a saliva menos recomendável do que o leite para conservação de dentes avulsionados por longos períodos de tempo.

Portolani (1983)⁴⁹, por sua vez, observou histologicamente as ocorrências pós-operatórias de dentes de ratos reimplantados, após estocagem extra-bucal em leite. Foram constituídos dois grupos, cada um com 33 animais. No grupo controle, o primeiro molar superior esquerdo foi extraído e imediatamente colocado em 10,0 mL de solução salina e, no grupo experimental, os dentes foram imersos em 10,0 mL de leite pasteurizado comercial, em temperatura ambiente. Os períodos de imersão foram de 15 a 30 minutos e 3, 6 e 12 horas para subgrupos constituídos por seis animais, sendo três do grupo controle e três do grupo experimental. A seguir os dentes foram lavados com solução salina e reimplantados. Os animais foram sacrificados aos 15, 30 e 90 dias pós-operatórios, e as peças processadas e coradas pela hematoxilina e eosina para estudo morfológico. Os resultados indicaram que o leite não atuou como meio de preservação da vitalidade do ligamento periodontal em nenhum dos tempos testados. Concluiu-se que o leite não impede a regeneração do ligamento periodontal, não impede a migração do epitélio gengival e direção apical e não contribui para o restabelecimento da aderência epitelial após o reimplante.

Moura (1990)⁴² também avaliou histologicamente o periodonto de dentes de cães reimplantados após estocagem por uma hora em leite pasteurizado, sob diferentes temperaturas. Foram utilizados vinte incisivos de cinco cães, os quais foram divididos em cinco grupos de quatro dentes cada, sendo: grupo I - controle: reimplantados após a extração; II - a temperatura inicial e final do leite foi de 10°C; III - a temperatura inicial do leite foi de 10°C

e a temperatura ambiental foi de 25°C; IV – a temperatura inicial e final do leite foi de 25°C; V – a temperatura inicial e final do leite foi de 37°C. Após o período de estocagem no leite, cada dente foi lavado em solução salina e reimplantado com pressão digital. Em seguida foi realizada a contenção semi-rígida, a qual foi removida após duas semanas. Quatro semanas após o reimplante, os animais foram sacrificados e as peças removidas. Após a descalcificação, as peças foram desidratadas, incluídas em parafina e cortadas longitudinalmente. Os cortes semi-seriados com 6,0µm de espessura foram corados pela hematoxilina de Harris e eosina a 1,0% e pelo Tricrômico de Masson. Os resultados foram apresentados de maneira descritiva, considerando-se os seguintes tipos de reabsorção cemento-dentinária: 1. inativa (sem reparo, parcialmente reparada, reparada); 2. ativa (sem reparo, parcialmente reparada, reparada). A ocorrência de reabsorção inativa foi observada em 20,83% dos terços no grupo I, subiu para 44,44% no grupo II e 45,83% no grupo III e caiu para 20,83% no grupo IV; no grupo V, subiu para 33,33% dos terços analisados. Foi constatado que, nos grupos I e V, não havia reabsorção ativa. No grupo II foi observada reabsorção ativa em 22,22% dos terços analisados, no grupo III em 20,83% e no grupo IV em 12,50%. Concluiu-se que, quanto à ocorrência de reabsorção cemento-dentinária em geral, a temperatura de 25°C ou 37°C ofereceu melhor resultado do que 10°C ou quando esta variou de 10°C a 25°C; quanto à ocorrência de reabsorção cemento-dentinária ativa, a temperatura de 37°C é melhor do que 25°C, no sentido de diminuir sua incidência.

Hiltz; Trope (1991)³⁰ compararam *in vitro* o efeito de meios de conservação de dente avulsionado sobre a vitalidade dos fibroblastos de lábio humano. Foi obtida cultura de célula do lábio humano em placas que foram divididas em três grupos: 1. com Viaspan; 2. com leite integral fresco; 3. com solução salina balanceada de Hank. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por períodos de 2, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 144 e 168 horas. A vitalidade das células em suspensão foi medida em um hemocitômetro usando-se o teste de exclusão pelo azul de tripan. Em duas horas, o Viaspan manteve, em média, a vitalidade celular em 86,0%, o leite preservou em 76,7% e a solução salina balanceada de Hank em 80,6%. Em seis horas, a quantidade de células vitais foi reduzida para 83,7% no Viaspan, 68,2% no leite e 69,8% na solução salina

balanceada de Hank. Em 12 horas o leite reduziu em 56,6% a vitalidade celular, enquanto o Viaspan e a solução salina balanceada de Hank reduziram-na em apenas 27,1% e 29,5%, respectivamente. No período de 24 horas, o Viaspan manteve 76,7% de células vitais, a solução salina balanceada de Hank manteve 71,3%, no entanto, o leite preservou somente 20,2%. O Viaspan reduziu a quantidade de células vitais em 38,8%, em 48 horas, porém a solução salina balanceada de Hank reduziu em 62,0%. O leite reduziu em quase 100,0% sua efetividade em 48 horas. Em 72 horas, o Viaspan manteve 52,7% das células vitais, enquanto a solução salina balanceada de Hank manteve 27,2% e o leite tornou-se não-efetivo a partir desse período. Nos períodos de 144 e 168 horas, apenas o Viaspan foi efetivo mantendo 33,0% e 37,6% de vitalidade celular, respectivamente. Concluíram os pesquisadores que o Viaspan parece ser promissor como um poderoso meio de armazenamento de dente avulsionado.

Nordenvall, em 1992⁴³, relatou o caso de um paciente de 14 anos de idade que sofreu avulsão dentária e foi atendido 12 horas após o acidente. O dente foi armazenado no leite comum resfriado, após 5 a 10 minutos do acidente. Ao chegar à clínica, o dente foi transferido para solução fisiológica em temperatura ambiente e tratado endodonticamente. A raiz foi irrigada abundantemente com solução salina fisiológica, durante todo o procedimento endodôntico, e o dente foi imerso nessa solução até que o alvéolo fosse preparado para o reimplante. Após o reposicionamento dentário, foi colocado no canal radicular a Calasept e realizada uma contenção semi-rígida. O paciente foi instruído acerca da dieta e da higiene; antibióticos e vacina antitetânica foram prescritos. A contenção foi removida após dez dias. O acompanhamento foi feito em 1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 e 48 meses. Aos três meses, o dente apresentava mobilidade normal. Aos seis meses, a mobilidade inexistia, indicando anquilose, mas as radiografias não mostraram ocorrência da reabsorção por substituição, o contorno periodontal permanecia espesso, e o curativo foi trocado. Aos 12 meses, não existia sinal de infraposição, o dente voltou a exibir alguma mobilidade, a percussão na direção axial não era sugestiva da presença de reabsorção por substituição. As radiografias mostraram que a raiz do dente havia estreitado, mas a lâmina dura circundava a raiz completamente. Foi conseguido o selamento apical e o canal radicular obturado. Nos períodos controle de 18, 24,

36 e 48 meses, a situação clínica do dente permaneceu a mesma do controle de 12 meses. A reabsorção de superfície cessou, a partir de dois anos, após o reimplante. Faltando um mês para completar 60 meses de acompanhamento, o dente foi exposto a um novo trauma, causando fratura de raiz e perda do elemento dentário. A raiz foi preparada para o estudo histológico. Sob a microscopia foram observados fragmentos da membrana periodontal com ausência de inflamação, áreas do cimento que haviam sofrido reabsorção e dentina estavam cobertas por células semelhantes a fibroblastos, as lacunas reabsortivas exibiam reparo, mas sítios ativos de reabsorção estavam também presentes. Não foi observada reabsorção por substituição.

Em 1992, Krasner; Person³⁴ realizaram uma pesquisa clínica para determinar se o sucesso dos reimplantes de dentes avulsionados era influenciado pelo armazenamento. Contactaram os cirurgiões-dentistas que prestaram atendimento a 34 pacientes, os quais foram vítimas de traumatismo com avulsão dentária e cujos dentes avulsionados foram transportados por meio do Sistema Emergencial de Preservação de Dente (solução salina balanceada de Hank). Enviaram um questionário a esses profissionais que continha a identificação do paciente, a data da avulsão e a especificação dos dentes, bem como as datas de preservação, os achados clínicos e radiográficos, o tempo decorrido entre a avulsão e a colocação do dente no Sistema e o tempo total decorrido do dente fora do alvéolo. Solicitaram cópias das radiografias para diagnóstico e para acompanhamento. Os dentes foram avaliados clínica e radiograficamente nos intervalos de tempo: 3, 6, 9, 12, 18 e 24-30 meses. Com base nos achados enviados pelos profissionais, os dentes foram divididos em três grupos: 1. sucesso em grande escala; 2. sucesso moderado; 3. insucesso. Os dentes que não apresentaram sinais de reabsorção estavam com mobilidade dentro do normal e sem sintomatologia e foram enquadrados no grupo de sucesso em grande escala sendo 85,3%. Os dentes que mostraram sinal de reabsorção, mobilidade dentro do normal e ausência de sintomatologia foram considerados como sendo do grupo de sucesso moderado sendo 5,9%. Os dentes que apresentaram severa reabsorção e mobilidade anormal constituíram o grupo do insucesso sendo 8,8%. A maior parte dos dentes (97,0%) foi deixada a seco por até 60 minutos antes de serem colocados no Sistema, mas 91,0% foram

englobados nos grupos de sucesso em grande escala (84,8%) e moderado (6,0%). Nesse estudo, 70,6% dos dentes permaneceram fora do alvéolo por períodos entre 61 e 360 minutos, dentre os quais 83,3% foram colocados no sucesso em grande escala e 8,3% foram agrupados no sucesso moderado, sendo que apenas 25,0% daqueles 70,6% permaneceram fora do alvéolo num tempo que excedeu a 120 minutos. Os autores atribuíram o sucesso à acessibilidade a um meio de ótima química e proteção mecânica para dentes avulsionados. Concluíram que os fluidos de preservação e os artifícios de proteção de dente são de difícil acesso no momento do acidente. Defenderam o uso eletivo do Sistema Emergencial de Preservação de Dente.

Ainda em 1992, Trope; Friedman⁵³ examinaram histologicamente o reparo periodontal e a reabsorção radicular de dentes de cães reimplantados, após terem sido armazenados em diferentes meios por variados períodos de tempo. Foram utilizados seis incisivos alternados de 12 cães. Os dentes, após terem sido extraídos, foram armazenados a 4°C nos seguintes meios: 1. Viaspan ou leite, nos intervalos de 6, 12, 24 e 36 horas; 2. Viaspan ou solução salina balanceada de Hank, nos intervalos de 36, 48, 72 e 96 horas. Quatro dentes foram imediatamente reimplantados (controle negativo) e quatro dentes permaneceram a seco por uma hora, antes do reimplante (controle positivo). Após os períodos de armazenamento, o reposicionamento dos dentes foi realizado. Seguindo-se oito semanas, os cães foram sacrificados, e os dentes reimplantados receberam a preparação para o estudo histológico. Os resultados foram obtidos por meio de observação microscópica. O periodonto de cada parte seccionada da superfície radicular foi classificado como apresentando reparo ou reabsorção, de acordo com Andreasen (1987). Os dentes do grupo controle positivo exibiram alta incidência de reabsorção por substituição (89,21%), enquanto os do grupo controle negativo não mostraram qualquer tipo de reabsorção. No grupo do Viaspan, de 6 para 48 horas, a reabsorção por substituição aumentou significativamente, apesar de ter reduzido nos períodos de 72 e 96 horas. Entre 6 e 12 horas, não foi observado nenhum tipo de reabsorção mas, nos períodos de 48 e 96 horas, ocorreu aumento da incidência da reabsorção inflamatória. Os dentes armazenados no Viaspan, durante 6 e 12 horas, apresentaram reparo periodontal completo, similar estatisticamente ao que

foi encontrado nos períodos de 72 e 96 horas. O armazenamento de dentes no leite, por seis horas, resultou em baixa incidência de ambos os tipos de reabsorção; o reparo periodontal mais completo ocorreu nos dentes conservados no Viaspan. Os dentes do grupo da solução salina balanceada de Hank mostraram resultados de reparo periodontal semelhante aos daqueles armazenados no Viaspan. Concluíram os pesquisadores que estudos futuros devem estar direcionados para bactérias e células inflamatórias presentes no alvéolo, atentando-se para determinar a importância delas no sucesso dos reimplantes dentários, após longos períodos de armazenamento em diferentes meios.

Velasco-Bohórquez (1993)⁵⁴ realizou um estudo com o propósito de analisar histologicamente o reparo do periodonto de inserção e da polpa de incisivos superiores de ratos que foram extraídos e imediatamente imersos no leite bovino pasteurizado, em saliva artificial ou na clara do ovo de galinha, antes de serem reimplantados. Foram utilizados 54 ratos, divididos em três grupos de 18 animais. Após a exodontia, os dentes dos animais do grupo I foram colocados, imediatamente, em 35,0 mL de leite bovino. No grupo II, os dentes foram colocados na saliva artificial e, no grupo III, na clara do ovo de galinha. O pH dessas soluções foi determinado registrando, respectivamente, os seguintes valores: 6,69, 6,30 e 9,38. Decorridas duas horas para todos os grupos, cada dente foi removido por sua porção mais coronária, irrigado com soro fisiológico, em seguida com 0,2 mL de Rifocina M 75 mg. Na seqüência, cada dente foi reimplantado. A contenção foi realizada com fio de seda 4-0. Os animais foram sacrificados aos 10, 30 e 60 dias após o reimplante. As peças obtidas foram preparadas e coradas pela hematoxilina e eosina para estudo histológico. Concluiu-se que o leite bovino pasteurizado mantém parcialmente a vitalidade dos remanescentes do ligamento periodontal, contudo, não impede as reabsorções radiculares; a clara do ovo de galinha mantém parcialmente a vitalidade dos remanescentes do ligamento periodontal cementário, só que potencializa as reabsorções; a saliva artificial não mantém a vitalidade dos remanescentes do ligamento periodontal cementário e potencializa as reabsorções sem substituição. Assim, nenhum dos meios estudados manteve a vitalidade das células da polpa; o leite bovino pasteurizado e a clara do ovo de galinha

permitiram a substituição do estroma da polpa por tecido conjuntivo e formação de trabéculas ósseas, e a saliva artificial interferiu na organização do estroma da polpa com formação de microabscessos.

Em 1994, Patil; Dumsha; Sydiskis⁴⁶ examinaram *in vitro* a efetividade do leite e da solução salina, como meios de armazenamento de dente, e a viabilidade das células do ligamento periodontal usando a técnica de coloração do diacetato fluorescente (FDA). Foram extraídos 32 pré-molares de pacientes jovens por razões ortodônticas. Os dentes foram divididos em grupos controle (positivo e negativo) e grupo experimental. Os 12 dentes de cada grupo experimental foram expostos ao ar por dez minutos e a seguir armazenados por duas horas nos meios de conservação que consistiram em: 1. leite (leite integral homogeneizado pasteurizado com vitamina D); 2. solução salina (0,9% de solução salina isotônica estéril para lentes). Os quatro dentes do grupo controle negativo foram deixados a seco por duas horas, a 22°C, e os quatro dentes do controle positivo foram imediatamente tripsinizados, centrifugados no meio de cultura de tecido e armazenados no gelo. A viabilidade das células do ligamento periodontal foi determinada pelo uso de uma solução de diacetato fluorescente a 4°C. As células foram colocadas em contato com o corante, mantidas em local escuro, por 30 minutos, em temperatura ambiente e, a seguir, armazenadas no gelo. O número de células viáveis foi obtido com o uso de um hemocítmetro e sob microscopia com comprimento de onda ultravioleta. Os resultados demonstraram que, após duas horas de armazenamento, não houve diferença significativa entre o número de células viáveis por dente no leite ($9,44 \times 10^5$), na solução salina ($7,83 \times 10^5$) e no controle positivo ($8,65 \times 10^5$). Ao contrário, um número insignificante de células viáveis ($0,29 \times 10^5$) foi observado nos dentes do grupo controle negativo. Concluíram os investigadores que a viabilidade das células do ligamento periodontal pode ser mantida deixando-as dez minutos a seco, seguindo-se com o armazenamento de duas horas em leite ou solução salina. Os resultados sugerem que tanto o leite como a solução salina podem ser considerados meios eficientes de armazenamento de dente avulsionado quando o tempo de preservação não exceder duas horas.

Andreasen; Borum; Andreasen (1995)¹¹ analisaram uma amostra bem documentada clinicamente de incisivos permanentes avulsionados e

reimplantados com formação radicular incompleta, verificando-se o efeito do armazenamento extra-alveolar sobre o desenvolvimento da raiz e sobre a vitalidade da polpa. Foram estudados 28 incisivos, armazenados a seco, em solução salina ou saliva. A classificação relacionada à continuidade de crescimento da raiz, após o reimplante, foi realizada da seguinte forma: 1. normal, quando a raiz alcançou o mesmo comprimento que o do grupo controle (dente homólogo que não sofreu injúria); 2. parcial, se a raiz atingiu um comprimento menor comparado àquela do grupo controle; 3. interrompido, quando o desenvolvimento radicular não progrediu. Os resultados obtidos mostraram que, dos 28 dentes analisados, 15 desenvolveram necrose pulpar, dentre os quais apenas um desenvolveu completa formação radicular; quatro dentes mostraram crescimento radicular parcial e houve interrupção total do crescimento em dez dentes. A formação radicular incompleta ou completa foi significativamente maior na presença de vitalidade pulpar comparada à necrose. Os referidos autores observaram vitalidade pulpar em 13 incisivos, sendo que a formação completa da raiz ocorreu em seis; o desenvolvimento parcial foi verificado em cinco e a interrupção total do crescimento da raiz foi detectada em dois; do total observado, cinco apresentaram anquilose, dez anos após a injúria. Existiu uma tendência de o armazenamento extra-alveolar a seco, por períodos inferiores a 45 minutos, proporcionar formação radicular completa com maior frequência, embora a relação estabelecida entre o armazenamento a seco e em meio úmido não tenha sido significativa.

Fatores clínicos e radiográficos relacionados ao trauma com avulsão, armazenamento extra-alveolar e tratamento subsequente que contribuíram para o reparo do ligamento periodontal foram analisados por Andreasen et al. (1995)¹². Quatrocentos incisivos permanentes avulsionados e reimplantados de pacientes constituíram a amostra desse estudo. Esses dentes foram submetidos a condições de armazenamento a seco e/ou úmido. A amostra foi acompanhada por períodos de até dez anos e analisada com base nas seguintes categorias: 1. reparo periodontal normal; 2. reabsorção de superfície; 3. reabsorção inflamatória; 4. anquilose; 5. combinações (2-4). Dos quatrocentos dentes analisados, o reparo periodontal foi observado em 24,0%, a reabsorção de superfície estava presente em 4,5%, a inflamatória foi detectada em 30,0% e

a reabsorção por substituição ocorreu em 64,0% dos casos. Dos 27 dentes que foram reimplantados imediatamente, cinco foram lavados antes do reimplante, sendo que quatro apresentaram reabsorção, dentre os quais dois lavados em água de torneira e um deles umedecido em saliva. Dos 33 dentes conservados em meio úmido (saliva ou solução salina), dez mostraram reparo, sendo que períodos de armazenamento extra – alveolar em meio úmido superiores a 20 minutos foram acompanhados pela redução do reparo periodontal. A combinação das condições seco/úmido resultou num nível de reparo significativamente menor em dentes armazenados por longos períodos (20 minutos ou mais). Pareceu que a solução salina reduziu consideravelmente o reparo do ligamento periodontal nos grupos de dentes mantidos a seco por períodos superiores a nove minutos. Não houve diferença significativa entre o armazenamento a seco e a combinação seco/solução salina. Dos 36 dentes conservados em água de torneira por até 20 minutos, 27 deles não mostraram reparo periodontal. Dos 14 dentes que foram armazenados em solução salina feita em casa, apenas nove não apresentaram reabsorção. Em todos os dentes colocados em soluções esterilizantes (álcool, cloroamina, Cetavlon, álcool etílico) foi diagnosticada reabsorção. O armazenamento de cinco dentes em sacos plásticos resultou na reabsorção de quatro deles. Concluíram os pesquisadores que, nos casos em que o reimplante imediato não possa ser realizado, o armazenamento na cavidade bucal (saliva) ou em solução salina é preferencialmente indicado.

