

Manuella Verdinelli de Paula Reis

**Avaliação de diferentes meios de armazenagem para dentes
avulsionados: estudo experimental em cães.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção
do título de Mestre em Odontologia na
Área de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2013

Manuella Verdinelli de Paula Reis

**Avaliação de diferentes meios de armazenagem para dentes
avulsionados: estudo experimental em cães.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção
do título de Mestre em Odontologia na
Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Carlos José Soares

Co-orientadora: Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos José Soares

Prof. Dr. Darceny Zanetta Barbosa

Prof. Dr. Wilson Roberto Poi

Uberlândia, 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R375a Reis, Manuella Verdinelli de Paula, 1987-
2013 Avaliação de diferentes meios de armazenagem para dentes avulsionados : estudo experimental em cães / Manuella Verdinelli de Paula Reis. -- 2013.
87 f. : il.

Orientador: Carlos José Soares.

Coorientadora: Camilla Christian Gomes Moura.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Periodontia - Teses. 3. Reabsorção da raiz (Dentes) - Teses. 4. Dentes - Reimplante - Teses. I. Soares, Carlos José. II. Moura, Camilla Christian Gomes. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família.

Aos meus pais, Herminio e Rosane, que sempre me apoiaram e incentivaram meus estudos. Mesmo diante dos momentos mais difíceis respeitaram minhas decisões e ficaram ao meu lado. Tenho certeza que minhas conquistas são reflexos de toda a dedicação pelos filhos.

Ao meu irmão, Marcel, companheiro para os momentos alegres e tristes, pois irmão é aquele que sofre pelas dores de quem também sofre pelas suas. Sempre presente na minha vida, acreditando no meu crescimento. Admiro seu exemplo de força, com amor e fé conseguimos enfrentar os obstáculos por maiores que sejam.

Ao meu sobrinho, Gabriel, com sua vitalidade, alegria e carinho torna os dias amenos. Como um anjo, ilumina a todos nós.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre está me guiando, e iluminando meu caminho, dando força, coragem, paciência e sabedoria para lidar com a longa jornada da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos José Soares, pelos ensinamentos, incentivo e apoio para o meu crescimento profissional. Admiro muito sua dedicação e preocupação, sempre buscando o melhor para os seus orientados.

Obrigada pelas oportunidades e confiança.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura, pela dedicação em me ensinar todos os dias, a qual foi fundamental para o meu crescimento e aprendizado. Obrigada pelo companheirismo e preocupação, pelas conversas informais, e pelos momentos divertidos.

À Profa. Priscilla Barbosa Ferreira Soares, que contribui para o desenvolvimento deste trabalho, esteve ao meu lado apoiando durante esses dois anos.

Ao Prof. Dr. Darceny Zanetta Barbosa e sua equipe da Cirurgia e Traumatologia Buco MaxiloFacial, que trabalharam com seriedade e dedicação na realização das etapas cirúrgicas.

À Profa. Paula Dechichi, pelos ensinamentos e contribuição com sua sabedoria e experiência durante o trabalho árduo de descalcificação e processamento histológico das amostras.

À amiga Fabiana Maria Soares Rocha, que me ensinou e apoiou desde o início do mestrado. Sempre solícita, colaborou durante todo o desenvolvimento do trabalho. Obrigada por sua companhia, pelos momentos divertidos e descontraídos.

À amiga Rayssa Ferreira Zanatta, a quem eu recorria como fotógrafa sempre que precisava. Colaborou durante a realização da cirurgia desse experimento.

Obrigada pelo convívio, conselhos, e momentos desesperadores que dividimos ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Gisele Rodrigues da Silva, que esteve à disposição para fotografar durante a realização das etapas cirúrgicas, e pelo convívio agradável.

Aos amigos e colegas da pós-graduação: Luisa, Marcel, Thiago, Maiolino, Marina, Kellen, Rodrigo, Mário, Andréa; e alunos de iniciação científica: Huberth, Rainde, Larissa, e Fernanda, os quais aceitaram prontamente ajudar durante a cirurgia dos cães. Esse trabalho só foi possível pela grande equipe, trabalhando com responsabilidade e seriedade.

Ao Prof. Manoel Damião Souza Neto e à Graziella Bianchi Leoni da Faculda de Odontologia de Ribeirão Preto, pelo suporte para a realização da microtomografia computadorizada.

À querida Laila Silva Santana, amiga desde a graduação, sempre ao meu lado apoiando com paciência e compreensão. Obrigada pelo enorme carinho, solidariedade e pela amizade sincera que sempre posso confiar.

À Profa. Dra. Veridiana Resende Novaes Simamoto e ao Prof. Dr. Murilo Sousa Menezes, pelos ensinamentos e convívio durante as clínicas, contribuíram muito para meu aprendizado como excelentes tutores.

Ao Prof. Dr. Paulo Vinícius Soares, acreditou no meu potencial, incentivando-me e apoiando para que tornasse discente de pós-graduação.

Ao Fabrício, técnico da área de histologia, que colaborou durante o processamento das amostras, e na obtenção dos cortes. Agradeço pela disposição em ajudar a qualquer dia e hora, e pela amizade.

Aos amigos e colegas da 11ª Turma de Mestrado, obrigada pela convivência, carinho, trocas de experiências e aprendizado nesses dois anos.

Aos secretários da Faculdade de Odontologia, Daniela, Wilton, Betânia, Graça, sempre atenciosos e à disposição para ajudar em tudo que eu precisasse.

À Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e à FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pela ajuda financeira para o desenvolvimento desse trabalho.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, por permitir meu crescimento pessoal e profissional, desde a graduação. Tenho imenso orgulho de ser aluna desta Instituição.

Epígrafe

"O amor é mais que um simples estado de enamoramento,
o amor é uma filosofia de vida"

Walt Disney

Sumário

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	9
REVISÃO DA LITERATURA	13
PROPOSIÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	74

Lista Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm - micrômetro

mm - milímetro

$^{\circ}\text{C}$ - Grau Celsius

PDL – Ligamento periodontal

HBSS – Solução Balanceada de Hank's

M - Molar

μCT – Microtomografia computadorizada

Resumo

RESUMO

Estudos têm proposto água de coco, e mais recentemente o leite de soja como meio de armazenagem para dentes avulsionados, devido aos seus nutrientes que são importantes fatores para nutrição e preservação da viabilidade das células. Este estudo investigou o potencial da água de coco, com pH ajustado, e do leite de soja em manter a viabilidade das células do ligamento periodontal, comparados ao leite integral bovino, leite desnatado bovino e Solução Balanceada de Hank's, por meio do método de exclusão do azul de tripan; e o processo de reparo periodontal de dentes de cães reimplantados após armazenagem nas mesmas soluções comparando com reimplante dental imediato por meio de análise histológica e microtomografia computadorizada (μ CT). Para o estudo *in vitro* foram extraídos pré-molares de cães Beagle, secos por 30 minutos sobre a superfície de uma gaze, e armazenados nos seguintes meios durante 50 minutos ou 24 horas: leite integral bovino (LI) (n=8), leite desnatado (LD) (n=8), Solução Balanceada de Hank's (HBSS) (n=8), leite de soja (LS) (n=8) e água de coco com pH ajustado (AC) (n=8). O controle positivo e dois negativos correspondiam a 0 min, 30 min (curto prazo), e 24 h (longo prazo) secos, respectivamente. As soluções foram avaliadas pela porcentagem de células viáveis. Para o estudo *in vivo*, quarenta incisivos superiores e inferiores de 10 cães Beagle foram extraídos e submetidos ao seguinte protocolo: reimplante imediato após extração (controle) (n=10); armazenagem imediata em AC (n=9), LS (n=8) e LI (n=9), respectivamente por 50 min antes do reimplante. Os animais foram eutanasiados com 28 dias de pós-operatório e os espécimes obtidos foram escaneados no microtomógrafo e submetidos ao processamento histológico para análise histomorfométrica. Nos resultados obtidos *in vitro* em curto prazo, LD apresentou significativamente menor nível de viabilidade celular que LI e AC. No período de 24h, LS e AC resultaram significativamente maior nível de viabilidade comparado ao HBSS e LD e similares ao grupo controle positivo (0 min). A viabilidade celular diminuiu ao longo do tempo (24h), exceto em LS e AC. O estudo *in vivo* mostrou que AC e LS foi similar ao LI em relação à condição periodontal; entretanto AC demonstrou menor variabilidade na condição do periodonto comparado ao LS.

LS demonstrou significativamente maior nível de anquilose em relação ao grupo controle. Este estudo demonstrou que a associação de análises μ CT e histológica para estudos *in vivo* é um método promissor para melhor visualização dos estágios do processo de reparo. Frente aos resultados obtidos nos estudos *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos neste estudo pode-se concluir que a AC demonstrou ser o meio de armazenagem superior para dentes avulsionados dentre as soluções pesquisadas.

PALAVRAS-CHAVE: reabsorção, meios de armazenagem, avulsão dental, ligamento periodontal, viabilidade celular.

Abstract

ABSTRACT

Studies have proposed coconut water, and more recently soy milk as storage medium for avulsed teeth, due to their nutrients are important factors to nutrition and preservation of cell viability. This study investigated the ability of pH-adjusted coconut water and soy milk to maintain the viability of periodontal ligament cells compared with bovine whole milk, bovine skim milk, and Hank's Balanced Salt Solution by using trypan blue exclusion; and the periodontal healing process of dog teeth replanted after storage in these solutions by using μ CT and histological analyses compared with immediately tooth replantation. The solutions were evaluated by percentage of viable cells. For *in vitro* study were extracted dog premolar teeth, dried for 30 min on the surface of a gauze, and stored in the following media for 50 min or 24 h: long shelf-life bovine whole milk (SWM) (n=8), long shelf-life skim milk (SSM) (n=8), Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (n=8), soy milk (SM) (n=8) and pH-adjusted coconut water (CW) (n=8). The positive and two negative control groups corresponded to 0-min, 30-min (short-term), and 24-h (long-term) dry times, respectively. For *in vivo* study, forty upper and lower incisors of 10 adult beagle dogs were extracted and subjected to the following protocols: immediate replantation after extraction (control) (n=10); stored immediately in coconut water with adjusted pH (CW) (n=9), soy milk (SM) (n=8) and bovine whole milk (WM) (n=9), respectively for 50 minutes before replantation. The animals were euthanized 28 days postoperatively and the specimens obtained were scanned by μ CT and subjected to routine processing for histometric analyses under optical microscope. The results obtained *in vitro* for the short-term experiment, the

SSM resulted in significantly lower cell viability than SM and CW. At 24 h, SM and CW resulted in higher viability than HBSS and SSM and in comparable performance with the positive control group (0 min). Cell viability decreased over time (24 h), except in SM and CW. *In vivo* study showed that CW and SM had a similar periodontal condition performance of WM; however CW demonstrated lower variability of the periodontal condition than SM. SM demonstrated significant higher ankylosis than control group. Additionally this study demonstrated that the association of μ CT and histological analyses for *in vivo* study is a promise method to better clarify the different stages of the tissue repairs. A despite of the results obtained *in vitro*, the *in vivo* study presented CW as superior storage media for avulsed teeth.