Carvalho Júnior (1995)²¹ desenvolveu um estudo histológico com o objetivo de avaliar a influência do tempo de imersão de dentes de ratos extraídos e mantidos na clara do ovo de galinha de granja, antes de serem reimplantados. Para realizar o citado trabalho foram utilizados 48 ratos divididos em quatro grupos de doze animais. Após a extração do incisivo superior direito de cada animal, o dente foi irrigado com soro fisiológico. No grupo I, os dentes foram imediatamente reimplantados e nos grupos II, III e IV foram imersos na clara do ovo de galinha de granja por, respectivamente, 1, 3 e 5 horas. O pH da clara do ovo foi determinado após uma hora, pH=9,30, e após três e cinco horas, pH=9,28. Decorridas 1, 3 e 5 horas, os dentes foram irrigados com soro fisiológico e com Rifocina M (75 mg). Em seguida, reimplantados e a contenção

realizada com fio de sutura 4-0. Os animais de cada grupo, em número de quatro, foram sacrificados aos 10, 30 e 60 dias após o reimplante. Cada peça foi fixada em solução de formol a 10,0%, em seguida descalcificada, desidratada, clarificada e, posteriormente, seccionada em três partes, realizando-se dois cortes transversais. As porções foram incluídas em parafinas, cortadas com seis micrometros de espessura e coradas pela hematoxilina e eosina para estudo histológico. Os resultados mostraram que a manutenção do dente em clara do ovo de galinha de granja por 1 hora difere dos mantidos por 3 e 5 horas. As alterações dos fibroblastos, cementoblastos, pericementoblastos e das fibras colágenas foram observadas com o aumento do tempo de imersão. Concluiu-se que, independente dos procedimentos realizados, todos os grupos exibiram quantidade semelhante de ligamento periodontal cementário, mas com diferença de qualidade; a qualidade do ligamento periodontal foi afetada pelo aumento do tempo de imersão; a inflamação do periodonto está relacionada com a lesão na superfície radicular; a clara do ovo de galinha de granja não é favorável para preservar a vitalidade do ligamento periodontal por mais de uma hora e as alterações pulpareas foram maiores quando se aumentou o tempo de manutenção do dente na clara do ovo de galinha de granja.

Alaçam et al. (1996)² compararam a eficácia de vários meios de armazenamento sobre a viabilidade das células do ligamento periodontal pela mensuração da atividade da lactase desidrogenase como índice de morte celular. Foram extraídos 43 pré-molares humanos por razões ortodônticas e divididos em três grupos de 11 dentes. As soluções experimentais consistiram em: 1. solução salina balanceada de Hank; 2. solução Custodiol, utilizada para o transporte de órgãos humanos; 3. solução salina estéril. Os dentes foram imersos em cada solução, imediatamente após a extração. Dez dentes utilizados como controle foram imersos na solução salina balanceada de Hank. A fase de preparação consistiu na raspagem de restos de tecido da superfície da raiz de todos os dentes, excluindo-se uma janela de 0,5cm X 0,5cm em que permaneceram tecidos periodontais. Os períodos usados para mensuração da lactase desidrogenase foram 2, 6, 24, 72 e 168 horas. A atividade dessa enzima foi medida usando-se o Technicon RA-XT de auto-análise. Foi observado o aumento da enzima com o tempo, demonstrando que a morte celular aumentava

com o tempo e esse achado foi estatisticamente significativo. Os níveis da lactase desidrogenase no grupo da solução salina foram significativamente maiores que no grupo da solução salina balanceada de Hank e da solução Custodiol em todos os períodos de tempo. Os grupos da solução salina balanceada de Hank e da solução Custodiol não mostraram diferenças significantes em relação aos níveis de viabilidade celular. Os níveis da enzima no grupo controle foram bem mais baixos, comparados aos grupos experimentais, o que foi estatisticamente significativo. Concluíram os autores que outros estudos serão necessários para determinar a relação entre níveis da lactase desidrogenase e necrose do ligamento periodontal.

Também foi avaliada de forma comparativa, em 1996, por Huang; Remeikis; Danieł¹, a viabilidade das células do ligamento periodontal humano em meios de armazenamento disponíveis. Foram obtidas culturas de células do ligamento periodontal de dentes humanos, expostas a quatro diferentes meios de armazenamento: 1. leite integral (Dominick's vitamin D); 2. solução de lente de contato Alcon Opti-Free (solução salina estéril, 0,05% edetato dissódico e 0,001% poliquaternário); 3. solução de lente de contato K-Mart (solução salina estéril tamponada, ácido sórbico e edetato sódio). A temperatura de incubação (37°C) foi reduzida para 4°C e para 20°C. As células que foram colocadas em contato com a solução salina balanceada de Hank, em temperatura ambiente, faziam parte do grupo controle. As placas de cultura de células com os meios de conservação foram incubadas por 0, 1, 3, 6, 10, 16, 24, 48, 72 e 96 horas. As células foram contadas pela observação direta e por meio de fotografias. Dependendo da morfologia apresentada, as células foram divididas em duas categorias viáveis e não-viáveis. As soluções de lente de contato apresentaram os piores resultados na manutenção de células viáveis em ambas as temperaturas, a maior parte das células tornava-se arredondada e murchava. A solução salina não foi melhor. Após três horas de incubação, nenhuma ou poucas células permaneciam viáveis em ambas as temperaturas. Os melhores resultados foram obtidos com o leite quando a temperatura foi reduzida para 20°C, 78,6% das células permaneceram viáveis, e ao serem reduzidas para 4°C, 38,5% estavam viáveis, no período de uma hora. Após 48 horas, a 4°C, pouquíssimas células mantiveram sua forma original, mas a 20°C uma proporção significativa

(23,6%) de células viáveis foi observada. A solução salina balanceada de Hank (controle) foi a mais eficiente na manutenção da forma original da célula, sendo que 46,8% das células permaneceram aderidas à cultura, após 72 horas. Não foram observadas células aderidas à cultura em qualquer dos meios de armazenamento, após 96 horas. Concluiu-se que o bom meio de armazenamento não deve ser somente capaz de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal, mas estar disponível no local do acidente. O leite, em temperatura ambiente, é um bom meio de armazenamento para as células do ligamento periodontal. Os autores não recomendaram soluções de lente de contato como substituto da solução salina.

Ainda em 1996, Lekic et al.³⁷ examinaram *in vitro* a integridade da membrana celular, a capacidade de adesão e a clonogenicidade das células do ligamento periodontal humano em diferentes temperaturas, períodos de duração extra-alveolar e meios de armazenamento. Foram extraídos 24 pré-molares humanos, conservados em leite, e deixados a seco a 4°C e a 23°C, nos períodos de 15, 30, 60 e 120 minutos. A seguir, foi feita a coleta de células da superfície da raiz. A avaliação das células com membranas intactas foi realizada por meio da coloração com *BCECF/AM* e com o auxílio de um hemocitômetro. A eficiência da adesão celular foi estimada, após intervalos de 3 e 6 horas (obtenção de cultura de células), pela contagem eletrônica de células soltas tripsinizadas dividida pelo número de células unidas. A porcentagem de células com capacidade clonogênica foi avaliada pela contagem do número de colônias formadas, dividido pelo número de células produzidas, multiplicado por 100. Os dentes armazenados no leite e a 4°C exibiram altas porcentagens de células positivas para o corante em relação àqueles deixados a seco e a 23°C. A porcentagem absoluta entre condições mais favoráveis (leite, 4°C, 15 minutos) e menos favoráveis (seco, 23°C, 120 minutos) foi somente de 30,0%. A adesão celular foi significativamente maior em dentes conservados no leite a 4°C. A maior diferença de adesão celular ocorrida entre condições melhores (leite a 4°C) e piores (seco a 4°C) foi de 43,0%. Dentes armazenados no leite e a 4°C mostraram alto percentual de clonogenicidade, enquanto em condições a seco (≥ 30 minutos) ou no leite a 23°C, os valores foram baixos ($< 3,0\%$). Houve uma diferença absoluta de 26,0% analisando-se condições ótimas (leite a 4°C) e

menos favoráveis (seco a 4°C) associadas à capacidade clonogênica. O número de células com membranas intactas, capacidade de adesão e clonogenicidade foi reduzindo com o aumento do período de tempo extra-bucal. Concluíram os autores que a avaliação *in vitro* de viabilidade celular baseada na inclusão do corante não está relacionada intimamente com a sobrevivência clínica dos dentes reimplantados como a capacidade clonogênica, visto que a inclusão do corante mede somente a integridade da membrana.

Soares (1997)⁵¹, por sua vez, avaliou comparativamente a eficácia de diferentes meios de conservação de dentes avulsionados, em relação às suas capacidades de preservação das células e das fibras do ligamento periodontal. Os meios avaliados foram: os leites tipo B e C, a solução fisiológica e a manutenção a seco. Em cada um desses meios foram armazenados, por 120 minutos, cinco pré-molares humanos, extraídos cirurgicamente por indicação ortodôntica. Após esse período, os dentes foram fixados em formol a 10,0%, por 60 dias, e descalcificados para a obtenção de cortes semi-seriados. Como controle, foram utilizados três dentes, fixados logo após a realização das extrações. Após a coloração com hematoxilina e eosina, os cortes foram avaliados qualitativamente através de microscopia óptica. Concluiu-se que existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos de dentes que foram conservados em meio úmido e aqueles que permaneceram a seco; os dentes armazenados em solução salina apresentaram os melhores resultados quanto à viabilidade das células e fibras do ligamento periodontal; a solução fisiológica e o leite tipo C podem ser considerados meios de conservação de dentes avulsionados, e o leite tipo B foi o que apresentou os resultados menos favoráveis.

Um experimento foi realizado por Harkacz; Carnes Jr.; Walker III²⁹, em 1997, para determinar se o fluido de reidratação Gatorade servia como um meio de armazenamento temporário adequado para manter a viabilidade das células do ligamento periodontal de dentes avulsionados e comparar leites com teores de gordura variáveis. Culturas de células foram obtidas do ligamento periodontal de dentes humanos. Os meios de conservação experimentais consistiram de água de torneira (controle negativo), saliva, leite desnatado, leite a 0,5%, a 1,0%, a 2,0% de teor de gordura, leite integral e

Gatorade. As placas de cultura de células com os meios de conservação foram incubadas por 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos. O pH foi medido e a osmolaridade determinada. Os resultados mostraram que o Gatorade não foi capaz de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal, a qual foi reduzida em 15 minutos para 50,0%, em 30 minutos para 15,0% e em 60 minutos para 5,0%. As células do ligamento periodontal incubadas com leite desnatado mantiveram a viabilidade em 75,0% até o período experimental de 210 minutos. A saliva diminuiu a viabilidade das células em 50,0% até 90 minutos, a qual continuou decrescendo e com 210 minutos apenas 25,0% das células se mantiveram viáveis. Noventa por cento das células mantiveram-se viáveis após 30 minutos em leite desnatado ou a 0,5%, enquanto em leite com maior teor de gordura, leite a 2,0% ou integral, a viabilidade foi reduzida para 75,0%. A viabilidade celular também foi significativamente maior após 210 minutos. O Gatorade apresentou pH entre 2,91-2,92 e a osmolaridade de 407 mOsm/L, enquanto o leite apresentou o pH entre 6,63-6,75 e a osmolaridade entre 275-278 mOsm/L. A saliva apresentou o pH entre 6,76 – 7,35 e a osmolaridade de 62 mOsm/L. A água de torneira apresentou o pH entre 7,40 – 7,49 e a osmolaridade de 3mOsm/L. Concluíram os pesquisadores que o Gatorade não foi apropriado como meio de armazenamento de dentes avulsionados, sendo similar à água de torneira. O teor de gordura também afetou a viabilidade das células, sugerindo que leites com menores teores de gordura são mais apropriados.

Em 1997, Hupp et al.³³ avaliaram *in vitro* a vitalidade das células do ligamento periodontal de dentes extraídos de cães indicada pela timidina tritiada, após três períodos de armazenamento em solução salina balanceada de Hank, Viaspan e meio condicionador. Foram utilizados 46 dentes, incisivos e pré-molares de cães. Subseqüentemente às extrações, os dentes foram armazenados nos três diferentes meios, em temperatura ambiente, por períodos de 6, 48 e 96 horas. Os dentes do grupo controle não foram submetidos a períodos de armazenamento. Após terem sido mantidos sob as condições de armazenamento, os dentes foram colocados em meio de cultura de tecido suplementado com timidina tritiada por 24 horas. A seguir foi realizada a preparação histológica. Por meio de auto-radiografias foi medida a quantidade de

células semelhantes a fibroblastos associadas à membrana periodontal remanescente. O número de células mitóticas foi consideravelmente menor em 96 horas, comparando-se com os períodos de 6 e 48 horas, os quais não apresentaram entre si diferenças significantes. Em 96 horas, a solução salina balanceada de Hank e o Viaspan foram significativamente piores na preservação da vitalidade de fibroblastos em relação ao controle e ao meio condicionador. Somente a solução salina balanceada de Hank mostrou um número de células vitais remanescentes significativamente diferente. Concluíram os autores desse estudo que o meio condicionador e o Viaspan devem ser analisados com relação ao reparo de dentes reimplantados.

Pettiette et al. (1997)⁴⁸ examinaram histologicamente o reparo periodontal de dentes extraídos de cães, armazenados a seco e, a seguir, embebidos em meios enriquecidos antes do reimplante. Foram utilizadas 104 raízes de incisivos e pré-molares que foram tratadas endodonticamente antes de serem extraídas. Três grupos de 32 raízes permaneceram a seco por 30, 45 e 60 minutos. Cada um desses grupos foi dividido em quatro subgrupos de oito raízes, sendo que em um deles os dentes permaneciam a seco por determinado período e eram reimplantados sem serem embebidos em solução de armazenamento (controle positivo). Os dentes dos outros três subgrupos foram armazenados a seco durante os períodos mencionados e, posteriormente, colocados por 30 minutos na solução salina balanceada de Hank, no Viaspan ou no meio condicionador, antes de serem reimplantados. Oito raízes adicionais foram extraídas e imediatamente reimplantadas no alvéolo (controle negativo). Seis meses após os reimplantes dentários, os cães foram sacrificados. As superfícies radiculares foram avaliadas e classificadas de acordo com Andreasen, 1987. O melhor reparo periodontal (89,0%) ocorreu no grupo de dentes que foram reimplantados imediatamente. O aumento do tempo de exposição a seco, sem a embebição das raízes nos meios de conservação (controle positivo), resultou na queda progressiva do reparo (72,0% para 39,0% para 31,0%) nos períodos relacionados. O armazenamento no meio condicionador não modificou as condições de reparo obtidas no controle positivo. A embebição das raízes na solução salina balanceada de Hank não favoreceu o reparo após 30 minutos (57,0%) e 45 minutos (23,0%), mas beneficiou o grupo

de 60 minutos (reparo de 49,0%). O Viaspan proporcionou um aumento substancial no reparo em todos os períodos (66,0%, 66,0% e 61,0%, respectivamente). Considerando-se os dentes individualmente, a embebição na solução salina balanceada de Hank ou no meio condicionador não aumentou o número de raízes com bom reparo. O grupo controle positivo, nos períodos de 45 e 60 minutos, resultou em reabsorção significativamente maior que o controle negativo, o que foi também verificado nos subgrupos do meio condicionador. O Viaspan proporcionou o melhor reparo e seus resultados foram iguais àqueles obtidos no controle negativo. Concluíram os autores que: 1. para que seja obtido o nível mais alto de sucesso, o reimplante imediato do dente avulsionado deve ser realizado; 2. um dente avulsionado que foi deixado a seco por 30 minutos deverá ser reimplantado imediatamente sem embebição; 3. dentes que forem deixados a seco por 45 ou 60 minutos poderão ser beneficiados por meio da embebição no Viaspan por 30 minutos.

A conveniência do uso de uma variedade de meios de transporte de dente associada à viabilidade das células do ligamento periodontal, em diversos períodos de tempo, foi pesquisada por Olson et al.⁴⁴, em 1997. Foram obtidas culturas de células do ligamento periodontal de terceiros molares e pré-molares humanos extraídos por razões ortodônticas. Os meios de conservação experimentais consistiram em leite integral, Gatorade, *Save-a-Tooth (SAT)*, *Save-a-Tooth (SAT)* com fator de crescimento. As células expostas ao meio de cultura de tecido constituíram o grupo controle positivo. O grupo controle negativo foi composto de células mantidas a seco. Os autores realizaram o experimento testando os períodos de tempo de 1, 2, 4, 8 e 12 horas. Os resultados foram obtidos medindo-se a densidade óptica das células submetidas ao reagente MTS/PMS (Promega). O Gatorade manteve a menor quantidade de células viáveis de todas as outras soluções experimentais, incluindo-se o controle negativo, o que foi estatisticamente significativo até o período de oito horas. Em uma hora, o *SAT* com o fator de crescimento e a cultura de tecido mantiveram um número significativamente maior de células viáveis que as outras soluções, seguido pelo *SAT* e pelo leite. Em duas horas, o *SAT* com ou sem fator de

crescimento e o leite mostraram-se os mais adequados, após o meio de cultura, na manutenção da viabilidade celular. A partir do intervalo de tempo de quatro horas, o leite destacou-se como a solução testada que manteve o maior número de células viáveis, seguido pelo *SAT* com fator de crescimento e pela cultura de tecido. No período de oito horas, o Gatorade e o *SAT* não foram diferentes na preservação do menor número de células com capacidade clonogênica, comparando-se inclusive com o controle negativo. Em 12 horas, a manutenção a seco, o *SAT* e o Gatorade conservaram um número bem mais baixo de células viáveis que as outras soluções. Concluíram os pesquisadores que o Gatorade não seria um meio de transporte apropriado para dente avulsionado. A adição do fator de crescimento ao *SAT* pode aumentar o número de células viáveis.