KEYWORDS: resorption, storage media, tooth avulsion, periodontal ligament, cell viability.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A avulsão dentária é caracterizada pelo deslocamento completo do dente de seu alvéolo, considerada uma das formas mais severas dos traumas dento-alveolares (Gopikrishna et al. 2008a). Este tipo de trauma acomete principalmente crianças e adolescentes, com incidência de 16% de todas as lesões traumáticas (Andreasen, 1970). Neste tipo de lesão ocorre comprometimento do suprimento neurovascular o que pode resultar em danos na estrutura do periodonto e perda da vitalidade pulpar (Martin & Pileggi, 2004). O tratamento ideal é o reimplante imediato que deve ser realizado o mais próximo possível da ocorrência do trauma. Para obtenção de melhor prognóstico deste procedimento, o tempo e o meio de armazenagem estão diretamente relacionados ao prognóstico (Martin & Pileggi, 2004). Entretanto, na maioria dos casos de avulsão, o dente é reimplantado após longo período extra-alveolar, sendo muitas vezes mantido a seco ou em meio inadequado (Soares Ade et al. 2008; Andersson et al. 2012). Em busca de minimizar futuras complicações como anquilose e reabsorção por substituição, as quais são as principais causas de insucesso no reimplante podendo levar a perda do elemento dental, o dente deve ser armazenado em meio que seja capaz de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal (PDL) (Gopikrishna et al. 2008a; Souza et al. 2011). O meio de armazenagem ideal deve ter pH apropriado cerca de 7.0, osmolaridade fisiológica, e conter substâncias nutritivas tais como, aminoácidos, vitaminas e proteínas que permitam o crescimento celular e a manutenção de sua vitalidade (Pearson et al. 2003). Solução Balanceada de Hank's (HBSS) tem sido recomendada como meio de armazenagem para dentes avulsionados pela Associação Americana de Endodontistas (AAE) (Andersson et al. 2012), entretanto este meio não está prontamente disponível para a população (Moazami et al. 2012). O leite bovino é outra solução amplamente aceita como meio de armazenagem para dentes avulsionados, mantendo a viabilidade das células PDL por longos períodos (Souza et al. 2010; Souza et al. 2011) .

Considerando todas estas propriedades que definem o meio de armazenagem mais adequado, estudos têm proposto água de coco como meio

superior para transporte de dentes avulsionados (Gopikrishna et al., 2008ab; Moreira-Neto et al., 2009; Souza et al., 2011). Água de coco é rica em aminoácidos essenciais, proteínas, vitaminas, minerais, eletrólitos e açúcares, os quais são responsáveis por sua alta osmolaridade. Estes nutrientes são fatores importantes para o crescimento e preservação da viabilidade das células PDL (Gopikrishna et al., 2008). Recentemente, estudos têm indicado o leite de soja como meio de armazenagem alternativo (Moazami et al. 2012; Silva et al. 2012; Moura et al. 2012), devido a boa fonte de minerais e vitaminas, o consumo de produtos à base de soja aumentou em muitos países. Entretanto, nenhum estudo *in vivo* foi realizado com água de coco e leite de soja para armazenagem de dentes avulsionados. Estudos *in vivo* devem ser realizados quando não podem ser obtidos resultados válidos usando métodos alternativos como nos estudos *in vitro* com uso de cultura de células (Andreasen & Andersson, 2011). A proliferação e a diferenciação das células PDL são melhoradas *in vivo* onde a hipóxia e a resposta imune atuam na viabilidade de células implantadas. Nesse aspecto é possível obter melhor desempenho das células PDL *in vivo*, o que pode levar ao sucesso no processo de reparo (Tour et al. 2012).

Enquanto alguns estudos têm analisado histologicamente o efeito do meio de armazenagem por meio de análise histomorfométrica (Sottovia et al. 2010; Panzarini et al. 2013), nenhum estudo *in vivo* analisou o efeito da água de coco e leite de soja com uso de análise histomorfométrica associada a análise por μ CT como novas perspectivas para o estudo do trauma. Esta técnica permite uma análise clara e detalhada da estrutura do periodonto tanto pelo dente por inteiro ou seccionado, sem danificar o espécime. Além disso, com a possibilidade de reconstrução da imagem pode ser obtido maior número de cortes por dente em um período curto, diferentemente da análise histológica convencional (Kühnisch et al. 2012). Frente a este cenário parece importante associar metodologias de avaliação histológica e estrutural por meio de μ CT para avaliar por meio de estudos *in vivo* e *in vitro* a performance da água de coco e do leite de soja como meios alternativos de armazenagem de dentes avulsionados.

Revisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Traumatismo Dental e Reabsorções Dentárias

As injúrias traumáticas ocorrem com frequência, aproximadamente 24% da população já sofreu traumatismo dento-alveolar. Estas lesões acometem principalmente crianças e adolescentes em idade escolar, com predominância do gênero masculino (Andreasen, 1970). A literatura mostra uma correlação entre trauma dental e idade com prevalência antes dos 30 anos (81,2%), sendo que cerca de 50% ocorrem antes dos 10 anos de idade (Gassner et al. 1999).

Os fatores etiológicos dos traumas estão relacionados a acidentes domésticos e de trabalho, acidentes automobilísticos, esportes, lazer e violência (Gassner et al. 1999). Não há predileção por hemiarcada, e os incisivos centrais superiores são envolvidos com maior frequência nas lesões traumáticas, sendo que o tipo de lesão está relacionado com o tipo de dentição. Fraturas dentárias são predominantes na dentição permanente, enquanto luxações e intrusões são predominantes na dentição decídua (Andreasen 1985).

Os traumatismos dento-alveolares podem afetar partes da coroa ou raiz, podendo causar até o deslocamento total do dente para fora de seu alvéolo, caracterizando caso de avulsão. Dentre os traumatismos dento-alveolares estes são considerados os de pior prognóstico. Normalmente, envolve um único dente, e sua incidência é cerca de 16% de todas as lesões traumáticas da dentição permanente (Andreasen 1970; Andreasen & Andreasen, 1994).