Ainda em 1997, Rozenfarb; Kupietzky; Shey⁵⁰ verificaram o efeito de diferentes meios de conservação de dentes na viabilidade de fibroblastos da pele humana e compararam as osmolaridades. As culturas de células foram preparadas em placas e divididas em cinco grupos: 1. com albumina do ovo de galinha; 2. com leite bovino integral pasteurizado; 3. com saliva humana; 4. exposição a seco; 5. com cultura de tecido. Foram adicionados 3,0 mL de meio experimental às placas nos períodos de 15, 45 e 90 minutos. As placas foram examinadas utilizando-se um microscópio de inversão Nikon. A osmolaridade do meio foi mensurada por um osmômetro automático. Os resultados mostraram que, após 15 minutos, não foi observada diferença entre viabilidade de fibroblastos na cultura de tecido (98,6%); na albumina do ovo (81,4%) ou no leite bovino (86,8%); o número de células viáveis não foi reduzido significativamente. Entretanto, células armazenadas na saliva humana apresentaram um decréscimo na viabilidade significativa. A exposição das células a seco resultou na inviabilidade celular após 15 minutos. Depois de 45 minutos, a cultura de tecido preservou a viabilidade celular em 92,8%, enquanto a albumina a preservou em 74,0% e o leite bovino em 80,0%. Seguidos 90 minutos, a cultura de tecido manteve viável as células em 87,6%, a viabilidade diminuiu significativamente no leite (67,6%) e a albumina do ovo de galinha

manteve a viabilidade em 70,2%. A osmolaridade do meio de cultura de tecido, do leite e da albumina do ovo variou entre 251– 298 mOsm/kg, enquanto a saliva mostrou-se hipotônica com uma osmolaridade de 73,0 mOsm/kg. Concluiu-se que a albumina poderia ser a mais adequada solução estéril de armazenamento encontrada em casa.

Doyle; Dumsha; Sydiskis (1998)²⁴ avaliaram *in vitro* o efeito da reidratação de células do ligamento periodontal humano na solução salina balanceada de Hank ou no leite, associado à viabilidade após períodos extra-buciais de exposição a seco. Foram extraídos 49 dentes humanos (molares, pré-molares e dentes anteriores) divididos em nove grupos experimentais e em dois grupos controles. Os períodos de armazenamento a seco, em temperatura ambiente de 22°C, consistiram de 30, 60 e 90 minutos. O período de reidratação na solução salina balanceada de Hank (a 22°C) ou no leite homogeneizado com vitamina D (a 4°C) foi de 15 minutos. Faziam parte do grupo controle positivo as células que não eram deixadas a seco e do grupo controle negativo, as células que eram deixadas a seco por um período de duas horas. A contagem de células viáveis e não viáveis foi feita por meio de um hemocitômetro. A viabilidade celular no grupo controle positivo foi de 51,0%, enquanto no controle negativo foi de 2,7%. No período de 30 minutos, 25,5% das células do grupo mantido apenas a seco permaneceram viáveis, 30,0% das células do grupo reidratado na solução salina balanceada de Hank estavam viáveis, enquanto a reidratação no leite mantinha 21,4% de viabilidade celular. No período de 60 minutos, 20,6% das células do grupo de exposição a seco permaneceram viáveis, 24,7% das células do grupo que foi armazenado na solução salina balanceada de Hank, após a exposição a seco, estavam viáveis e 16,0% de viabilidade foi observada no grupo de células reidratadas no leite. No período de 90 minutos, 7,0% das células do grupo mantido apenas a seco permaneceram viáveis, 8,5% das células do grupo conservado na solução salina balanceada de Hank, após exposição a seco, mantiveram sua viabilidade e 13,7% daquelas reidratadas no leite ficaram viáveis. Concluíram os autores que pesquisa futura,

incluindo estudos *in vitro*, é necessária para a investigação completa dos efeitos benéficos produzidos pela reidratação durante o tratamento de dente avulsionado.

Ainda em 1998, Hupp et al.³² estudaram o reparo histológico de dentes de cães transplantados seguindo-se parâmetros de armazenamento idênticos aos estabelecidos em uma investigação prévia e relataram o reparo histológico do ligamento periodontal relacionado à viabilidade das células indicada pela timidina tritiada. Foram selecionadas 92 raízes de cinco cães. Os canais das 46 raízes antes do transplante foram tratados endodonticamente. Quarenta e seis raízes foram extraídas para fornecerem alvéolos para os subseqüentes transplantes (raízes doadoras), as quais foram armazenadas em meio condicionador com suplemento de timidina tritiada. As raízes, antes de serem transplantadas, foram conservadas no meio condicionador (17 raízes) ou na solução salina balanceada de Hank (16 raízes), sem timidina tritiada, após extração. Os períodos de armazenamento foram 6, 48 e 96 horas. Os dentes foram transplantados para alvéolos receptores pós-extração. Os dentes do grupo controle foram transplantados imediatamente após extração sem armazenamento. Seis meses após o transplante, os cães foram sacrificados e os dentes preparados para avaliação histológica. A aparência da superfície radicular foi classificada de acordo com Andreasen (1987). A porcentagem de completo reparo do ligamento periodontal, reabsorção inflamatória e por substituição de cada grupo foi calculada e estatisticamente comparada. Os resultados mostraram que, no grupo de raízes armazenadas no meio condicionador, o reparo foi consideravelmente maior (71,4%), houve menor reabsorção inflamatória (24,4%) e por substituição (5,2%), em detrimento ao grupo da solução salina balanceada de Hank, que proporcionou um reparo completo do ligamento significativamente menor (41,0%), comparado também ao controle (67,0%), bem como uma reabsorção inflamatória muito maior (45,1%) em relação ao controle (23,0%). As raízes armazenadas em meio condicionador não apresentaram diferenças significantes de reparo comparadas ao grupo controle. Existiu uma correlação positiva entre viabilidade das células do ligamento periodontal,

indicado pela presença da timidina tritiada, e o reparo histológico em dentes armazenados em meio condicionador. Concluiu-se que, embora o meio condicionador possa não ser uma opção prática no momento para o armazenamento de dentes, a confirmação de sua superioridade por pesquisas futuras poderá torná-lo largamente acessível e, então, uma alternativa viável como meio de armazenamento.

A viabilidade das células do ligamento periodontal humano associada a meios de armazenamento foi investigada por Lekic; Kenny; Barrett³⁶, em 1998. Foram extraídos vinte pré-molares por indicação ortodôntica, sendo quinze rapidamente armazenados em saliva recém-colhida a 23°C, por 15 minutos, em copos plásticos envolvidos por gelo. A seguir, os dentes foram divididos em três grupos de cinco, sendo armazenados a 4°C, nos seguintes meios: 1. saliva; 2. leite; 3. solução salina balanceada de Hank. Os cinco dentes restantes serviram como controle positivo e foram imediatamente colocados no meio de Eagle, a 4°C. Os dentes foram mantidos nas condições descritas por 30 e 60 minutos. Foi obtida uma cultura de células de ligamento periodontal. Os resultados foram analisados pela observação em um microscópio invertido. Em 30 minutos, a saliva manteve 7,6% das células viáveis, o que foi reduzido para 1,5% em 60 minutos. A diferença de capacidade clonogênica das células armazenadas no leite ou na solução salina balanceada de Hank não foi significativa em 30 minutos. Porém, em 60 minutos, a solução salina balanceada de Hank manteve 5,9% das células viáveis, enquanto o leite manteve 3,5%. Imediatamente após a extração, o armazenamento no meio de Eagle preservou 21,0% das células viáveis, o que foi reduzido para 16,0% em 60 minutos. Concluíram os pesquisadores que o dente avulsionado armazenado em saliva e transferido, logo que possível, para o leite frio preserva a viabilidade das células e, então, favorece o bom reparo e a retenção do dente reimplantado a longo prazo.

Em 1999, Ashkenazi; Sarnat; Keila¹³ compararam *in vitro* a viabilidade, a mitogenicidade e a capacidade clonogênica das células do

ligamento periodontal humano em seis diferentes meios de armazenamento. Foram obtidas culturas de células do ligamento periodontal de dentes humanos extraídos. Os meios de conservação utilizados consistiram em: 1. leite com baixo teor de gordura (1g/100g); 2. meio de cultura de tecido; 3. meio de Eagle; 4. Viaspan; 5. meio condicionador; 6. solução salina balanceada de Hank. As placas com cultura de células com os meios de armazenamento experimentais foram incubadas a 4°C, por 2, 8 e 24 horas. A capacidade mitogênica das células foi avaliada por meio da incorporação radioativa de timidina. A capacidade clonogênica foi obtida pelo número de colônias formadas dividido pelo número de células produzidas multiplicado por 100, refletindo a probabilidade de cada colônia surgir a partir de uma célula. Em duas horas, o Viaspan e o meio condicionador diminuíram a viabilidade celular em 2,0% e 3,0%, respectivamente, comparando-se ao grupo controle (células incubadas no meio de cultura de tecido a 37°C, 5,0% CO₂). Houve uma redução significativa na viabilidade das células (4,0%-7,0%) armazenadas no meio de Eagle, Viaspan e meio condicionador em oito horas. No período de 24 horas, todos os meios experimentais favoreceram o decréscimo da viabilidade, sendo que o grupo do leite a reduziu em apenas 2,0%, o da solução salina balanceada de Hank em 5,0% e o grupo do Viaspan reduziu em 12,0%. O leite e a solução salina balanceada de Hank mostraram-se melhores que o Viaspan e o meio condicionador em todos os períodos. As células armazenadas no meio de Eagle e na cultura de tecido apresentaram alto índice de agregação, após 24 horas. Com relação à mitogenicidade, no período de duas horas, todos os grupos experimentais apresentaram alta capacidade mitogênica, variando de 10,0% a 50,0% comparando-se ao controle, excetuando o meio condicionador (21,0%). Em oito horas, o Viaspan manteve uma baixa capacidade proliferativa (90,0%), em relação aos outros meios testados. Por outro lado, as células incubadas no leite e na solução salina balanceada de Hank mostraram maior mitogenicidade (115,0% e 107,0%) que as do grupo controle (100,0%). Após 24 horas de incubação, a capacidade proliferativa reduziu significativamente no

grupo do Viaspan (61,5%), do meio condicionador (76,0%), do meio de Eagle (81,0%) e do meio de cultura (83,5%); apenas o leite e a solução salina balanceada de Hank mostraram resultados comparáveis ao controle (97,0% e 102,0%, respectivamente). Na análise da capacidade clonogênica, essa foi reduzida significativamente apenas após 24 horas, exceto no grupo do leite. As células armazenadas no leite e na solução salina balanceada de Hank mantiveram alta capacidade clonogênica comparando-se com outros meios experimentais, mas reduzida em 38,0% em relação ao controle. A clonogenicidade dos fibroblastos armazenados no leite, após duas e oito horas, foi relativamente baixa comparando-se com os outros meios testados, entretanto, após 24 horas, foi reduzida em 14,0%, enquanto os outros meios reduziram de 40,0% a 77,0%, significando que o leite, em 24 horas, apresentou alta capacidade clonogênica (7,5%). Concluíram os autores dessa investigação que a redução na viabilidade, quando avaliada exclusivamente pelo teste de azul de tripan, não mostrou correlação com a efetividade clínica do meio de armazenamento de dente. A mitogenicidade e a capacidade clonogênica mostraram resultados diferentes, mas o teste de clonogenicidade mostrou diferenças estatísticas mais sensíveis entre os vários meios e períodos de incubação testados. A solução salina balanceada de Hank foi o meio mais efetivo na preservação da viabilidade, mitogenicidade e capacidade clonogênica dos fibroblastos armazenados a 4°C, após 24 horas, seguida pelo leite.

Lin et al.³⁸, em 2000, investigaram *in vitro* se o fenótipo das células recolonizadoras da superfície da raiz de um dente extraído era afetado pelas condições de armazenamento. Foram utilizados pré-molares humanos extraídos por razões ortodônticas, divididos em quatro diferentes condições experimentais: 1. armazenamento em cultura de tecido - ∞ MEM (úmido) a 4°C, por 30 e 120 minutos; 2. exposição a seco por 30 e 120 minutos. As culturas de células foram obtidas de ligamento periodontal humano. Utilizaram a análise imunohistoquímica para a detecção de células osteogênicas e fibrogênicas no espaço periodontal pela coloração de proteínas intra celulares identificadoras. A

técnica da imunofluorescência foi empregada por meio do uso de anticorpos específicos. Após a coloração intra nuclear, as células foram incubadas por dez minutos, em temperatura ambiente. Os resultados foram obtidos pela observação feita num microscópio fluorescente e por meio de fotografias. A intensidade do brilho nas células foi estimada por um fotômetro. Os resultados indicaram que não houve diferença na intensidade de coloração para o colágeno tipo III, que exibiu um brilho moderado nas diferentes condições de armazenamento. O padrão de coloração para o colágeno tipo XII foi mais intenso nas células do ligamento periodontal conservadas em meio úmido. Houve um aumento da expressão da actina do músculo liso no grupo de células deixado a seco por 30 minutos, comparadas ao grupo conservado no meio úmido. As células que foram deixadas a seco por 120 minutos apresentaram coloração mais intensa para a osteopoetina e fosfatase alcalina. Concluíram os investigadores que uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no reparo do ligamento periodontal traumatizado pode conduzir a meios de tratamento mais racionais, após lesão ao periodonto, e que a otimização dos meios poderá promover a sobrevivência de células necessárias para o reparo e regeneração do ligamento periodontal.

Panzarini; Saad Neto (2001)⁴⁵ realizaram um estudo piloto com o objetivo de verificar a influência da gelatina incolor com maior ou menor diluição de água como meio para manter a integridade do ligamento periodontal cementário. Como parâmetros comparativos foram empregados o leite bovino pasteurizado e a manutenção do dente em meio ambiente. Foram utilizados vinte ratos para a realização deste estudo. Os dentes extraídos foram imediatamente imersos, em número de cinco, em três meios: leite bovino pasteurizado, gelatina e gelatina com maior diluição de água. Os dentes foram mantidos por três horas em geladeira a 14°C e após três horas em meio ambiente ($\pm 26^\circ\text{C}$). Os dentes mantidos em meio ambiente sobre a bancada permaneceram por seis horas e constituíram o quarto grupo experimental e de controle. Os autores concluíram que o emprego da gelatina com diluição recomendada pelo fabricante ou a mais diluída em água apresentaram resultados inferiores aos observados com leite

bovino pasteurizado. Constataram que a gelatina com maior diluição de água quando comparada com a convencional preservou melhor os remanescentes do ligamento periodontal cementário.

Aguiar (2002)¹ propôs-se a avaliar, através de estudo histológico, a influência da solução de água de coco verde sobre a superfície radicular de dentes extraídos e reimplantados, quando comparada ao leite pasteurizado em relação à presença e à natureza da reabsorção radicular e da anquiose, por períodos de tempo determinados. Foram utilizados oitenta ratos (*Rattus norvegicus*, *Albinus Wistar*), do sexo masculino, que tiveram seus dentes extraídos, armazenados nas soluções propostas e em seguida reimplantados. Os ratos foram divididos em grupos conforme o tipo de solução e tempo de armazenagem: grupo I (leite pasteurizado; trinta minutos), grupo II (leite pasteurizado; noventa minutos), grupo III (água de coco verde *in natura*; trinta minutos) e grupo IV (água de coco verde *in natura*; noventa minutos). Os animais de cada grupo foram sacrificados, nos períodos de 10, 30, 60 e 90 dias. Os resultados obtidos mostraram que a reabsorção inflamatória foi o fenômeno mais freqüente, em especial no grupo III. Os dentes conservados em leite pasteurizado por 30 minutos e aqueles imersos em água de coco por noventa minutos demonstraram baixos índices de reabsorção e anquiose quando comparados com aqueles dos demais grupos. O autor concluiu que há forte influência do meio e do período de permanência extra-alveolar sobre o reparo periodontal dos dentes reimplantados. Foi observada uma relação inversamente proporcional entre a presença da reabsorção superficial e o aparecimento das demais reabsorções. Independente do grupo avaliado, a maioria dos espécimes exibiu reabsorção radicular.

Em 2003, Pearson et al.⁴⁶ desenvolveram um experimento para determinar a eficácia de vários substitutos do leite comparados ao leite bovino, na manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal de dentes humanos avulsionados. As células do ligamento periodontal foram obtidas de terceiros molares, extraídos recentemente e cultivadas no meio de Eagle. Os

meios foram colocados no refrigerador com leite (controle positivo), leite reconstituído com vitaminas, leite em pó ou um dos leites com formulações de bebês (Similac ou Enfamil). A água de torneira foi usada como controle negativo. As culturas foram incubadas com o meio experimental a 37°C por 1, 2, 4 ou 8 horas. A viabilidade das células foi determinada pela proliferação celular, com absorbância de 450nm. Os resultados indicaram que em uma hora não houve diferença estatisticamente significante entre a viabilidade das células do leite e dos seus substitutos. Em duas horas, o Enfamil e o Similac apresentaram-se significativamente melhores que o leite, todos os outros leites em pó e substitutos mostraram-se piores. Em oito horas, todos os substitutos foram inferiores ao leite. Os resultados sugerem que o Enfamil, que é um leite enriquecido, que não requer conservação e tem uma validade de dezoito meses, é o meio mais efetivo para conservação de dentes avulsionados quando comparado ao leite pasteurizado por até no mínimo quatro horas.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste experimento é avaliar microscopicamente o ligamento periodontal humano, aderido ao dente extraído, após o período de tempo extra-alveolar de uma hora, tendo sido utilizados como meios de conservação o leite bovino pasteurizado, a clara do ovo de galinha e a saliva artificial.

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTOS CLÍNICOS

Para este experimento foram selecionados pacientes que tinham pré molares superiores e inferiores com indicação de extração, por finalidade ortodôntica. Através de exame clínico e radiográfico foram selecionados quarenta pré molares hígidos, uni ou birradiculados com vitalidade pulpar, com rizogênese completa e com integridade periodontal.

Os pacientes, de ambos os sexos e na faixa etária entre 12 e 25 anos, foram provenientes da Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista e da Clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

Previamente aos procedimentos os pacientes foram esclarecidos e assinaram um consentimento informado e uma autorização (Anexo I), concordando em contribuir com este estudo.

Obtida a autorização do paciente e munido da indicação, por escrito, de exodontia dos pré molares, feita pelo ortodontista (Anexo II), foram iniciados os procedimentos clínicos com a realização da anti-sepsia extra bucal com álcool-iodado a 0,3%. Para a anti-sepsia intra bucal o paciente fez bochecho com Periogard (Gluconato de Clorexidina a 0,12% - Colgate Palmolive - Osasco, SP). Posteriormente, o dente indicado foi anestesiado, realizada a sindesmotomia, luxação seguida da extração a fórceps, de maneira menos traumática possível, evitando a ocorrência de fratura radicular e da tábua óssea. Após a exodontia, foi realizada a sutura e os pacientes receberam as recomendações pós-operatórias de rotina. Em seguida à remoção das suturas, no sexto dia pós-operatório, o paciente foi reencaminhado ao ortodontista.

Todo material e instrumental utilizados neste experimento foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos.

4.2 TRATAMENTO DOS DENTES EXTRAÍDOS

Após a exodontia, o dente foi deixado a seco por 10 minutos, sobre uma gaze esterilizada, em temperatura ambiente (29°C), para, a seguir, ser transferido, segurando-o pela sua coroa com auxílio de uma pinça clínica para um recipiente de plástico, de tamanho e forma iguais para todos os grupos, devidamente rotulado e contendo 30,0 mL do meio de conservação a ser testado. Os meios foram mantidos em temperatura ambiente antes do início do experimento.

Assim, foram constituídos quatro grupos com dez dentes cada, a saber:

Grupo I - Emprego de leite pasteurizado comercial (Parmalat integral, São Paulo, S.P.)

Grupo II - Emprego da clara do ovo de galinha (Granja Saito, ovos tipo grande, Bela Vista de Goiás, GO.)

Grupo III - Emprego de saliva artificial (Apothecário-Farmácia de Manipulação – Araçatuba – S.P.)

Grupo IV - Grupo de controle, sendo os dentes extraídos colocados imediatamente no recipiente com formol neutro a 10,0%.

Decorrido o período de tempo pré-estabelecido de 60 minutos, segurando-se a porção coronária com uma pinça, os dentes dos grupos I, II e III foram lavados com 10,0 mL de soro fisiológico (Cloreto de Sódio 0,9% - In Halex Istar – Indústria Brasileira, Goiânia – GO.) empregando-se seringa tipo Luer e agulha hipodérmica 30x4. Imediatamente foram transferidos para frascos de plástico, individuais, devidamente identificados, contendo 30,0 mL de formol neutro a 10,0% e mantidos no mínimo por 48 horas . A seguir foram encaminhados para o Laboratório de Microscopia do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista, para estudo microscópico .

4.3 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

Após a fixação no formol neutro a 10,0%, as peças foram lavadas em água corrente e, a seguir, foram submetidas ao processo de desmineralização em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA – Dinâmica Reagentes Analíticos). Decorridos sessenta dias, foi considerado finalizado o processo de desmineralização, quando a raiz dentária se apresentou com consistência borrachóide, sem resistência ao corte por uma lâmina de microtomia.

Finalizando o processo de descalcificação, os dentes foram seccionados em três partes, realizando-se três cortes transversais. Esses cortes permitiram a divisão aproximada dos dentes em terços cervical, médio e apical. Em seguida, os terços passaram por desidratação, diafanização e imersão em parafina, para posterior inclusão em blocos de parafina. Cortes semi-seriados de seis micrômetros de espessura foram obtidos utilizando-se um micrótomo. Os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina para o estudo da microscopia.

4.4 PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DOS RESULTADOS

Os cortes microscópicos, sendo três amostras de cada dente em um total de trinta amostras de cada grupo, foram avaliados com auxílio de um microscópio (Carl Zeiss, Alemanha) com um aumento de 20X e 40X. A análise dos resultados foi realizada de forma descritiva e quantitativa.

4.4.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Procedeu-se à descrição dos fenômenos histopatológicos, sendo todos os eventos relatados e relacionados de acordo com cada grupo (Anexo III).

4.4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

Um corte de cada terço foi submetido a uma análise quantitativa, sendo selecionados três campos para a contagem de células por mm^2 .

O número de células do ligamento periodontal foi quantificado por meio de análise morfométrica, utilizando microscópio óptico contendo um retículo de integração em rede quadrada (Carl Zeiss, Alemanha – 4740680000000). Uma lente objetiva de 40X foi utilizada para a contagem. O lado (L) do retículo de integração, obtido por meio de uma lâmina milimetrada, corresponde a 0,31mm. Determinou-se a área do retículo (A) pela expressão matemática $A=(L^2)$ o que resultou em $A=0,0961\text{mm}^2$.

Para cada amostra foi analisada uma área total de $0,058\text{mm}^2$, as células do ligamento periodontal foram quantificadas nos terços cervical, médio e apical de cada amostra, sendo contadas as células mais superficiais de três campos, correspondendo a duas fileiras de dez quadrados, totalizando sessenta quadrados por amostra. Foi registrado o número total de células do ligamento periodontal encontrado na área total percorrida e dividido este número por esta área, obtendo-se o número de células por milímetro quadrado (mm^2).

4.4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A média do número de células do ligamento periodontal por mm^2 e respectivos desvios-padrões, observados em cada terço e em cada grupo, foi analisada e trabalhada estatisticamente, por meio de análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey. O valor do nível de significância considerado foi quando menor que 0,05.

4.5 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

Por meio da microscopia óptica foi realizada uma análise descritiva das células e fibras do ligamento periodontal. Foram observadas a aderência dos remanescentes do ligamento periodontal ao cimento, a organização dos feixes de fibras colágenas, a celularidade, as características dos vasos sanguíneos e a presença ou ausência de áreas de necrose (anexo III).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Todos os espécimes, independentemente do meio de conservação anterior à fixação em formol tamponado a 10,0%, exibem desgarramento e áreas de compressão do ligamento periodontal.

Na análise qualitativa e quantitativa foram avaliadas mais especificamente áreas tecnicamente melhor processadas, em que o ligamento periodontal manteve-se aderido ao cimento e não mostrava alterações decorrentes do processamento.

O tecido conjuntivo próprio do ligamento periodontal é formado por um estroma de fibras (essencialmente constituído por feixes de fibras colágenas – 90,0%) e de substância fundamental, em que as células, os vasos sanguíneos e os linfáticos e as fibras nervosas estão entrelaçados.

5.1.1 GRUPO I – LEITE BOVINO PASTEURIZADO

Os dentes deixados a seco por dez minutos e, a seguir, mantidos no leite bovino pasteurizado por uma hora apresentam o tecido conjuntivo do ligamento periodontal com feixes de fibras colágenas nítidos e com orientação inicialmente perpendicular. Em seguida, apresentam-se com orientação encurvada, envolvendo feixes de capilares e vênulas. O ligamento periodontal mostra-se com celularidade preservada, com esparsas áreas onde patenteia-se uma redução no número de fibroblastos.

Estas alterações são observadas em áreas descontínuas e ocorrem em todos os níveis submetidos à análise (Fig.1 e 2 – Terço cervical; Fig.3 e 4 – Terço médio; Fig. 5 e 6 – Terço apical). Quando a redução da celularidade é perceptível, também os feixes de fibras colágenas perdem sua nitidez e orientação.

Os vasos sangüíneos por vezes mostram-se dilatados, mas com endotélio preservado. Os restos epiteliais de Mallassez são perceptíveis e bem preservados. Os cementoblastos são pouco evidenciados.

5.1.2 GRUPO II – CLARA DO OVO DE GALINHA

Os dentes deixados a seco por dez minutos e, a seguir, mantidos na clara do ovo de galinha por uma hora apresentam o tecido conjuntivo do ligamento periodontal com feixes de fibras colágenas nítidos e com orientação perpendicular, em seguida tornando-se tangentes à superfície dentária. Simultaneamente, aparecem encurvados envolvendo feixes de capilares e vênulas.

O tecido conjuntivo do ligamento periodontal apresenta uma redução do número de células em algumas áreas. Esses campos com mais baixa celularidade ocorrem em todos os terços analisados (Fig. 7 e 8 – Terço cervical; Fig. 9 e 10 – Terço médio; Fig. 11 e 12 – Terço apical). Os feixes de fibras colágenas, nessas áreas apresentam-se desorganizados.

Os vasos sangüíneos estão preservados, ocasionalmente dilatados, e exibem redução do número de células endoteliais. Os restos epiteliais de Mallassez podem ser observados. Os cementoblastos são pouco evidenciados.

5.1.3 GRUPO III – SALIVA ARTIFICIAL

Os dentes deixados a seco por dez minutos e, a seguir, mantidos na saliva artificial por uma hora apresentam o tecido conjuntivo do ligamento com feixes de fibras colágenas nítidos e com orientação perpendicular, em seguida tornando-se mais tangentes, paralelos, com áreas de desorganização e com espaços entre as fibras.

O tecido conjuntivo exibe uma expressiva redução na celularidade, sendo que as áreas de celularidade reduzida ocorrem de maneira descontínua e tem intensidade variável, em todos os terços analisados (Fig. 13 e 14 – Terço cervical; Fig. 15 e 16 – Terço médio; Fig. 17 e 18 – Terço apical).

Em alguns campos podem ser identificados *fantasmas* de células. Nessas áreas os feixes de fibras colágenas perdem sua nitidez e apresentam-se menos preservados.

Os vasos sanguíneos têm um calibre variável e por vezes mostram-se dilatados, e com redução do número de células endoteliais. Os restos epiteliais de Mallassez estão perceptíveis e preservados. Os cementoblastos são pouco identificados.

5.1.4 GRUPO IV – CONTROLE

Os dentes extraídos e imersos, imediatamente, no formol tamponado a 10,0% apresentam o tecido conjuntivo do ligamento periodontal bem preservado. A partir do cimento, os feixes de fibras colágenas mostram-se bem nítidos e com orientação perpendicular. Em seguida, revelam-se encurvados, envolvendo feixes de capilares e vênulas.

O tecido conjuntivo apresenta-se com grande número de células, rico em fibroblastos, em todos os terços analisados (Fig. 19 e 20 – Terço cervical; Fig. 21 e 22 – Terço médio; Fig. 23 e 24 – Terço apical), os vasos sanguíneos apresentam-se com endotélio evidenciado e preservado, e pode ser observada a presença de pequenos agregados epiteliais identificados como restos de Mallassez. Os cementoblastos são pouco evidenciados.

5.2. ILUSTRAÇÕES DA ANÁLISE DESCRITIVA

5.2.1. GRUPO I- LEITE BOVINO PASTEURIZADO

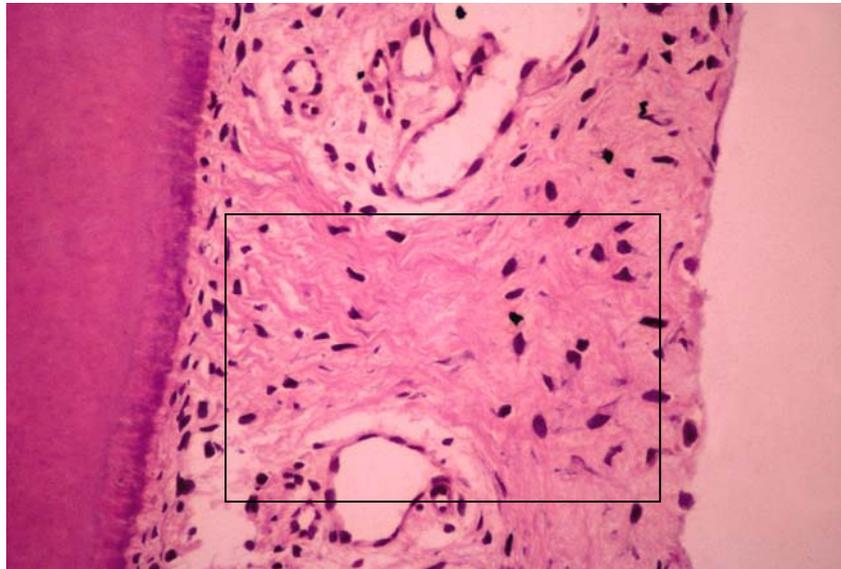


Figura 1 - Terço cervical- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Celularidade preservada, mas com esparsas áreas de redução do número de fibroblastos (HE- 20X)

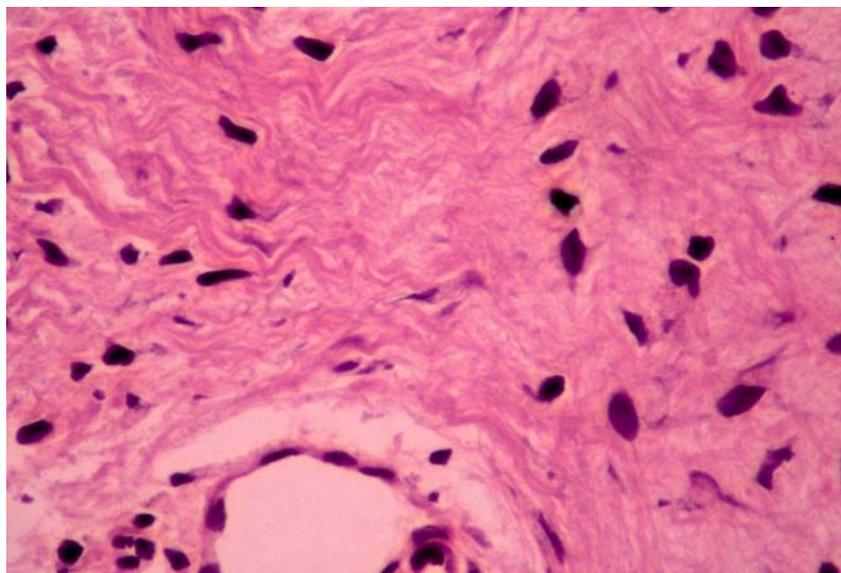


Figura 2 - Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

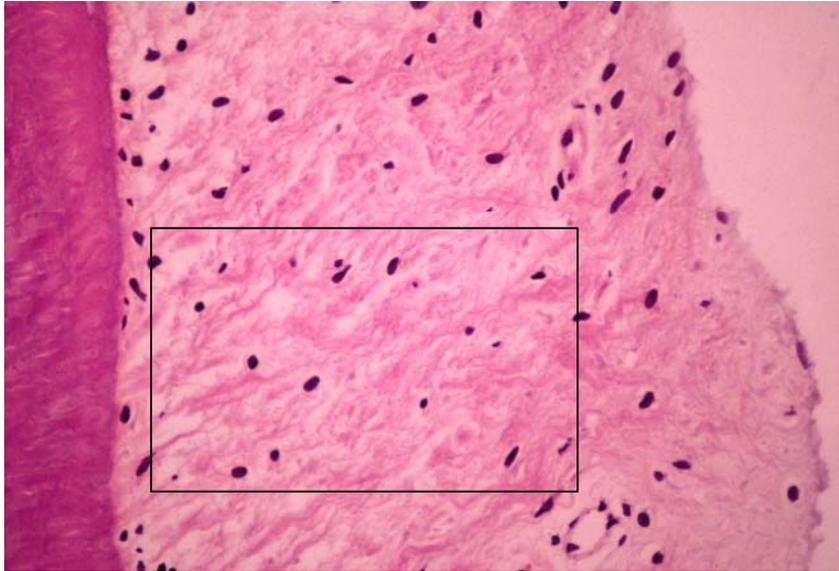


Figura 3 - Terço médio- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Redução da celularidade e discreta perda da nitidez das fibras colágenas (HE- 20X)

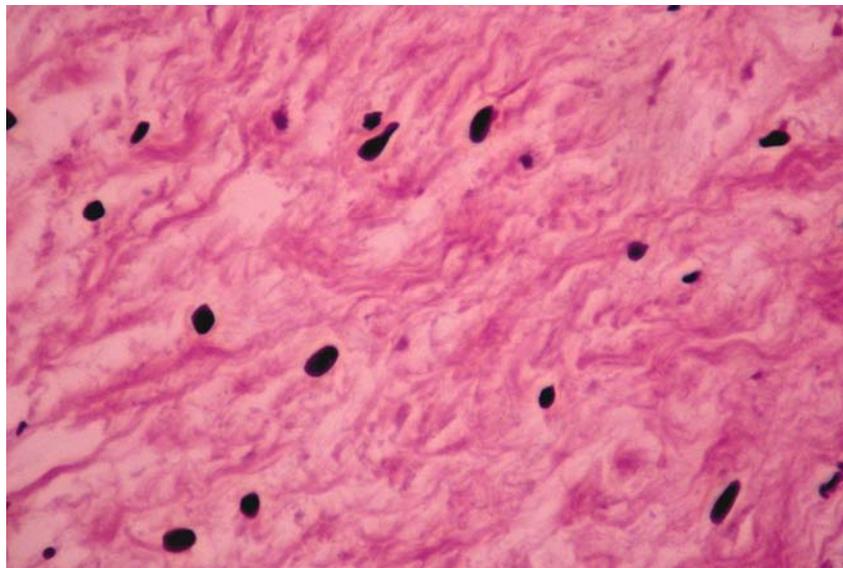


Figura 4 - Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

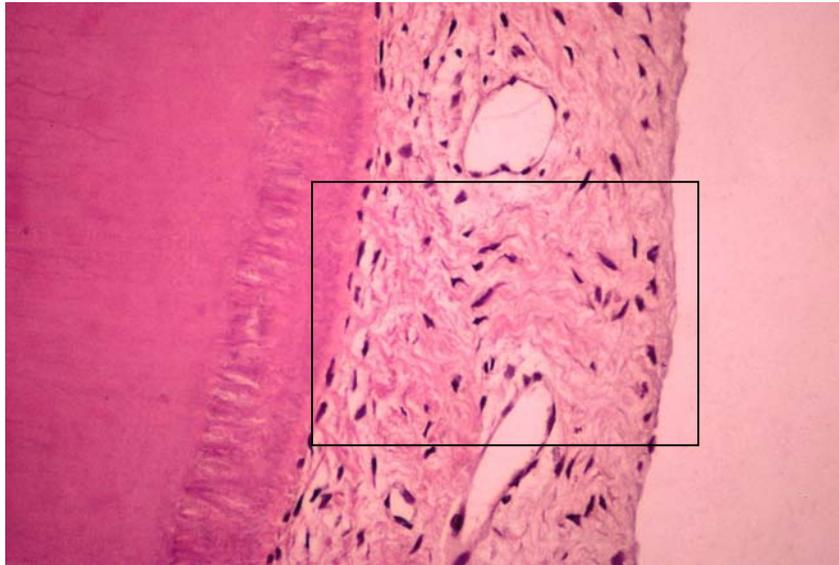


Figura 5- Terço apical- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Celularidade preservada, mas com esparsas áreas de redução do número de fibroblastos e vasos dilatados com endotélio preservado (HE-20X)

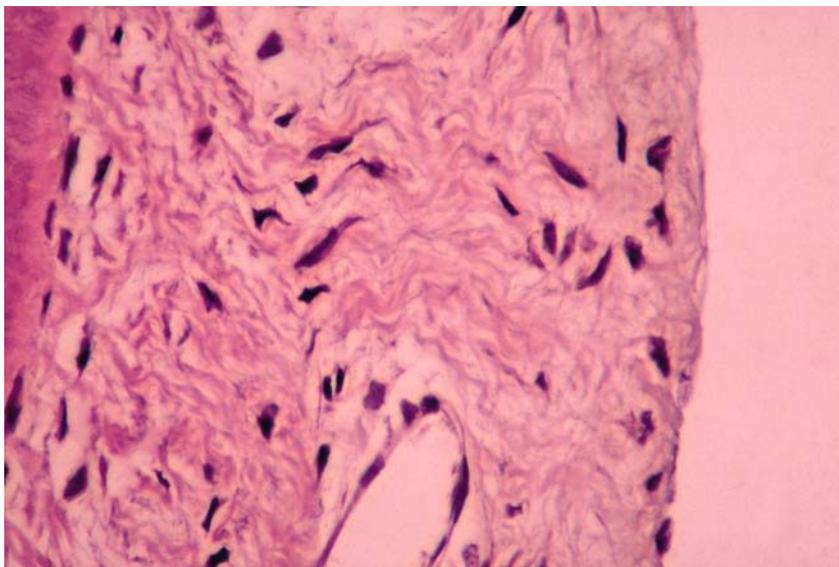


Figura 6- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE-40X)