O tratamento de escolha para a avulsão dentária é o reimplante, ou seja, o ato de recolocar o dente avulsionado no seu alvéolo (Lustosa Pereira et al. 2006). Considerando que este tipo de traumatismo acomete principalmente crianças e adolescentes, ainda em fase de crescimento, o que limita as opções reabilitadoras, deve-se concentrar esforços para a realização do reimplante, já

que este tem a vantagem de restaurar a função e estética, mesmo que temporariamente (Andreasen & Andreasen, 1994). Quanto mais rápido é realizado o reimplante, melhor o prognóstico. No entanto, na maioria dos casos, ocorre o reimplante tardio do dente no alvéolo, o que compromete o prognóstico. O reimplante é considerado tardio após um período extra-alveolar superior a 30 minutos (Kenny & Barret, 2001). O potencial regenerativo de um dente avulsionado após reimplante dependerá da manutenção da viabilidade de cada componente celular dos tecidos envolvidos e de fatores específicos do paciente (Barrett & Kenny, 1997). Além do tempo fora do alvéolo, a forma com que se acondiciona o dente até o reimplante também é decisiva para o sucesso do tratamento. Isto porque, o ressecamento e morte das células do ligamento periodontal e dos cementoblastos está intimamente relacionado à reabsorção dentária (Chamorro et al. 2008).

Segundo Martin & Pileggi (2004), a forma com que o dente é armazenado e o tempo no qual este permanece fora do alvéolo são fatores de maior relevância após a avulsão. Diversas soluções tem sido propostas para armazenagem dos dentes avulsionados, tais como, produtos lácteos, leite fermentado e iogurte (Blomlöf, 1981), Viaspan, solução de Hank's – HBSS, leite bovino (Trope & Friedman, 1992), soro fisiológico, saliva, água de torneira (Lin et al. 2007), própolis (Martin & Pileggi, 2004), água de coco (Gopikrishna et al. 2008) e leite de soja (Moazami et al. 2012) entre outros.

A condição ideal seria o reimplante imediato, uma vez que é possível o ligamento periodontal manter-se sobre a superfície do cimento. Isto é essencial para a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas e posteriormente a regeneração. Diferentemente dos casos de reimplante tardio, onde ocorre a remoção do ligamento, comprometendo a fixação dessas células mesenquimais. Assim, o tecido conjuntivo periodontal aderido à parede alveolar após o reimplante, tende a formar uma cápsula envolvendo a raiz do dente reimplantado, e a esperada ocorrência da reinserção de fibras colágenas sobre a superfície do cimento torna-se impossível (Lustosa Pereira et al. 2006).

Normalmente, após a avulsão ocorre severo comprometimento do suprimento neurovascular, sendo o estágio de rizogênese decisivo para a revascularização bem sucedida. Caso não ocorra o processo de revascularização, poderá ocorrer contaminação, resultando em infecção. Consequentemente segue-se uma série de complicações, tais como necrose pulpar e possíveis reabsorções radiculares (Andreasen & Andreasen, 1994). Estas podem ser classificadas de acordo com a superfície dentária afetada, interna e/ou externa. Quanto ao mecanismo de ocorrência do processo em reabsorção inflamatória e reabsorção por substituição. Quanto à progressão clínica do processo de reabsorção radicular pode considerar em transitórios e progressivos. Além disso, a nomenclatura dos tipos de reabsorções pode ser baseada no diagnóstico clínico, radiográfico e histológico (Consolaro, 2005).

2.1.1- Mecanismos de defesa contra a reabsorção

Fisiologicamente, as raízes dentais apresentam resistência ao processo de reabsorção. Entre as hipóteses que suportam esta resistência natural, a mais antiga destas, afirma que os restos epiteliais de Malassez constituem fator de limitação da reabsorção radicular em dentes que mantiveram a vitalidade do ligamento periodontal. Segundo essa hipótese, a presença dos restos epiteliais está relacionada à existência de ligamento periodontal vital, sendo que estes circundariam a raiz como uma rede, promovendo resistência aos diversos tipos de reabsorções (Löe et al. 1961). Entretanto, esta teoria não teve grande aceitação, e uma segunda hipótese (mais provável) foi apresentada (Andreasen, 1989). Baseada na premissa de que o cimento e a pré-dentina que cobre a dentina são elementos essenciais na resistência radicular à reabsorção, observou-se que os osteoclastos não aderem ou reabsorvem uma matriz desmineralizada. Para que isto ocorra, é necessária a presença de mediadores de ligação dos osteoclastos, proteínas ósseas não colagenosas específicas como a osteopontina, as quais contêm uma sequência de arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp ou RGD) única (Andreasen & Andreasen, 1994). A superfície mais externa do cimento é coberta por uma camada de cementoblastos e uma zona de cimento não-mineralizado. Esta superfície poderá oferecer condições satisfatórias para os

mediadores de ligação dos osteoclastos. Internamente, a dentina é coberta por uma matriz de pré-dentina, que possui uma superfície orgânica similar. Essa teoria foi sustentada por diversos estudos (Stenvik et al. 1970; Polson et al. 1982; Wedenberg et al. 1985).

Outra função da camada de cimento está relacionada com sua capacidade de inibir a difusão de toxinas presentes no espaço do canal radicular para o tecido periodontal circundante (Trope, 2002). No entanto, se a camada de cimento é perdida ou danificada, células multinucleadas colonizarão a superfície mineralizada que está descoberta e desencadearão um processo de reabsorção (Lindskog et al. 1987). Ou seja, para que ocorra reabsorção radicular é necessária a perda ou alteração da camada protetora (pré-cemento ou pré-dentina) associado ao estabelecimento de processo inflamatório na superfície radicular desprotegida.

2.1.2- Mecanismos para ocorrência de reabsorção radicular

1. 2.1.2.1 Perda ou alteração da camada protetora

Nos casos de avulsão geralmente ocorrem poucos danos para a camada de cimento. O dano maior é o rompimento do ligamento periodontal. Danos físicos à camada de cimento irão ocorrer apenas em pontos específicos onde à força do trauma pressiona o dente diretamente contra o osso alveolar. A resposta inflamatória à lesão traumática varia de acordo com o estímulo ao qual o dente é exposto após a injúria, e pode causar danos extensos à camada protetora de cimento. Caso as células remanescentes radiculares do ligamento periodontal estejam secas antes do reimplante, fornecerão estímulo para uma resposta inflamatória em toda a superfície radicular, que, por sua vez, resultará em danos para a camada protetora de cimento (Andreasen, 1981; Soder et al. 1977).

Pouco se sabe sobre danos causados para a camada protetora de pré-dentina. Geralmente os clastos se fixam em tecidos mineralizados, e a pré-dentina, o pré-cemento e o tecido osteoide atuam como protetores desse tecido evitando a reabsorção (Consolaro, 2012). Para que ocorra algum tipo de dano,

a polpa deve sofrer necrose rapidamente, o que leva ao interrompimento da vascularização, para uma reabsorção celular. Este por sua vez, protege a raiz de reabsorções extensas. Portanto, o estabelecimento de inflamação pulpar adjacente à superfície radicular danificada é raro. Tal fato confirma-se pela incidência extremamente baixa de reabsorção radicular interna em dentes permanentes (Tronstad, 1988).

2.1.2.2 Processo inflamatório na superfície radicular desprotegida

A resposta inflamatória causada pela lesão dental pode ser dividida em duas fases críticas. A primeira é a fase destrutiva, na qual, células de revestimento ressecadas e danificadas promovem o estímulo para as células gigantes multinucleadas, clastos, iniciarem a reabsorção. Esta destruição permanece enquanto há estímulo presente para permitir que a inflamação se desenvolva. Danos mecânicos à superfície da raiz, materiais estranhos, ou bactérias presentes no local do acidente aderidas à superfície da raiz, em curto período de tempo podem funcionar ou atuar como mecanismos desencadeadores das reabsorções. A permanência do estímulo inflamatório torna o processo crônico, fazendo com que a reabsorção radicular continue, sendo de suma importância a intervenção do cirurgião-dentista. Esta fase destrutiva da reabsorção radicular é diagnosticada principalmente pelo aparecimento de uma área radiolúcida na raiz e no osso adjacente, evidenciadas por meio de radiografias. Além disso, o diagnóstico pode ser complementado pela presença de sintomas clínicos, que são semelhantes à periodontite apical (Trope, 2002).

A segunda fase da resposta inflamatória é a fase de reparo, na qual o fator determinante é o tipo de células que recobrirão a superfície radicular. Se cementoblastos forem capazes de cobrir a superfície radicular danificada, ocorrerá reparo com tecido cementóide (Andreasen & Andreasen, 1994) favorecendo o prognóstico. Por outro lado, se células produtoras de osso forem capazes de recobrir a superfície da raiz, as condições para a cicatrização serão

desfavoráveis, e ocorrerá o contato direto entre osso e raiz ao longo de algumas áreas da superfície radicular; um fenômeno denominado como anquilose (Hammarstrom et al. 1986). Assim, a raiz é reabsorvida pelos osteoclastos, e aos poucos substituída por osso. Este processo é designado como reabsorção por substituição óssea (Andreasen & Andreasen, 1994).

O tipo de tecido que vai cobrir a superfície da raiz é dependente da extensão do dano radicular e da relativa proximidade das células à raiz, ou seja, o quanto longe e quanto rápido as células podem chegar, a fim de cobrir a superfície radicular danificada. A lesão localizada sobre uma pequena superfície favorece a cicatrização do cimento. Por outro lado, uma lesão difusa sobre uma grande área favorecerá anquilose com reposição óssea (Trope, 2002). É necessária destruição de mais de 20% da superfície radicular para ocorrer a reabsorção por substituição (Lindskog et al. 1985).

2.2 - Classificação das reabsorções dentárias

2.2.1 - Reabsorção Radicular Inflamatória

A reabsorção inflamatória pode apresentar caráter transitório ou progressivo, ocorrendo com frequência em dentes traumatizados. Quando pequenas áreas da camada de pré-dentina ou cimento são danificadas, o estímulo pode não ser suficiente para sustentar este processo de reabsorção. Dessa forma, a colonização nas áreas expostas da raiz será transitória, ocorrendo reparo tecidual com cimento tanto no conduto radicular quanto na superfície. Este tipo de reabsorção apresenta-se como progressiva, quando ocorre em dentes que sofreram lesões de deslocamento. Neste aspecto, leva a ruptura dos vasos sanguíneos na região de forame apical e necrose pulpar isquêmica. A infecção será estabelecida se os microorganismos atingirem o conduto radicular por meio de trincas no esmalte e dentina e por túbulos dentinários expostos. Assim, produtos bacterianos do conduto radicular infectado, alcançarão as lacunas de reabsorção na superfície radicular através

dos túbulos dentinários e estimularão a reabsorção da raiz, a qual será mantida caso não haja intervenção endodôntica (Tronstad, 1988).

2.2.2 - Reabsorção Interna

As reabsorções internas estão relacionadas aos traumatismos em 44% dos casos (Consolaro, 2012). Nestes casos, ocorrem deslocamentos focais de pré-dentina e da camada odontoblástica, podendo causar áreas de exposição dentinária ao tecido conjuntivo. Isto poderá originar as reabsorções internas (Consolaro, 2012). Este processo é dividido em dois tipos, transitório e progressivo, este último exige uma contínua estimulação por infecção (Wedenberg et al. 1985).

A reabsorção é caracterizada como transitória, quando odontoblastos de uma área do canal radicular são destruídos. A atividade de reabsorção será sustentada por uma infecção de tecido pulpar necrótico na porção coronária do canal radicular para a área onde a reabsorção ocorre. (Tronstad, 1988; Wedenberg et al. 1985). Assim, para a reabsorção interna tornar-se progressiva, os túbulos dentinários têm que estar abertos a uma área do canal radicular, onde o tecido está necrótico e infectado para que microrganismos possam entrar nos túbulos (Tronstad, 1988).