5.2.2. GRUPO II- CLARA DO OVO DE GALINHA

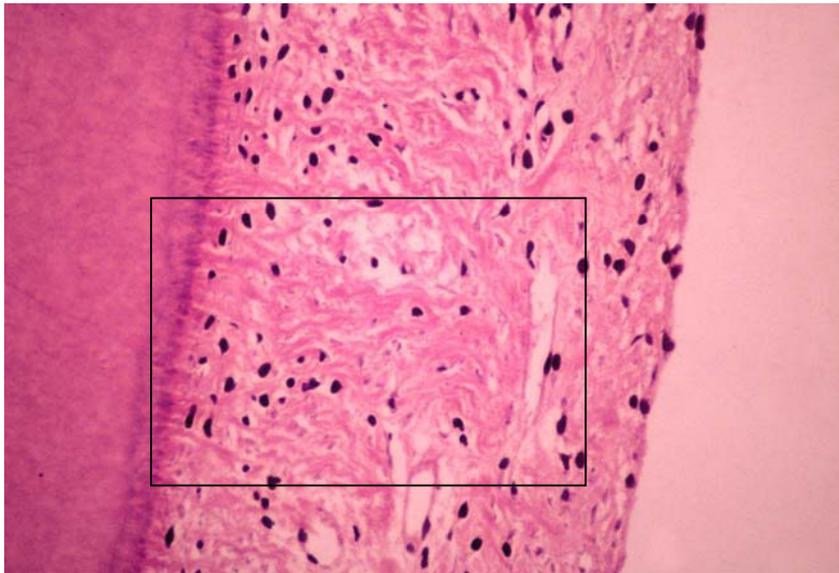


Figura 7 - Terço cervical- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Redução do número de fibroblastos, de células endoteliais e desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE- 20X)

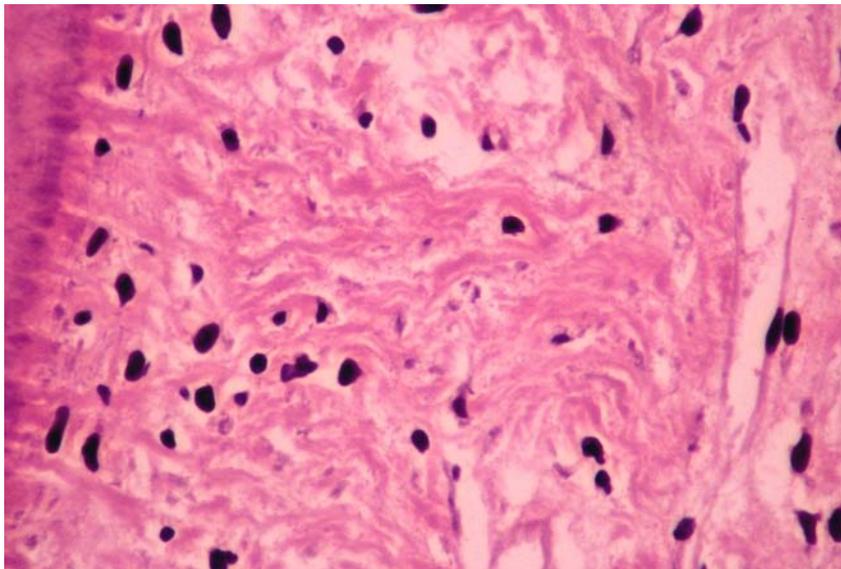


Figura 8 - Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

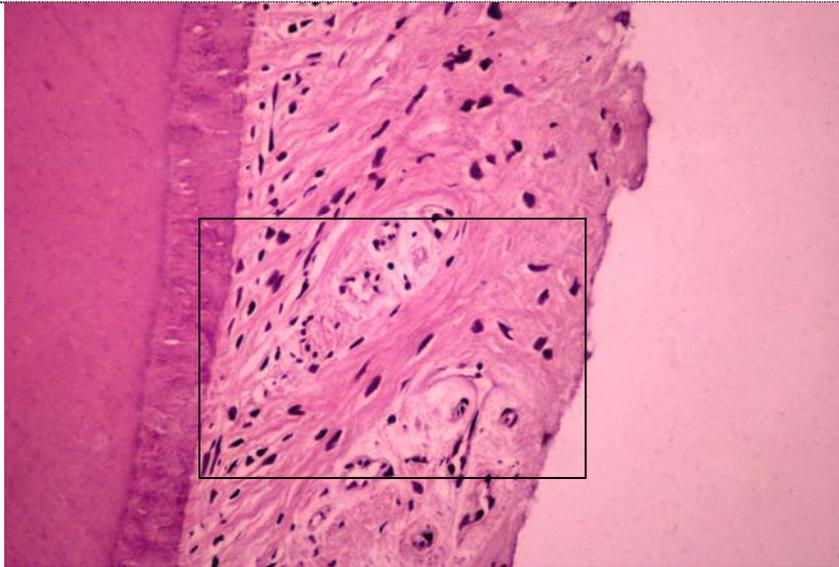


Figura 9 - Terço médio- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Redução do número de fibroblastos e feixes de fibras colágenas envolvendo capilares e vênulas (HE- 20X)

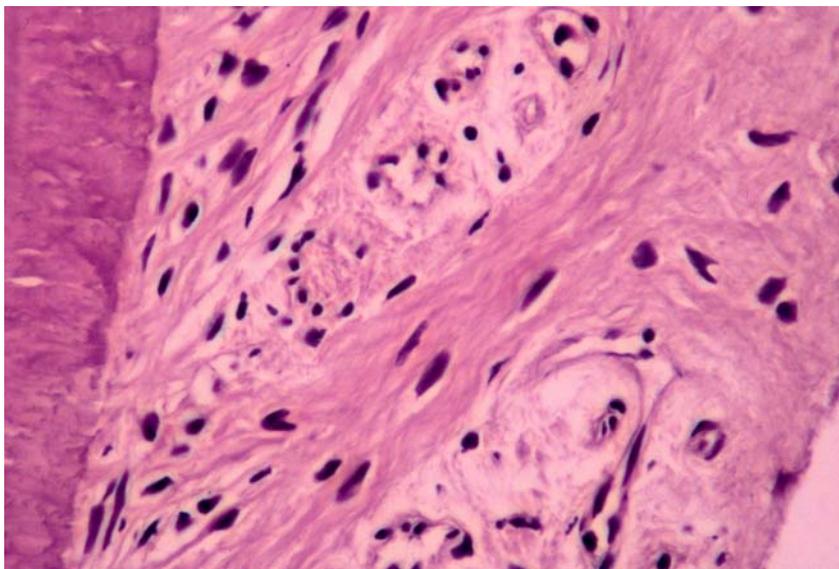


Figura 10 - Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

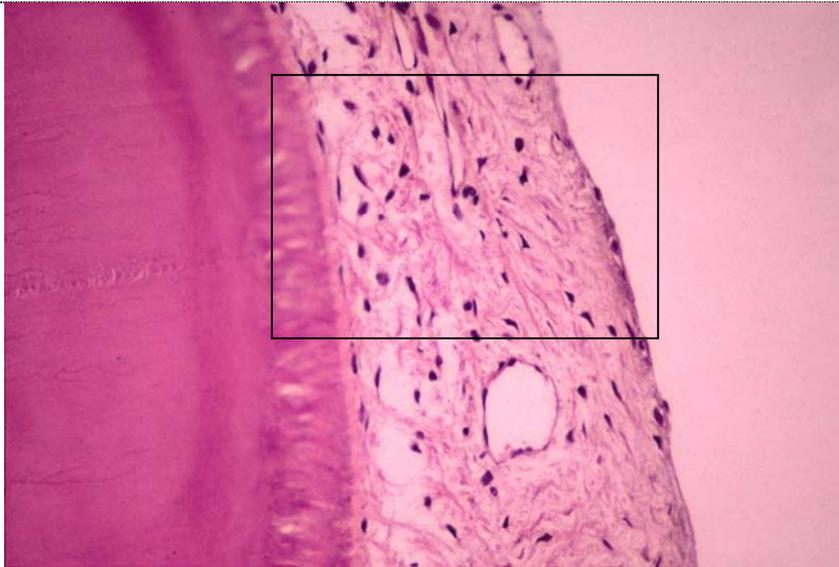


Figura 11-Terço apical- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Redução do número de fibroblastos e desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE- 20X)

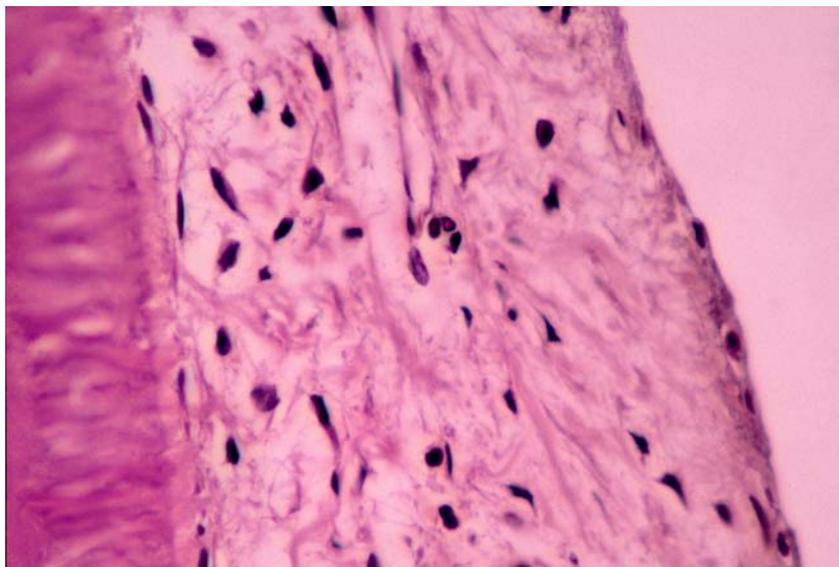


Figura 12- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

5.2.3. GRUPO III- SALIVA ARTIFICIAL

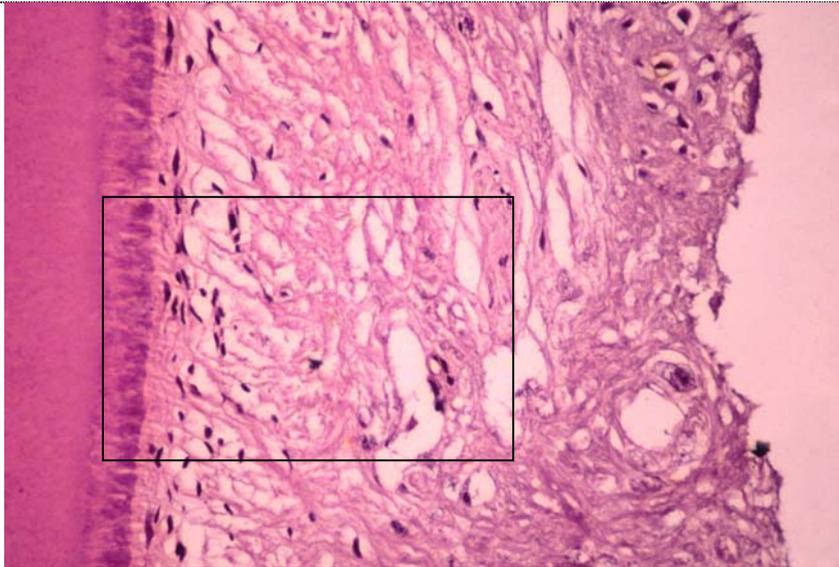


Figura 13- Terço cervical- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Expressiva redução do número de fibroblastos, de células endoteliais e importante desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE- 20X)

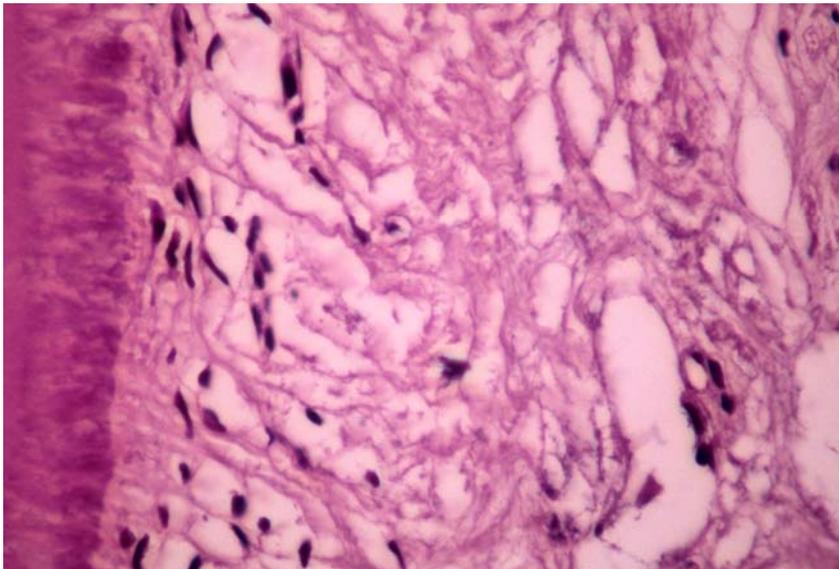


Figura 14- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

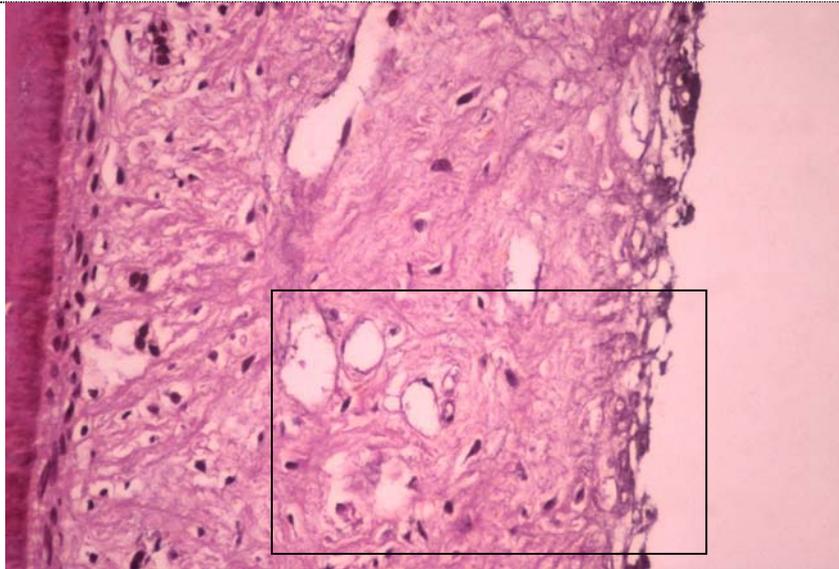


Figura 15-Terço médio- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Expressiva redução do número de fibroblastos, de células endoteliais e importante desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE- 20X)

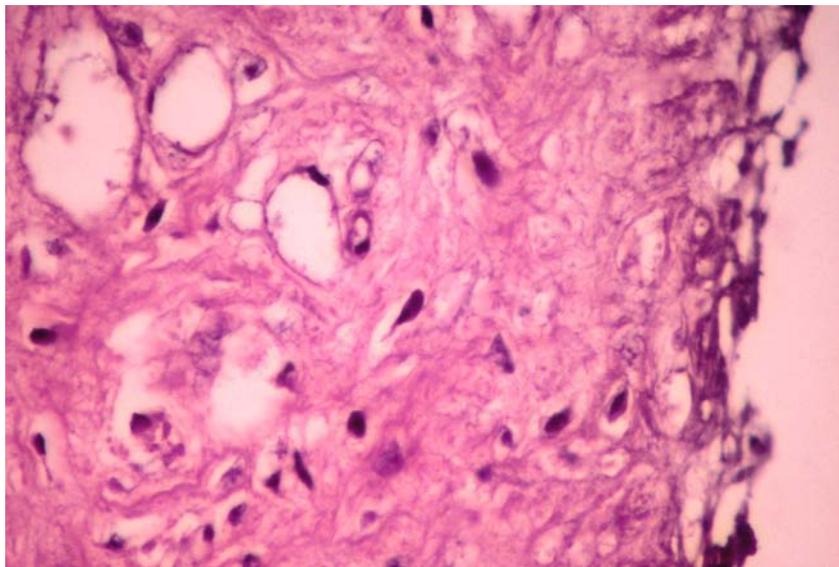


Figura 16- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

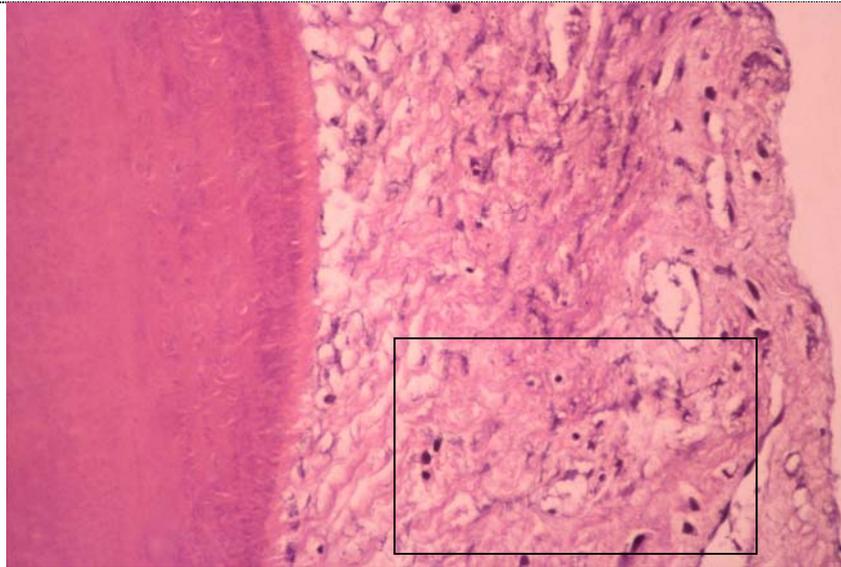


Figura 17-Terço apical- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Expressiva redução do número de fibroblastos, presença de restos celulares e importante desorganização dos feixes de fibras colágenas (HE- 20X)