2.2.3 - Reabsorção Externa

A reabsorção externa ocorre quando clastos, de fora para dentro, aproximam da dentina mais próxima da polpa, e encontram a pré-dentina. Assim, há o deslocamento dos clastos, enquanto a pré-dentina se mineraliza. A superfície dentinária apresentará irregularidade com áreas afetadas amplas e extensas, e presença de inúmeros clastos (Consolaro, 2012).

Esse tipo de reabsorção acomete a superfície radicular, podendo evoluir no sentido apical ou coronário. Na coroa pode levar a perda significante

de dentina em pontos específicos. A região média e apical da raiz dependerá do fator desencadeante, o qual pode comprometer gradativamente a estrutura dentária, em um sentido aleatório e irregular, contornando e respeitando a polpa dentária (Consolaro, 2012).

2.2.4 - Reabsorção Superficial

A reabsorção superficial é caracterizada devido a sua amplitude em extensão e sua pequena profundidade, atribuindo um caráter inofensivo e passageiro (Consolaro, 2005).

A interface cemento-dentina apresenta desorganização tecidual e irregularidade associadas a um infiltrado inflamatório mononuclear, a qual aumenta conforme a evolução do processo de reabsorção. A relação entre ligamento periodontal e cemento encontra-se comprometida, devido a uma desorganização desse ligamento. No entanto, as células poderão apresentar fases diferentes de reorganização superficial para uma futura fase de reparação da área que está envolvida. No caso de reparo, a superfície estará uniforme e reparada, apresentando uma relação de normalidade com as fibras e células do ligamento periodontal, não comprometendo a função (Consolaro, 2005).

2.2.5 - Reabsorção por Substituição Óssea e Anquilose

Na anquilose alveolodentária há uma relação direta entre dente e osso alveolar, ocorre perda do ligamento periodontal e sua substituição por tecido ósseo (Consolaro, 2005).

Assim, uma vez estabelecido o quadro de anquilose, os elementos essenciais tais como pré-cemento e cementoblastos, que protegem a superfície radicular da instalação de unidades osteorremodeladoras desaparecem. A formação do contato ósseo direto e a incorporação dos tecidos dentários na estrutura óssea alveolar promove a inclusão da superfície radicular no

processo de osteorremodelação, caracterizando a reabsorção por substituição óssea. Este processo de reabsorção gradativa ocorre em períodos de tempo variáveis, podendo ser parcial ou total (Consolaro, 2005).

A evolução desta reabsorção dependerá da continuidade e frequência do estímulo que a induziu, e de associações com processos inflamatórios superpostos do próprio trauma. Esse processo de substituição do tecido dentário por tecido ósseo tende a ser lento. Entretanto, na presença de processo inflamatório superposto, acarretará acúmulo de mediadores locais do processo de reabsorção, promovendo uma aceleração deste (Consolaro, 2012).

2.3- Meios de Armazenagem

O prognóstico do reimplante dental depende da presença de células viáveis do ligamento periodontal, com capacidade de se proliferarem nas áreas radiculares que foram danificadas. Após a avulsão, a porção de células periodontais que estão ligadas à parede alveolar permanece vital, diferentemente das células que estavam aderidas ao dente, que dependem de uma possível regeneração pós-reimplante (Andreasen & Kristerson, 1981).

O procedimento de reimplante deve ser realizado tão rápido quanto possível, e o meio de armazenamento para o dente avulsionado é também um fator determinante para o prognóstico. A manutenção da vitalidade das células do ligamento periodontal aderidas ao dente, é menor em um ambiente seco (Andreasen & Kristerson, 1981). O tempo extraoral provoca danos irreversíveis às células do ligamento periodontal, as quais após reimplante desenvolverão resposta inflamatória ao longo da superfície radicular, podendo resultar posteriormente em uma anquilose, ou ocorrer a perda do elemento dental (Sigalas et al. 2004).

No entanto, para minimizar o longo período extraoral, existem soluções capazes de preservar a vitalidade dessas células durante o tempo em

que o dente permanece fora do alvéolo. Estas soluções devem ser utilizadas quando o reimplante imediato não for possível (Krasner, 1992). Um meio de armazenagem ideal seria aquele capaz de preservar a viabilidade celular, promover mitose e formação de clones das células do ligamento que foram danificadas, a fim de facilitar a regeneração da superfície radicular, impedindo a reabsorção desta (Ashkenazi et al. 1999). Além disso, para a manutenção do metabolismo celular é necessário que o meio de armazenagem seja renovado em um período de 60 minutos (Çaglar et al. 2010). Dessa forma, impede-se a destruição celular que se inicia quando os metabólitos são consumidos. Caso estas células resistam nesses meios de armazenagem, é possível a reprodução de novas células que podem se diferenciar e restabelecer os tecidos (Shaul et al. 2009).

Um meio adequado para armazenagem temporária de dentes avulsionados deve conter sais, aminoácidos, vitaminas e açúcares essenciais para manutenção do metabolismo celular (Alacan et al. 1996). Além disso, a temperatura do meio de armazenagem é um fator a ser considerado, pois afeta diretamente a viabilidade celular (Blomlof, 1981; Schwartz et al. 2002). O armazenamento de dentes avulsionados num meio fisiológico em baixa temperatura durante uma hora, proporciona condições que permitem maior número de células viáveis saudáveis e, portanto, funcionais, quando comparado ao armazenamento do mesmo meio em tempo igual, à temperatura ambiente. Entretanto, em um período inicial, no qual as células são expostas à mudança de temperatura súbita, observa-se um baixo número de células viáveis (Sigalas et al. 2004). Sendo assim, o meio ideal deve ter uma osmolaridade fisiológica (230-400 mOsm/kg), pH entre 7,2 à 7,4 (Goswami et al. 2011) e temperatura adequados, para permitir o crescimento das células ou a sobrevivência destas. Ainda, deve estar prontamente disponível para o uso em situações de emergência (Chamorro et al. 2008).

Existem inúmeros relatos de meios de armazenagem, tais como água de torneira, saliva, soro fisiológico, Gatorade ®, própolis, HBSS, Viaspan ®, leite longa vida (produtos lácteos) e água de coco. Mas antes que estes

meios sejam aceitáveis, é preciso avaliar em estudos experimentais (Goswami et al. 2011).

A água de torneira tem mostrado ser a única com resultados menos desejáveis. Embora proteja o dente de desidratação, é considerada como meio hipotônico o que leva a uma lise nas células do ligamento, sendo semelhante a uma armazenagem a seco (Blomlof, 1982).

Outro meio que também não apresenta sucesso no prognóstico é a saliva. Devido à presença de microrganismos e sua osmolaridade baixa (60-70 mOsm/kg), menor que a fisiológica. Diante disso, pode ser usada apenas por um curto período de tempo, pois poderá danificar as células do ligamento periodontal (Blomlof, 1982).

A solução salina apesar da sua osmolaridade compatível de 280 mOsm/kg, esse meio carece de nutrientes, tais como magnésio, cálcio, e açúcares. Estes são precursores essenciais para as vias metabólicas celulares (Alacan et al. 1996). Essa solução de armazenagem quando utilizada em um período igual ou superior a duas horas, mostra-se prejudicial ás células do ligamento periodontal (Krasner, 1992).

Isotônicos como Gatorade, não são considerados como meio adequado para armazenamento de dentes avulsionados devido ao seu pH ácido, cerca de 2,91 (Harkacz et al. 1997). Quando as células são expostas a um pH baixo, poderá danificar a membrana celular, impossibilitando a manutenção da viabilidade celular (Chamorro et al. 2008). Além disso, trata-se de uma solução hipertônica (407 mOsm/kg), o que poderá causar perda de água nessas células (Goswami et al. 2011).

As propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes da solução de propólis, têm estimulado seu estudo em diversas áreas da saúde. Diante do potencial de suas substâncias, este meio pode ser promissor para a manutenção da viabilidade celular de dentes avulsionados (Ozan et al. 2007; Mori et al. 2010).

A Solução Salina Equilibrada de Hanks (HBSS) é uma solução padrão de soro fisiológico, que é amplamente utilizada em pesquisas biomédicas por manter a cultura de diversos tipos de células (Krasner et al. 1992). Esta solução não é tóxica, é biocompatível com as células do ligamento, tem pH 7,2, e uma osmolaridade de 320 mOsm/kg. Além disso, contém nutrientes, tais como glicose, cálcio e íons de magnésio, que podem sustentar e reconstituir os componentes celulares. É considerada eficaz para a preservação da viabilidade, mitogenicidade, e capacidade clonogênica das células por até 24 horas a 4 ° C (Ashkenazi et al. 2000; Ashkenazi et al. 2001).

Viaspan® é um meio utilizado para o transporte de órgãos, os quais vão ser transplantados e tem sido muito eficaz para armazenar dentes avulsionados. Viaspan® tem osmolaridade de 320 mOsm/kg e pH com cerca de 7,4 à temperatura ambiente, o que pode ser ideal para o crescimento celular (Ashkenazi et al. 1999).

O extrato de chá verde tem sido estudado, devido às suas capacidades anti-inflamatórias, antioxidantes e seus efeitos anti-carcinogênicos. Embora seu pH (5,9) e osmolaridade (139 mOsmKg) não seja ideal para o crescimento celular, foi apresentado que esse meio possui eficácia em manter a viabilidade das células do ligamento periodontal, podendo ser um meio alternativo para dentes avulsionados (Hwang et al. 2011).

A água de coco é uma solução isotônica biologicamente pura e estéril, disponível em vários países do mundo, principalmente em países tropicais. Apresenta importante ação na reposição de fluidos, eletrólitos e açúcares perdidos durante a atividade física. Essa composição rica em eletrólitos tem maior semelhança ao líquido intracelular que o plasma extracelular. Os cátions predominantes são potássio, cálcio e magnésio. O sódio, o cloreto, e o fosfato são encontrados em baixas concentrações. Além disso, a água de coco possui uma alta osmolaridade, devido à presença de açúcar, glucose e frutose (Gopikrishna e tal. 2008ab). Também é rica em aminoácidos essenciais, tais como lisina, cistina fenilalanina, e histidina (Gopikrishna e tal. 2008a), proteínas, vitaminas e minerais (Campbell-Falck et

al. 2000). Devido às suas propriedades, foi proposta como meio alternativo de transporte para dentes avulsionados (Gopikrishna e tal. 2008ab; Moreira-Neto et al. 2008).

No entanto, é uma solução hipotônica, possui pH mais ácido que o plasma (Gopikrishna e tal. 2008a), o qual é deletério para o metabolismo celular (Moreira-Neto et al. 2008). Nesse aspecto, o ajuste do pH é um fator importante a ser considerado para preservar a viabilidade celular. Durante a neutralização do pH a osmolaridade da água de coco aumenta, e isto pode também contribuir para a manutenção da viabilidade das células (Moreira-Neto et al. 2008).

A despeito das várias soluções disponíveis, a Associação Americana de Endodontia indica o leite como solução ideal para dentes avulsionados. Este produto é relatado como significativamente melhor do que outras soluções, devido às suas propriedades fisiológicas, incluindo o pH e a osmolaridade compatível com as propriedades das células do ligamento, fácil disponibilidade, e por serem livres de bactérias (Blomlof et al. 1981). Os resultados favoráveis do leite estão relacionados à presença de substâncias nutritivas, tais como aminoácidos, hidratos de carbono, e vitaminas (Marino et al. 2000). Porém, existem controvérsias quanto às diferentes disposições dos leites. O Leite em pó é eficaz e tem a vantagem de não necessitar de refrigeração. Fórmulas infantis fortificadas também se mostram eficazes na manutenção da viabilidade das células do ligamento, por um período de quatro horas. Além disso, essas formulações em pó não requerem armazenamento especial, tendo uma vida útil de 18 meses (Pearson et al. 2003).