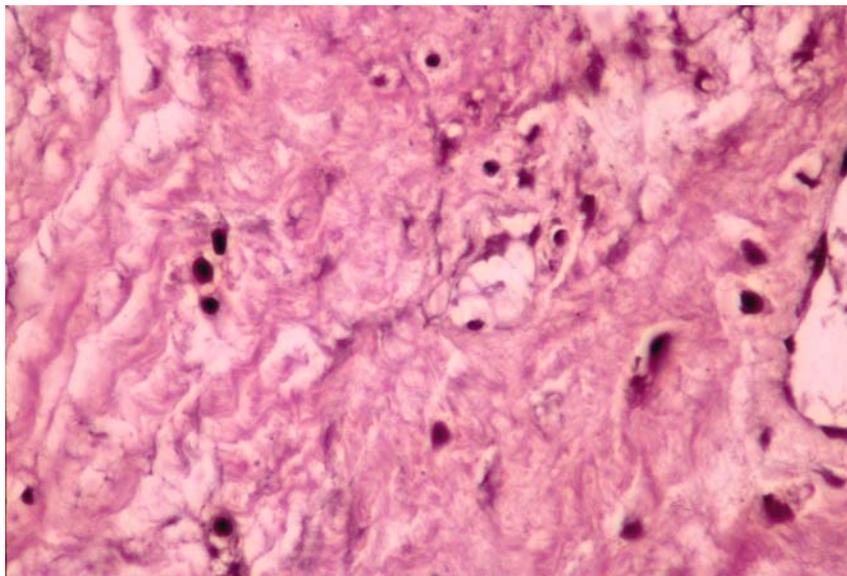


Figura 18- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

5.2.4. GRUPO IV- CONTROLE

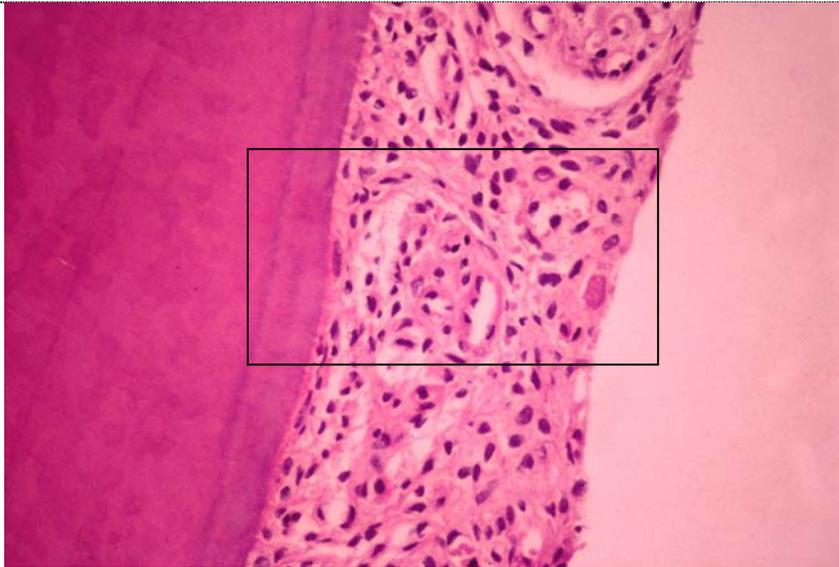


Figura 19-Terço cervical- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Celularidade preservada, com vascularização normal e feixes de fibras colágenas nítidos (HE- 20X)

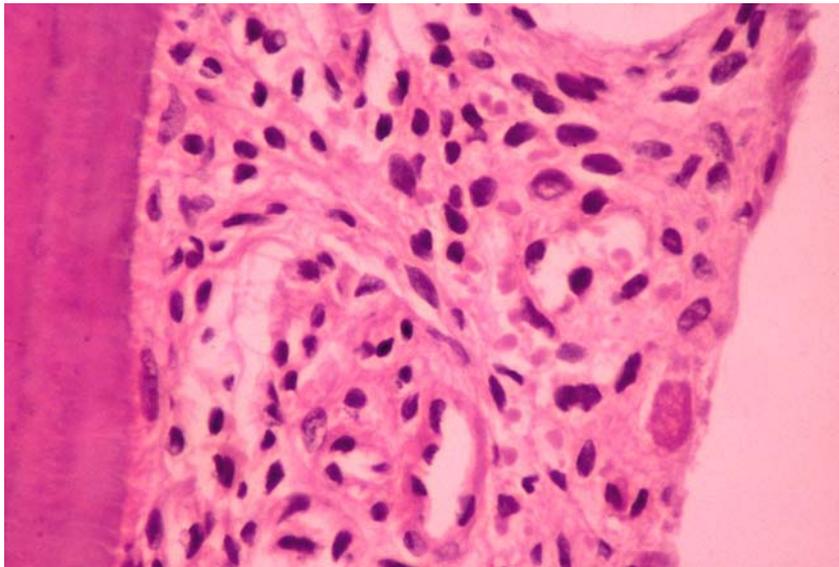


Figura 20- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

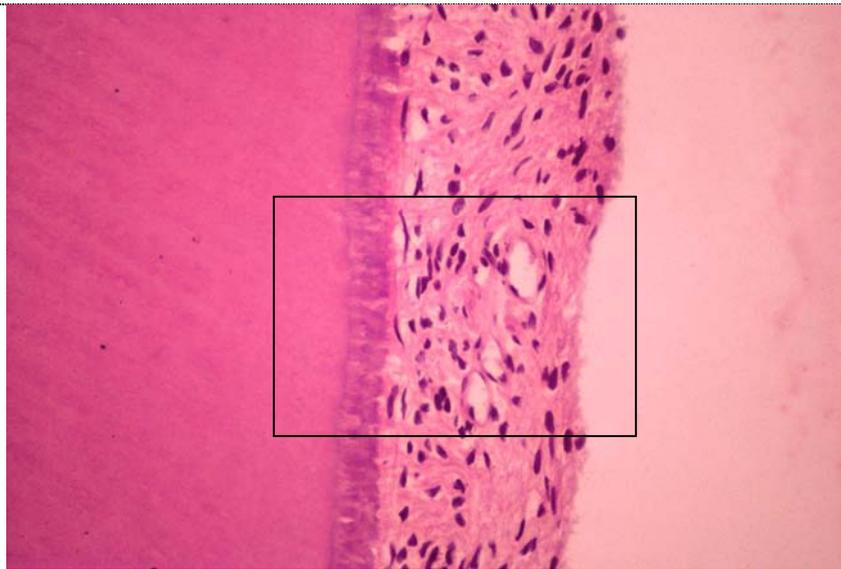


Figura 21-Terço médio- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Fibroblastos e células endoteliais preservados. Presença de vasos sanguíneos com características normais (HE- 20X)

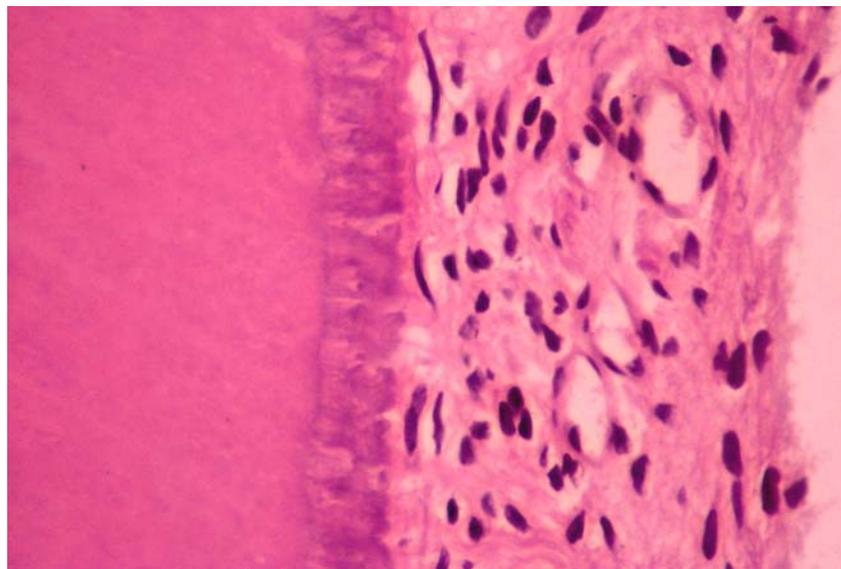


Figura 22- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

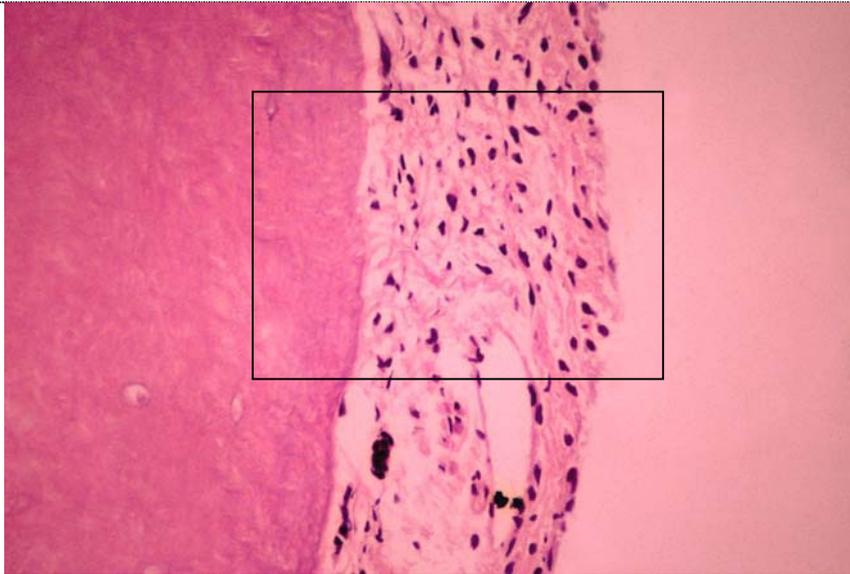


Figura 23-Terço apical- Remanescentes do ligamento periodontal aderidos ao cimento. Celularidade preservada e com vascularização normal (HE-20X)

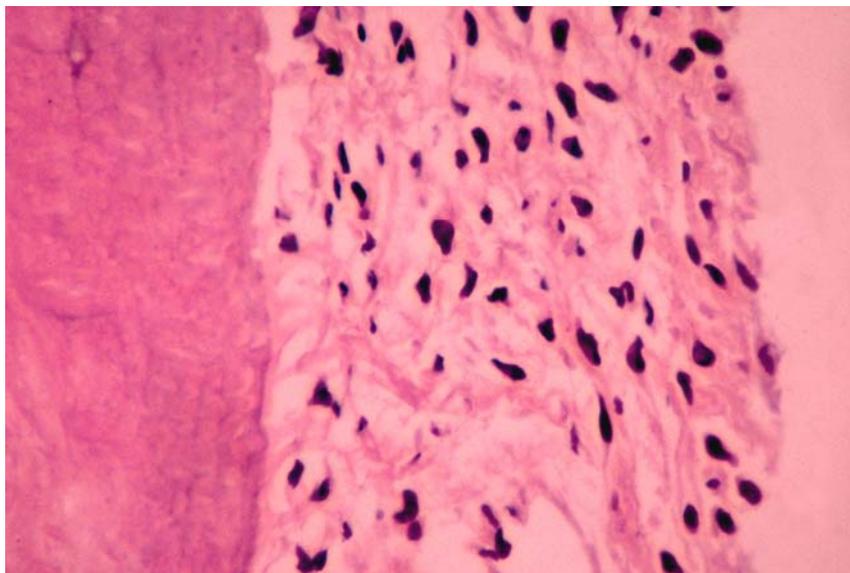


Figura 24- Fotomicrografia ilustrando quadro em destaque na figura acima (HE- 40X)

5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

Áreas do ligamento periodontal dos dentes humanos extraídos, e que foram deixados a seco por dez minutos e mantidos por uma hora em diferentes meios de conservação (Grupos I, II e III) e dos dentes que foram extraídos e imediatamente imersos no formol neutro a 10,0% (Grupo IV) foram classificadas segundo os grupos, contado o número de células, por mm^2 , por terços e no total, e os valores obtidos foram submetidos à análise de variância e o teste de Tukey.

Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão expressos a média, o desvio-padrão, o número de amostras, a análise de variância, e o teste de Tukey, referentes à avaliação quantitativa do número de células, por mm^2 , dos terços cervicais do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios (Grupo I – leite bovino; Grupo II – clara do ovo de galinha; Grupo III – saliva artificial; Grupo IV – Controle).

Tabela 1 – Média, desvio-padrão e número de amostras, referentes à avaliação quantitativa do número de células, por mm^2 , dos terços cervicais do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Grupo	Média	D.Padrão	Número
Grupo I	2,765.00000	599.783000	10
Grupo II	3,020.10000	397.624000	10
Grupo III	2,225.40000	683.301000	10
Grupo IV	3,492.70000	1,117.891000	10

Tabela 2 – Análise de variância referente à avaliação quantitativa das células do terço cervical do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	“F”	Probabilidade
Entre terços cervicais dos grupos	8366849.00	3	2788949.67	4.9927	.00535609
Resíduo	20109833.4	36	558606.483		
Total	28476682.4	39			

Tabela 3 – Comparações individuais, após aplicação do teste de Tukey, entre os terços cervicais dos diferentes grupos, quanto à avaliação quantitativa das células do ligamento periodontal, por mm², proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Comparação	Diferença	Valor crítico	Significância
Grupo I x Grupo II	-255.100	900.570	NS
Grupo I x Grupo III	539.600	900.570	NS
Grupo I x Grupo IV	-727.700	900.570	NS
Grupo II x Grupo III	794.700	900.570	NS
Grupo II x Grupo IV	-472.600	900.570	NS
Grupo III x Grupo IV	-1,267.300	900.570	SIGNIFICANTE

NS = não significante

Nível de significância: 5,0%

De acordo com os resultados podemos perceber que houve uma redução significativa no número de células do terço cervical do ligamento periodontal dos dentes conservados em saliva artificial quando comparado com o grupo controle.

Nas Tabelas 4, 5 e 6 estão os resultados referentes à média, o desvio-padrão, o número de amostras, a análise de significância, e o teste de Tukey, das amostras dos terços médios, proporcionada pelos diferentes meios de conservação.

Tabela 4 – Média, desvio-padrão e número de amostras, referentes à avaliação quantitativa do número de células, por mm², dos terços médios do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Grupo	Média	D.Padrão	Número
Grupo I	2,454.80000	405.501000	10
Grupo II	2,472.90000	687.812000	10
Grupo III	2,230.50000	639.239000	10
Grupo IV	3,778.80000	1,541.382000	10

Tabela 5 – Análise de variância referente à avaliação quantitativa das células do terço médio do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	“F”	Probabilidade
Entre terços médios dos grupos	14912448.9	3	4970816.30	5.8104	.00240346
Resíduo	30798032.6	36	855500.906		
Total	45710481.5	39			

Tabela 6 – Comparações individuais, após aplicação do teste de Tukey, entre os terços médios dos diferentes grupos, quanto à avaliação quantitativa das células do ligamento periodontal, por mm^2 , proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Comparação	Diferença	Valor crítico	Significância
Grupo I x Grupo II	-18.100	1,114.490	NS
Grupo I x Grupo III	224.300	1,114.490	NS
Grupo I x Grupo IV	-1,324.000	1,114.490	SIGNIFICANTE
Grupo II x Grupo III	242.400	1,114.490	NS
Grupo II x Grupo IV	-1,305.900	1,114.490	SIGNIFICANTE
Grupo III x Grupo IV	-1,548.300	1,114.490	SIGNIFICANTE

NS = não significativa

Nível de significância: 5,0%

De acordo com os resultados pode-se observar que não houve uma diferença estatisticamente significativa na redução do número de células dos terços médios do ligamento periodontal entre os dentes mantidos em leite bovino, clara do ovo de galinha e saliva artificial, embora seja notada diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle.

Nas tabelas 7, 8 e 9 estão expressos a média, o desvio-padrão, número de amostras, a análise de variância, e o teste de Tukey, referentes a avaliação quantitativa do número de células, por mm^2 , dos terços apicais do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação.

Tabela 7 – Média, desvio-padrão e número de amostras, referentes à avaliação quantitativa do número de células, por mm^2 , dos terços apicais do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Grupo	Média	D.Padrão	Número
Grupo I	1,461.60000	808.760000	10
Grupo II	1,628.80000	420.801000	10
Grupo III	1,965.10000	667.646000	10
Grupo IV	2,720.20000	689.364000	10

Tabela 8 – Análise de variância referente à avaliação quantitativa das células do terço apical do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	“F”	Probabilidade
Entre terços apicais dos grupos	9349924.28	3	3116641.43	7.1151	.00071292
Resíduo	15769246.5	36	438034.625		
Total	25119170.8	39			

Tabela 9 – Comparações individuais, após aplicação do teste de Tukey, entre os terços apicais dos diferentes grupos, quanto à avaliação quantitativa das células, por mm^2 , do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação.

Comparação	Diferença	Valor crítico	Significância
Grupo I x Grupo II	-167.200	797.480	NS
Grupo I x Grupo III	-503.500	797.480	NS
Grupo I x Grupo IV	-1,258.600	797.480	SIGNIFICANTE
Grupo II x Grupo III	-336.300	797.480	NS
Grupo II x Grupo IV	-1,091.400	797.480	SIGNIFICANTE

Grupo III x Grupo IV	-755.100	797.480	NS
----------------------	----------	---------	----

NS = não significante

Nível de significância: 5,0%

De acordo com os resultados pode-se observar que apenas o grupo da saliva artificial, no terço apical, não mostrou uma redução significativa, quando comparado ao grupo controle.

Após a obtenção dos resultados de acordo com os terços de cada dente, foi avaliado o número total de células, por mm^2 , por dente, e realizada a análise comparativa entre os diferentes grupos.

Nas tabelas 10, 11 e 12 estão expressos a média, o desvio-padrão, o número de amostras, a análise de variância, e o teste de Tukey, referentes à avaliação quantitativa do número de células por mm^2 , do ligamento periodontal de cada grupo, proporcionada pelos diferentes meios de conservação.

Tabela 10 – Média, desvio-padrão e número de amostras, referentes à avaliação quantitativa do número de células, por mm^2 , do ligamento periodontal de cada grupo, proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Grupo	Média	D.Padrão	Número
Grupo I	2,227.13000	827.879000	30
Grupo II	2,373.93000	767.887000	30
Grupo III	2,140.30000	652.676000	30
Grupo IV	3,330.57000	1,216.331000	30

Tabela 11 – Análise de variância referente à avaliação quantitativa das células do ligamento periodontal entre grupos, proporcionada pelos diferentes meios de conservação

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	“F”	Probabilidade
Entre grupos	27248415.0	3	9082804.99	11.4232	p=0.00000128

Resíduo	92233907.0	116	795119.888	p<0.05
Total	119482322	119		

Tabela 12 – Comparações individuais, após aplicação do teste de Tukey, entre as amostras dos diferentes grupos, quanto à avaliação quantitativa das células do ligamento periodontal, proporcionada pelos diferentes meios de conservação

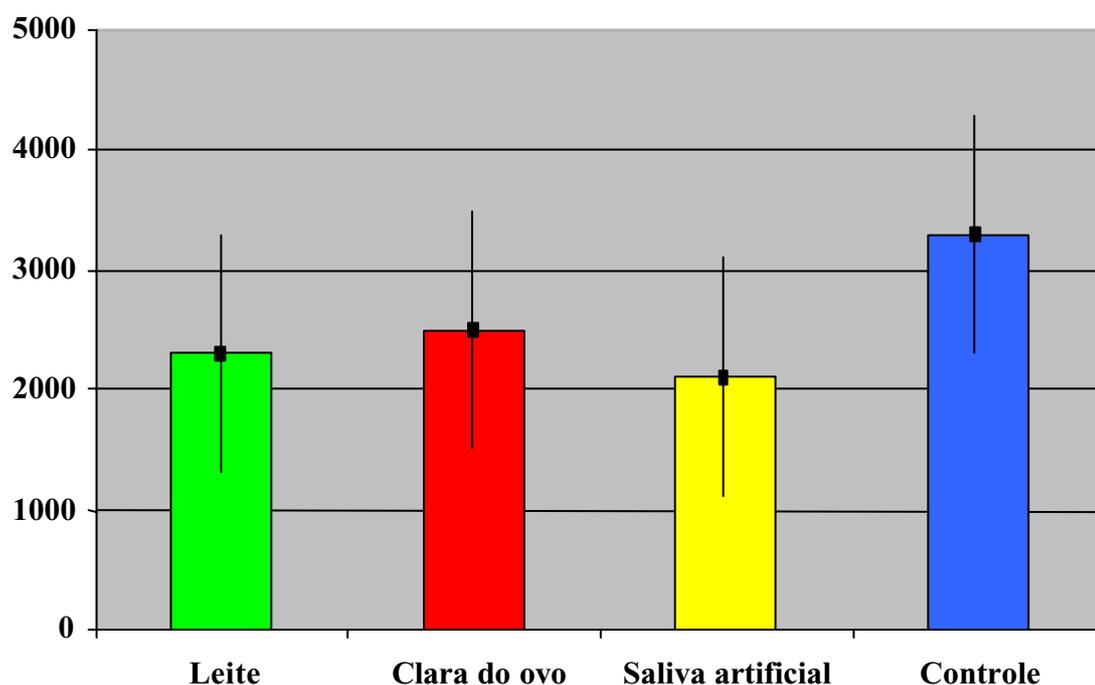
Comparação	Diferença	Valor crítico	Significância
Grupo I x Grupo II	-146.800	600.290	NS
Grupo I x Grupo III	86.830	600.290	NS
Grupo I x Grupo IV	-1,103.430	600.290	SIGNIFICANTE
Grupo II x Grupo III	233.630	600.290	NS
Grupo II x Grupo IV	-956.630	600.290	SIGNIFICANTE
Grupo III x Grupo IV	-1,190.270	600.290	SIGNIFICANTE

NS = não significante

Nível de significância: 5,0%

De acordo com os resultados pode-se observar que houve uma redução significativa no número de células do ligamento periodontal dos dentes imersos em meios de conservação quando comparados com o grupo controle, mas esta diferença não foi significativa entre os grupos do leite bovino, clara do ovo de galinha e saliva artificial. Estes resultados podem ser visualizados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Média do número de células do ligamento periodontal por mm^2 e seus respectivos desvios-padrões proporcionados pelos diferentes meios de conservação



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 DA METODOLOGIA

O estudo de reimplantes tardios está diretamente relacionado à clínica, uma vez que é nesta situação que se encontra a maior parte dos casos de avulsão e, portanto, é onde a traumatologia dentária deve procurar respostas para muitas dúvidas que persistem.

A maioria dos estudos tem sido realizada em dentes de macacos (Andreasen, 1981⁶; Blomlöf; Lindskog; Hammarström, 1981)¹⁷, de ratos (Carvalho Jr, 1995)²¹, de cães (Moura, 1990; Pettiette et al., 1997)^{42,48} e cultura de células (Alaçam et al., 1996; Ashkenazi; Sarnat; Keila, 1999; Hiltz; Trope, 1991)^{6,13,30}. São poucos os estudos encontrados na literatura utilizando-se dentes humanos (Andreasen, 1975; Andreasen; Bodin, 1990; Soares, 1997)^{8,10,51}. Para este estudo, foram selecionados pacientes com indicação de exodontia de pré molares, por finalidade ortodôntica, com o objetivo de avaliar o aspecto microscópico do ligamento periodontal humano após a conservação em diferentes meios. Andreasen (1981)⁶ considera que procedimentos de extração usados experimentalmente não têm analogia direta com o trauma de avulsão porque o ligamento periodontal sofre maiores danos durante a extração do que com a avulsão. Para dimensionar os danos causados pela extração, foi realizado um grupo controle, em que os dentes foram extraídos e imersos imediatamente no formol neutro a 10,0%.

O tratamento ideal para o dente avulsionado é o reimplante imediato (tempo máximo de 5 minutos). Infelizmente o reimplante imediato não é uma realidade. A falta de esclarecimento do paciente, de seus familiares ou de quem o atende prolonga o tempo de permanência extra-alveolar do dente avulsionado (Trope, 1995; Barret; Kenny, 1997)^{52,14}. Somente a saliva está sempre disponível no local do acidente. Outro meio de conservação (leite bovino ou clara do ovo de galinha) que possa ser costumeiramente obtido a curto prazo demanda o tempo, no mínimo, de dez minutos. Por isso optamos por trabalhar com dentes

expostos ao meio ambiente por dez minutos, simulando a condição clínica do tempo necessário para se obter o meio de armazenamento.

Foi selecionado como meio de conservação o leite bovino pasteurizado por ser um meio úmido e acessível. Os trabalhos que concluem ser o leite um meio de armazenamento apropriado são fundamentados em Blomlöf (1981)¹⁵, Blomlöf; Otteskog (1980)¹⁶. No entanto, a condição clínica é diferente da condição experimental, em que o dente é acondicionado imediatamente no leite, sem período extra-alveolar a seco. Para análise comparativa com o leite bovino, foi utilizada a clara do ovo de galinha, em função de ser um meio também disponível e com baixo índice de contaminação, e a saliva artificial por ser um meio pouco pesquisado.

O tempo de uma hora em que os dentes permaneceram imersos no meio foi determinado considerando-se o tempo gasto pelo paciente entre o traumatismo, a localização de um dentista, o deslocamento até o local de atendimento e o reimplante.

Estudos de Blomlöf; Otteskog (1980)¹⁶ afirmam que a vitalidade das células do ligamento periodontal poderia ser dependente da temperatura do meio de conservação. Moura (1990)⁴² mostrou que a temperatura do leite bovino pasteurizado, entre 25°C e 37°C, manteve a vitalidade das células do ligamento periodontal e que a variação da temperatura do leite durante o período de transporte foi prejudicial à vitalidade das células do ligamento periodontal. Para que não fosse introduzida outra variável no estudo, trabalhou-se com a temperatura ambiente de aproximadamente 29°C.

Para a análise dos resultados foi empregado o corte transversal, o qual permite que uma maior extensão da superfície radicular e do ligamento periodontal sejam analisadas. Outra razão foi o fato de a avaliação quantitativa, nesse tipo de corte, fornecer uma idéia mais objetiva das condições do dente. Os cortes foram realizados nos terços cervical, médio e apical.

Andersson et al. (1987)⁴ recomendaram para avaliação estatística de estudos pelo método histomorfométrico amostra de oito espécimes para que diferenças de magnitude razoável fossem detectadas estatisticamente. Neste estudo, foram utilizados dez espécimes de cada

grupo, sendo que, de cada espécime, foram avaliadas três amostras (terço cervical, médio e apical), totalizando trinta amostras de cada grupo. Em cada amostra foram analisados três campos, totalizando nove campos para cada dente e noventa para cada grupo.

Para a análise descritiva, os cortes foram avaliados primeiramente em um aumento de 20X, para que a lâmina pudesse ser percorrida inteiramente e para que todas as alterações perceptíveis pudessem ser anotadas. A seguir, as áreas selecionadas foram analisadas em um aumento de 40X, o que permitiu uma visualização melhor do tecido.

Muitos dos meios de conservação mantêm a vitalidade das células do ligamento periodontal, mas reduzem a viabilidade. A vitalidade da célula pode ser definida como sua capacidade de produzir energia para a manutenção das funções orgânicas básicas, enquanto a viabilidade é a possibilidade de multiplicação celular (Patil; Dumsha; Sydiskis, 1994; Lekic et al., 1996)^{46,37} O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do meio de conservação sobre o ligamento periodontal na manutenção da organização e de suas células, portanto não foram utilizadas técnicas para determinar a viabilidade das células. A análise quantitativa foi realizada com aumento de 40X auxiliada por um retículo de integração. Foram contadas as células das camadas externas do ligamento periodontal, não sendo possível determinar a vitalidade ou viabilidade destas através da metodologia empregada.

No terço cervical são freqüentemente observadas lesões da superfície radicular decorrentes da exodontia (Zanneta-Barbosa, 1988; Velasco-Bohórquez, 1993)^{55,54} devido à ponta ativa do fórceps. Como o trauma nessa região é comum, e seria uma variável que poderia falsear a análise estatística, foi também realizada a análise quantitativa dos terços médio e apical. Os nossos resultados mostraram que entre os terços cervicais, não houve diferença estatisticamente significativa na redução do número de células por mm^2 , entre os grupos I, II e IV, apenas entre os grupos III e IV, o que pode ser devido a uma redução no número de células

do grupo da saliva artificial potencializada pela atuação do fórceps nesta região. Entre os terços médios houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I, II e III quando comparados ao controle, resultados estes que confirmam os dados da análise total dos dentes, e confirmam que o terço médio representa uma amostra fidedigna. Entre os terços apicais, continuou havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II, e o grupo IV (controle), mas não foi observada uma redução significativa com relação ao número de células por mm^2 , entre o grupo da saliva artificial e o grupo controle, denotando que amostras só do terço apical talvez não sejam tão confiáveis.

6.2 DOS RESULTADOS

De acordo com a metodologia empregada no presente estudo, os resultados mostraram diferenças entre os eventos microscópicos descritos no ligamento periodontal, quando o dente foi conservado em leite bovino pasteurizado (Grupo I) e em clara do ovo de galinha (Grupo II) e comparados à saliva artificial (Grupo III). Mesmo sendo percebidas alterações na organização dos feixes de fibras colágenas, e redução da celularidade quando a conservação do dente foi realizada na saliva artificial, esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa quanto ao número de células por mm^2 , entre os grupos I, II e III.

Estes resultados podem ser atribuídos ao tempo de sessenta minutos, que foi estabelecido na metodologia. Trabalho relatado na literatura, com cultura de células de fibroblasto de pele humana, mostrou que em até quarenta e cinco minutos o leite bovino mantém 80,0% das células viáveis e que, após uma hora e meia, a viabilidade diminui significativamente (Rozenfarb; Kupietzk; Shey, 1997)⁵⁰. Estes resultados são discordantes de trabalhos realizados por Olson et al. (1997)⁴⁴, também com cultura de células de fibroblasto, só que de ligamento periodontal humano, e de Hiltz; Trope (1991)³⁰, com fibroblastos de lábio humano, nos quais o leite bovino foi capaz de manter um número significativo de células viáveis, 76,7% até duas horas, e de 69,8% até seis horas.

Pesquisas com ligamento periodontal de pré molares humanos extraídos cirurgicamente (Patil; Dumsha; Sydiskis, 1994; Lekic et al., 1996)^{46,37} mostraram que a viabilidade das células pode ser mantida deixando-as dez minutos a seco seguindo-se o armazenamento de até duas horas no leite bovino. Contrariamente aos nossos resultados, observou-se que até duas horas não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de células viáveis por dente no leite bovino ($9,44 \times 10^5$) e o grupo controle ($8,55 \times 10^5$).

Para autores como Blomlöf; Otteskog (1980)¹⁶ e Blomlöf et al. (1983)²⁰, o tempo e a temperatura não influenciam a quantidade de células do ligamento periodontal de dentes de macacos e de humanos, até seis horas, quando o meio de conservação é o leite bovino. Com relação ao tempo, Velasco-Bohórquez (1993)⁵⁴, depois de pesquisar em ratos, concluiu que no período de duas horas, correspondente a seis horas no homem, o leite bovino mantém parcialmente a vitalidade dos remanescentes do ligamento periodontal e não impede reabsorções dentárias.

Com relação à temperatura, Moura (1990)⁴² avaliou o leite bovino a 10°C, 25°C e 37°C e com variação de 10°C para 25°C. Observou que as temperaturas de 25°C e 37°C ofereceram melhores resultados e que a variação na temperatura levou à ocorrência de maior número de reabsorções em dentes de cães. Também Huang; Remeikes; Daniel (1996)³¹, trabalhando com cultura de células de ligamento periodontal humano, obtiveram um maior número de células viáveis (78,6%) quando o armazenamento no leite bovino foi realizado a 20°C do que a 4°C (48,5%), no período de uma hora. Esses resultados contrariam autores que afirmam que a baixa temperatura do leite tem a vantagem de inibir o crescimento bacteriano e prevenir o azedamento (Ashkenazi; Sarnat; Keila, 1997)¹³.

Este trabalho foi realizado com leite bovino pasteurizado, mantido em temperatura ambiente (29°C). Utilizou-se uma temperatura próxima ao que pode ser encontrado no local do acidente, sempre buscando a similaridade com as situações clínicas. Os resultados mostraram que a conservação dos dentes no leite bovino a esta temperatura, por sessenta minutos, manteve a nitidez e a organização dos feixes de fibras colágenas do ligamento periodontal, ainda que em áreas esparsas houvesse redução

da celularidade. O fato do leite ser pasteurizado, segundo Ashkenazi; Sarnat; Keila (1997)¹³, faz com enzimas sejam inativadas, as quais poderiam lesar fibroblastos.

Alguns autores (Harkacz; Carnes Jr.; Walker III, 1997; Ashkenazi; Sarnat; Keila, 1999)^{29,13}, pesquisando em cultura de células de ligamento periodontal humano, notaram que o teor de gordura do leite bovino poderia alterar o número de células viáveis; em trinta minutos o leite bovino desnatado manteve 90,0% de células viáveis e o leite integral 75,0%. Sugeriram que os leites com menor teor de gordura são mais apropriados para conservação de dentes avulsionados. Contrariamente, Olson et al. (1997)³⁴, também pesquisando em cultura de células de ligamento periodontal humano, mostraram que o leite bovino integral era capaz de manter um número significante de células viáveis.

Segundo Consolaro (2002)²² o leite, por ser uma secreção glandular, produto derivado de tecidos de natureza epitelial, contém o fator de crescimento epidérmico ou epitelial (EGF) em sua constituição. O embeбimento do dente no leite permeia os remanescentes aderidos à superfície dentária de EGF e dificulta a proximidade do tecido ósseo à superfície dentária, diminuindo a probabilidade de reabsorção por substituição.

A osmolaridade do leite bovino similar ao fluido extra celular (250-270 mOsm/kg) assim como a presença em sua composição de substâncias nutricionais como, aminoácidos, carboidratos e vitaminas, que favorecem a manutenção de células viáveis, apesar de ter sido verificado que o leite possui o pH ligeiramente ácido, variando entre 6.63 e 7.20 (Lekic et al. 1996, Harkacz; Carnes Jr., Walker III, 1997)^{37,29}.

Em controvérsia aos trabalhos anteriores, foi demonstrado que o leite bovino não tem capacidade de reconstituir metabólitos celulares perdidos e, conseqüentemente, restaurar a viabilidade das células. As células permanecem vivas, mas sem energia de íons suficientes para repopularizar a superfície radicular (Hiltz; Trope, 1991; Trope, Friedman, 1992)^{30,53}. O fato de o leite ser considerado um meio apropriado para a conservação de dentes é fundamentado basicamente em pesquisas experimentais que diferem da condição clínica. Existe apenas o relato de um caso de dente humano reimplantado, após ter sido armazenado no leite

bovino resfriado, o qual foi acompanhado por quatro anos, e a seguir extraído por causa de fratura radicular devido a novo traumatismo. A análise microscópica deste dente mostrou ligamento periodontal normal e áreas de reabsorções reparadas, mas também sítios ativos de reabsorção estavam presentes (Nordenvall, 1992)⁴³. Dos quatrocentos dentes avulsionados e reimplantados após a permanência em diferentes meios, pesquisados por Andreasen et al. (1995)¹², não foi encontrado que alguns deles tivesse sido conservado em leite.

Seria considerado ideal para conservação de dentes avulsionados o meio que além de ser facilmente obtido no local do acidente mantivesse tanto a vitalidade, quanto a viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal. É necessário uma rápida repopularização pelos fibroblastos da superfície desnuda da raiz, para que se evite o ataque dos osteoclastos nesta área (Ashkenazi; Sarnat; Keila, 1999)¹³.

Os resultados da análise microscópica descritiva mostraram que o ligamento periodontal de dentes conservados em clara do ovo de galinha (Grupo II) apresentaram feixes de fibras colágenas nítidos, assim como quando a conservação foi feita no leite bovino. No entanto, em algumas amostras do grupo da clara do ovo de galinha puderam ser observadas áreas de desorganização. Campos com redução da celularidade aconteceram em todos os terços analisados, mas não foi estatisticamente significativa esta diferença quando comparada aos grupos I e III, apenas quando comparada ao grupo controle.

Rozenfarb; Kupietzky; Shey (1997)⁵⁰ trabalhando com cultura de células dos fibroblastos de pele humana observaram que a clara do ovo de galinha mantém, em até quarenta e cinco minutos, 74,0% de células viáveis e após uma hora e meia, 70,0%, sendo, melhor que o leite no período mais longo. Ao contrário, Velasco-Bohórquez (1993)⁵⁰, após pesquisas em ratos, concluiu que a clara do ovo de galinha não é favorável para manter a vitalidade do ligamento periodontal por duas horas, o que equivaleria a seis horas no caso de se usarem dentes humanos, potencializando as reabsorções radiculares. Carvalho Jr. (1995)²¹, também realizando estudos em ratos, observou que a destruição da superfície radicular está diretamente relacionada com o aumento do tempo em que o

dente fica imerso na clara do ovo de galinha. Afirmou que a clara de ovo de galinha não é favorável para preservar a vitalidade do ligamento periodontal em ratos, a partir de uma hora, o que equivaleria a três horas no caso de pesquisa feita com dentes humanos.

Para Carvalho Jr. (1995)²¹ o período de uma hora permitiria a manutenção da vitalidade do ligamento periodontal num estágio classificado como necrobiose que teria a tendência para evoluir para a necrose: como os dentes, neste estudo, foram mantidos na clara do ovo de galinha, por período de sessenta minutos, não se pôde caracterizá-lo como um meio não-favorável a manutenção de dentes avulsionados. Talvez, após experimentos com dentes humanos extraídos, mantidos na clara do ovo de galinha, por períodos mais prolongados de tempo, se possa estabelecer este limite entre ser um meio favorável ou desfavorável.

A visão de que a clara do ovo de galinha pudesse ser o meio ideal para conservação de dentes avulsionados, à medida que se estuda a seu respeito mostra fatores quantitativos e qualitativos que podem interferir na preservação da vitalidade das células do ligamento periodontal. O fator qualitativo seria referente à casca, à câmara de ar, à clara e à gema, que podem sofrer influências desde a formação até o consumo do ovo. Os fatores que podem influenciar são a alimentação, a idade, os cuidados com a ave, seu metabolismo, as doenças adquiridas e o emprego de vacinas. Os fatores ambientais, como a temperatura, a umidade relativa do ar e os cuidados no armazenamento, também influenciam a qualidade do ovo (Gardner, 1975)²⁷.

Gardner (1975)²⁷ observou que para o bom armazenamento do ovo, a temperatura deveria estar abaixo de 13°C, e a umidade relativa do ar em torno de 70,0%, para se evitarem a perda de peso e a contaminação por fungos. Ainda, a caixa e as embalagens para acondicionamento dos ovos deveriam receber tratamento criterioso para conservá-los e diminuir contaminações. À medida que ovo envelhece, o albúmen denso vai se tornando líquido, devido às reações químicas que ocorrem no seu interior. Assim a clara do ovo pode sofrer mudanças de pH com o passar do tempo. Não só o tempo interfere no pH do albúmen como também o avicultor pode empregar recursos para que esse pH fique acima 8.7. É sabido que mantendo-se este pH se consegue remover a casca com

mais facilidade, após o cozimento do ovo, sendo, comercialmente, considerado um bom ovo.

Velasco-Bohórquez (1993)⁵⁴ mensurou o pH da clara do ovo de galinha e obteve o valor de 9.38. Para essa pesquisadora a potencialização das reabsorções radiculares, encontradas em seu estudo em dentes de ratos, após a conservação em clara do ovo de galinha por duas horas, pode ser atribuída, além do pH, à grande quantidade de proteínas que poderiam atuar como corpo estranho.

Apesar de não ter sido estatisticamente significativa a diferença no número de células entre o grupo da saliva artificial (Grupo III) e do leite bovino (Grupo I) e da clara do ovo de galinha (Grupo II), microscopicamente, podem ser observadas maiores áreas de desorganização dos feixes de fibras colágenas e uma expressiva redução no número de células quando comparados com os grupos I e II. O efeito da saliva sobre as células do ligamento periodontal vem sendo estudado através de pesquisas experimentais com dentes extraídos de macacos (Blomlöf et al., 1980)^{39,18}, cultura de células (Lindskog; Blomlöf, 1982; Harkacz; Carnes Jr.; Walker III, 1997; Rozenfarb; Kupietzky; Shey, 1997; Lekic; Kenny; Barrett, 1998)^{28,29,50,36}, *in vivo* em macacos (Andreasen, 1981; Blomlöf et al., 1983)^{6,20} e em observações clínicas e radiográficas (Andreasen; Borum; Andreasen, 1995; Andreasen et al., 1995)^{11,12}.

Rozenfarb; Kupietzky; Shey (1997)⁵⁰, realizando estudo com cultura de células de fibroblastos da pele humana, observaram um decréscimo significativo na viabilidade das células após quinze minutos de armazenamento na saliva humana. Pesquisando também com cultura de células de fibroblasto de ligamento periodontal de dentes humanos, Harkacz; Carnes Jr.; Walker III (1997)²⁹ relataram que a saliva humana diminui a viabilidade das células em 50,0% até noventa minutos, a qual continua decrescendo, e com duzentos e dez minutos apenas 25,0% das células se mantêm viáveis.

Os resultados encontrados nesta investigação estão de acordo com resultados de trabalho realizado por Velasco-Bohórquez (1993)⁵⁴, ao afirmar que a saliva artificial parece interferir na organização dos feixes de fibras colágenas, que a lesão do ligamento periodontal parece ser devido aos componentes da saliva, ou por ser uma solução hipotônica

com osmolaridade de 73,3/mOsm/kg, bem como por ser seu pH 6,3 ligeiramente ácido. Esse pH é diferente do pH de 7.1 observado na saliva humana (Blomlöf; Lindskog; Hammarström, 1981; Lindskog; Blomlöf, 1982)^{17,39}. Talvez essa ligeira acidez da saliva artificial e a sua baixa osmolaridade tenham favorecido a redução do número de células no grupo da saliva artificial.

Para Blomlöf et al. (1980)¹⁸; Blomlöf; Lindskog; Hammarström (1981)¹⁷ e Lindskog; Blomlöf (1982)³⁹, o aumento do tempo de imersão do dente, mesmo na saliva humana, ocasiona a perda da atividade enzimática da célula do ligamento periodontal. Esses autores, após trabalhos em macacos, observaram que em sessenta minutos, a membrana da célula do grupo da saliva humana mostrou sulcos, onde foram encontradas bactérias. Segundo Lindskog; Blomlöf; Hammarström (1983)⁴⁰, o aumento de reabsorções radiculares pode estar relacionado com a necrose do ligamento periodontal que, permanecendo sobre a superfície radicular induz esta patologia. Tanto é verdade que os espécimes mantidos na saliva artificial exibiram uma maior quantidade de reabsorção inflamatória.

Apesar de os estudos (Andreasen, 1981)⁶ *in vivo* em macacos demonstrarem índices de reparo superiores a 60,0% em duas horas de conservação de dentes em saliva humana, posteriormente foi observada uma redução marcante no reparo de dentes humanos mantidos em saliva por mais de vinte minutos e reimplantados, em estudo clínico e radiográfico realizado por Andreasen et al. (1995)¹².

Lindskog; Blomlöf; Hammarström (1983)⁴⁰ mostraram numerosas bactérias aderidas ao ligamento periodontal de dentes extraídos de macacos quando o meio de conservação foi a saliva. Concluíram, nesse estudo, que a baixa osmolaridade da saliva combinada com bactérias torna a saliva menos recomendável do que o leite bovino.

Nos espécimes do grupo controle desta pesquisa (Grupo IV), no qual os dentes foram extraídos e imersos, imediatamente, no formol tamponado a 10,0%, microscopicamente, os feixes de fibras colágenas mostravam-se bem nítidos e organizados. O ligamento periodontal mostrou-se preservado exibindo um grande número de células e vasos sangüíneos com características normais. Segundo Andreasen (1987)⁷ o

trauma da superfície radicular pela extração lesa os remanescentes do ligamento periodontal, principalmente nas áreas mais convexas. O trauma da extração sobre o cimento, fibras colágenas, células cementoblásticas e fibroblastos interfere na organização das fibras e na vitalidade das células.

Apesar de o trauma da exodontia poder causar estas alterações no ligamento periodontal, o número de células por mm^2 apresentou-se significativamente maior no grupo controle do que nos demais grupos deste estudo, e o ligamento periodontal, microscopicamente manteve-se com características normais.

No presente estudo, muito embora não tenha havido diferença estatisticamente significante, quanto ao número de células por mm^2 entre os grupos avaliados, do ponto de vista microscópico, na análise descritiva foram evidentes as alterações na organização dos feixes de fibras colágenas do ligamento periodontal. Assim, podemos entender que houve diferença na qualidade do ligamento periodontal entre os grupos cujos dentes foram conservados em leite bovino pasteurizado, clara do ovo de galinha e saliva artificial, e obviamente, o grupo controle.

À vista do conjunto dos resultados descritivos, entre os grupos avaliados a qualidade do ligamento periodontal se apresenta melhor no grupo do leite bovino pasteurizado.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, e dentro das condições experimentais estabelecidas, pode-se concluir que:

1 – A qualidade do ligamento periodontal foi afetada pelos meios de conservação quando comparada com o grupo controle.

2 – Houve diferença, estatisticamente significativa, no número de células por mm^2 , entre o grupo controle (Grupo IV) e aqueles que foram mantidos a seco por dez minutos e, a seguir, imersos em leite bovino (Grupo I), clara do ovo de galinha (Grupo II) e saliva artificial (Grupo III), pelo período de uma hora .

3 – Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de células por mm^2 entre os grupos de dentes conservados no leite bovino pasteurizado (Grupo I), na clara do ovo de galinha (Grupo II) e saliva artificial (Grupo III).

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AGUIAR, M.C. *Efeito da água de coco e do leite pasteurizado na reabsorção radicular de dentes reimplantados: Estudo histológico em ratos.* Bahia, 2002. Dissertação (Mestrado) – 157p. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.
- 2 - ALAÇAM, T.; GÖRGÜL, G.; ÖMÜRLÜ, H.; CAN, M. Lactate dehydrogenase activity in periodontal ligament cells stored in different transport media. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 82, p. 321-3, 1996.
- 3 - *AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS.* Recommended guidelines for the treatment of avulsed tooth. *J. Endod.*, v.9, p. 571, 1994.
- 4 - ANDERSSON, L.; JONSSON, B.G.; HAMMARSTRÖM, L.; BLOMLÖF, L.; ANDREASEN, J.O.; LINDSKOG, S. Evaluation of statistics and desirable experimental design of a histomorphometrical method of studies of root resorption. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.3, p.288-95, 1987.
- 5 - ANDREASEN, J.O. Challenges in clinical dental traumatology. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.1, p.21-5, 1985.
- 6 - ANDREASEN, J.O. Effect on extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int. J. Oral Surg.*, v.10, p.43-53, 1981.

-
- 7 - ANDREASEN, J.O. Experimental dental traumatology: development of a model for external root resorption. *Endod. Dent. Traumatol.*, v. 3, p. 269-87, 1987.
- 8 - ANDREASEN, J. O. Periodontal healing after replantation of traumatically avulsed human teeth. *Acta Odont. Scand.*, v. 33, p. 325-35, 1975.
- 9 - ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F.M. *Texto e atlas colorido de traumatismo dental*. 3ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2001.
- 10 - ANDREASEN, L.; BODIN, I. Avulsed human teeth replanted within 15 minutes – a long term clinical follow-up study. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.6, p.37-42, 1990.
- 11 - ANDREASEN, J. O.; BORUM, M.K.; ANDREASEN, F. M. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 3. Factors related to root growth. *Endod. Dent. Traumatol.*, v. 11, p. 69-75, 1995.
- 12 - ANDREASEN, J.O.; BORUM, M.K.; JAKOBSEN, H.L.; ANDREASEN, F.M. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.11, p.76-89, 1995.
- 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.*, v. 15, p. 149-56, 1999.

-
- 14 - BARRET, E.J.; KENNY, D.J. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.13, p.153-63, 1997.
- 15 - BLOMLÖF, L. Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *Swed. Dent. J.*, v. 8, p. 1-26, 1981.
- 16 - BLOMLÖF, L.; OTTESKOG, P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand. J. Dent. Res.*, v.88, p.436-40, 1980.
- 17 - BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S.; HAMMARSTRÖM, L. Periodontal healing of exarticulated monkey teeth stored in milk or saliva. *Scand. J. Dent. Res.*, v.89, p.251-9, 1981.
- 18- BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S.; HEDSTRÖM, K.G.; HAMMARSTRÖM, L. Vitality of periodontal ligament cells after storage of monkey teeth in milk or saliva. *Scand. J. Dent Res.*, v. 88, p. 441-45, 1980.
- 19 - BLOMLÖF, L.; ANDERSON, L.; LINDSKOG, S.; HEDSTRÖM, K.G.; HAMMARSTROM, L. Periodontal healing of replanted monkey teeth prevented from drying. *Acta Odontol. Scand.*, v.41, p.117-23, 1983.
- 20 - BLOMLÖF, L.; LINDSKOG, S.; ANDRESON, L.; HEDSTRÖM, K.G.; HAMMARSTROM, L. Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior go replantation. *J. Dent. Res.*, v.62, p.912-6, 1983.

-
- 21 - CARVALHO JÚNIOR, J.A.R. *Influência do tempo de imersão de dentes extraídos e mantidos na clara do ovo de galinha de granja antes de serem reimplantados. Estudo histológico em ratos.* Araçatuba, 1995. Dissertação (Mestrado) – 63p. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.
- 22 - CONSOLARO, A. *Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas.* Maringá: Dental Press, 2002.
- 23 - CVEK, M.; GRANATH, L.E.; HOLLENDER, L. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. III-Variation of occurrence of ankyloses of reimplanted teeth with duration of extra-alveolar periodont and storage environment. *Odont. Revy.*, v.25, p.43-56, 1974.
- 24 - DOYLE, D.L.; DUMSHA, T. C.; SYDISKIS, R. J. Effect of soaking in Hank's balanced salt solution or milk on PDL cell viability of dry stored human teeth. *Endod. Dent. Traumatol.*, v. 14, p. 221-4, 1998.
- 25 - FERREIRA, A.B.H. *Novo dicionário da língua portuguesa.* 2 ed., Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 1986.
- 26 - GABRIELLI, M.F.R. *Reimplante de primeiro molar superior de rato. Influência da imobilização do dente reimplantado na ocorrência de alterações pós-operatórias – estudo histológico.* Araçatuba, 1988. Dissertação (Mestrado) – 56p. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.

-
- 27 - GARDNER, F.A. Fatores de qualidade do ovo desde a produção até o consumo. In: CAMPOS, E.J. *Tópicos avícolas*. Minas Gerais: Fundação Cargill. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. 1995. p.1-9.
- 28 - HAMMER, J.E.; REED, O.M.; STANLEY, H.R. Replantation of teeth in the baboon. *J. Amer. Dent. Ass.*, v.81, p.662-70, 1970.
- 29 - HARKACZ, O.M.; CARNES JR, D.L.; WALKER III, W.A. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid gatorade and milks of varying fat content. *J. Endod.*, v-23, p.687-90, 1997.
- 30 - HILTZ, J.; TROPE, M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.7, p.69-72, 1991.
- 31 - HUANG, S-C; REMEIKIS, N.A.; DANIEL, J.C Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J. Endod.*, v. 22, p. 30- 3, 1996.
- 32 - HUPP, J. G.; MESAROS, S. V.; AUKHIL, I.; TROPE, M. Periodontal ligament vitality and histologic healing of teeth stored for extended periods before transplantation. *Endod. Dent. Traumatol.*, v. 14, p. 79-83, 1998.
- 33 - HUPP, J. G.; TROPE, M.; MESAROS, S. V.; AUKHIL, I. Tritiated thymidine uptake in periodontal ligament cells of dogs' teeth stored in various media for extended time periods. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.13, p. 223-7,

- 1997.
- 34 - KRASNER, P.; PERSON, P. Preserving avulsed teeth for replantation. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.123, p. 80-8, 1992.
- 35 - KUSEK, J.C. A brief study of tooth transplantation. *Dent. Stud. Meg.*, v.43, p.662-70, 1965.
- 36 - 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.*, v. 31, p.137-40, 1998.
- 37 - LEKIC, P.; KENNY, D.; MOE, H.K.; BARRETT, E.; McCULLOCH, C.A.G. Relationship of clonogenic capacity to plating efficiency and vital dye staining of human periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *J. Periodontol. Res.*, v.31, p.294-300, 1996.
- 38 - LIN, D. G.; KENNY, D. J.; BARRETT, E. J.; LEKIC, P.; McCULLOCH, C.A.G. Storage conditions of avulsed teeth affect the phenotype of cultured human periodontal ligament cells..*J.Periodontal Res.*, v.35, p.42-50, 2000.
- 39 - LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L. Influence of osmolarity and composition of some storage medium of human periodontal ligament cells. *Acta Odont. Scand.*, v.40, p.435-41, 1982.
- 40 - LINDSKOG, S.; BLOMLÖF, L.; HAMMARSTRÖM, L. Mitoses and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scand. J. Dent. Res.*, v.91, p.465-72, 1983.

-
- 41 - MATSSON, L.; ANDREASEN, J.; CVEK, M.; GRANATH, L. Ankylosis of experimentally reimplanted teeth related to extra-alveolar period and storage environment. *Pediatr. Dent.*, v.4, p.327-9, 1982.
- 42- MOURA, W.L. *Estudo histológico do periodonto de inserção de incisivos de cão, reimplantados após estocagem em leite pasteurizado sob diferentes temperaturas*. Araçatuba, 1990. Tese (Doutorado) - 66 p. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.
- 43 - NORDENVALL, K-J. Milk as storage medium for exarticulated teeth: Report of case. *J. Dent. Child.*, v. 59, p. 150-5, 1992.
- 44 - OLSON, B. D.; MAILHOT, J.M.; ANDERSON, R.W.; SCHUSTER, G. S.; WELLER, R.N. Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. *J. Endod.*, v. 23, p. 676-9, 1997.
- 45 - PANZARINI, S.R.; SAAD NETO, M. Influencia de gelatina incolor com maior ou menor diluição de água na preservação do ligamento periodontal cementário: um estudo piloto. *Rev. Reg. Araçatuba Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v.22, n.2, p.30-4, 2001.
- 46 - 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.*, v. 27, p. 1-5, 1994.
- 47 - PEARSON, R.N.; LIEWEHR, F.R.; WEST, L.A.; PATTON, W.R.;

- MCPHERSON, J.C. 3rd.; RUNNER, R.R. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. *J. Endod.*, v.29, n.3, p.184-6, 2003.
- 48 - PETTIETTE, M.; HUPP, J.; MESAROS, S.; TROPE, M. Periodontal healing of extracted dogs' teeth air-dried for extended periods and soaked in various media. *Endod. Dent. Traumatol.*, v.13, p. 113-8, 1997.
- 49 - PORTOLANI, R.M.B. *Estudo histológico das ocorrências pós-operatórias de molar de rato reimplantado após estocagem extra-bucal em leite*. Araçatuba, 1983. Dissertação (Mestrado) – 44p. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.
- 50 - ROZENFARB, N.; KUPIETZKY, A.; SHEY, Z. Milk and egg albumen are superior to human saliva in preserving human skin fibroblasts. *Pediatr. Dent.*, v.19, p.347-8, 1997.
- 51 - SOARES, A.J. *Avaliação microscópica do ligamento periodontal de dentes humanos extraídos cirurgicamente, mantidos em diferentes meios de conservação*. Bauru, 1997. Monografia (Especialização) - 65p. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade do Estado de São Paulo.
- 52 - TROPE, M. Clinical management of the avulsed tooth. *Dent. Clin. North Am.*, v.39, p.93-113, 1995.
- 53 - TROPE, M.; FRIEDMAN, S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. *Endod. Dent. Traumatol.*, v. 8, p.183-8, 1992.
- 54 - VELASCO-BOHÓRQUEZ, M.P.V. *Estudo histológico do periodonto de inserção e da polpa de incisivos de ratos, reimplantados após permanecerem imersos em leite bovino, saliva artificial ou clara do ovo de galinha*.

-
- Araçatuba, 1993. Dissertação (Mestrado) – 91p. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.
- 55 - ZANETTA-BARBOSA, D. *Reimplante de dentes com superfície radicular tratada com trifosfato de adenosina. Estudo histológico em ratos*. Araçatuba, UNESP, 1988. p.106. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

ANEXOS

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por este instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que, eu, _____
nacionalidade, _____, portador de RG nº _____
_____ residente à _____

na cidade de _____ Estado de _____,
concordo voluntariamente em participar da pesquisa “Avaliação microscópica do efeito de diferentes meios de conservação sobre o ligamento periodontal de dentes humanos extraídos cirurgicamente”, desenvolvida pelo cirurgião-dentista Hugo Alexandre de Souza e declaro que tomei ciência e fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- 1- Fui esclarecido de que a referida pesquisa tem por objetivo analisar o tecido que envolve o dente após ele ter sido extraído e conservado, em variados meios. Para isso, terei que ter em mãos o pedido do ortodontista indicando a exodontia do dente.
- 2- Fui esclarecido de que a realização da pesquisa em nada muda a rotina de exodontia de dentes que não estão incluídos na pesquisa, e que receberei informações e orientações pós-operatórias.
- 3- Estou ciente de que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização.
- 4- Estou ciente de que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; porém, será garantido o sigilo da minha identidade, assegurando a minha privacidade.

5- Estou ciente de que não receberei qualquer remuneração como compensação.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino este termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Goiânia, ____ de _____ 2002

Assinatura do paciente

Pesquisador responsável

ANEXO II – INDICAÇÃO DE EXODONTIA

Goiânia, 17 de Setembro de 2002

Encaminho o paciente Fabrício David Jorge para que seja realizada exodontia dos dentes de número 14, 24, 34 e 44, ou seja,

Primeiro pré-molar superior direito

Primeiro pré-molar superior esquerdo

Primeiro pré-molar inferior esquerdo

Primeiro pré-molar inferior direito,

Para dar continuidade ao tratamento ortodôntico.

Atenciosamente,

Joaquim Henrique Figueiredo
Ortodontista CRO-2977

RESUMO

ABSTRACT