O leite de soja é uma solução aquosa a base de extrato de soja, rica em proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais essenciais (Moazami et al. 2012; Silva et al. 2012). Essa solução não contem colesterol ou lactose e seu nível de gordura saturada é extremamente baixo (Ng et al. 2008; Wang et al. 2002). Apresenta pH adequado e osmolaridade fisiológica (Silva et al. 2012). Além disso, pode atuar na prevenção de doenças crônicas como aterosclerose, cancer, osteoporose e desordens da menopausa (Liu et al. 2002), apresenta

excelentes propriedades que indicam favorecer o crescimento celular e atividades bioquímicas (Scalabrin et al. 1998). Estudos recentes mostraram que leite de soja apresentou potencial na manutenção da viabilidade celular, podendo ser recomendado como meio alternativo para armazenagem de dentes avulsionados (Moazami et al. 2012; Silva et al. 2012; Moura et al. 2012).

2.4- Estudos *in vitro* x Estudos *in vivo*

Diversas metodologias são empregadas para simular a condição clínica de avulsão dentária, podendo estas ser *in vitro* ou *in vivo*, em animais testes (Andreasen & Andersson, 2011). Normalmente, nos estudos *in vitro* que avaliam meios de armazenagem para dentes avulsionados, são empregados os testes de viabilidade celular (Gopikrishna et al. 2008a; Moazami et al. 2012). Estes determinam células viáveis e não viáveis, sendo capazes de fornecer informações gerais das células. Esses testes tornaram-se ferramenta essencial em qualquer laboratório, podendo ser realizados por meio de estudos baseados em células e testes laboratoriais clínicos (Kim et al. 2011).

Os princípios dos testes estão relacionados à presença de danos na membrana celular. Células com membranas intactas podem excluir determinados corantes, diferindo-se das células mortas. Entre os diversos testes e métodos de viabilidade celular, o teste por exclusão do azul de tripan com o hemocitômetro é o mais utilizado (Kim et al. 2011), por envolver técnica rápida e de fácil desempenho (Sigalas et al. 2004). Esse método determina se as células estão vivas ou não vivas, com base na análise da integridade da membrana plasmática celular. No entanto, a sensibilidade deste método é relativa, devido a não caracterização do estado metabólico das células, ou seja, a membrana plasmática pode permanecer intacta, sem a célula ter qualquer atividade metabólica (Tatnall et al. 1990). Dessa forma, este método não faz distinção entre as células que estão em processo de apoptose e necrose.

O estado de uma célula do ligamento periodontal viável é crucial para a prevenção de reabsorção após reimplante (Rajendran et al. 2011). Foi

demonstrado que ensaios de proliferação *in vitro* são muito sensíveis para mensurar a viabilidade celular, devido ao tempo de tratamento extraoral e às condições de armazenamento, preferencialmente às técnicas de exclusão ou fixação celular (Lekic et al. 1998). Além disso, há possibilidade de ocorrer erros durante as etapas do processo, na contagem de células com a câmara de Neubauer. No entanto, tais erros também estão susceptíveis em outros testes, como na citometria de fluxo (Kim et al. 2011). Alternativamente, este teste foi introduzido com bom desempenho e melhor reproduzibilidade. Entretanto, esse tipo de teste demanda maior tempo, complexidade e alto custo (Jones & Sentf, 1985).

Outro método para avaliar viabilidade é por análise da função metabólica celular, utilizando o Ensaio MTT (3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2, 5-difenil tetrazólio brometo). É um composto hidrossolúvel facilmente incorporado pelas células viáveis, e reduz o metabolismo pela ação das desidrogenases. O MTT é convertido em cristais de formazan, armazenados no citoplasma celular e posteriormente solubilizado por dimetilsulfóxido (DMSO). A viabilidade celular e a atividade metabólica são quantificadas pela quantidade de formazan produzido, a qual é expressa como um valor de absorbância, analisada por espectrofotometria (Mossmann, 1983; Andrioghi-Fröhner et al. 2003; De Souza et al. 2010). Entretanto, estudos que utilizaram como metodologia o ensaio de MTT perceberam que substâncias coloridas afetam a medida de absorbância, de modo que o valor tende a ser maior do que o indicado (Smee et al. 2002; Hwang et al 2011).

Uma metodologia alternativa é o vermelho neutro, também indicado para ensaios de viabilidade celular (Silva et al. 2008). Trata-se de um corante catiônico fraco de cor vermelho neutro que penetra facilmente nas membranas celulares por difusão e se acumula intracelularmente em lisossomos de células vivas. As alterações provocadas nas células podem resultar em uma menor captação e ligação desse corante. A quantidade de corante acumulado é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Assim, por meio da absorbância é possível avaliar o nível de danos causados às células.

Alguns estudos têm utilizado fibroblastos isolados a partir de outras fontes não provenientes do ligamento periodontal (Hiltz & Tope, 1991; Trope, 1992). Apesar da sua morfologia semelhante, fibroblastos de lábio, gengival, ou de pele, não se comportam, em cultura, da mesma maneira às células do ligamento periodontal (Marino et al. 2000). As taxas de produção de proteína e colágeno são maiores nas células do ligamento (Oikarinen & Seppa, 1987), os níveis de fosfatase alcalina são mais elevados (Somerman et al. 1988), e as taxas de crescimento também são显著mente diferentes (Mariotti & Cochran, 1990). Portanto, fibroblastos obtidos a partir de fonte diferente do ligamento periodontal podem não refletir com precisão a capacidade dos fibroblastos do ligamento permanecerem viáveis em cultura (Marino et al. 2000). Embora estes estudos possam auxiliar nestas análises, é necessário complementos para resultados mais confiáveis (Rajendran et al. 2011).

Sendo assim, estudos *in vivo* devem ser concebidos para testar as mesmas soluções de um modo clínico mais relevante. Esses estudos *in vitro* podem apresentar reações divergentes às observadas histologicamente, quando se avalia processo de reparo no periodonto, como reabsorção, e anquilose (Sigalas et al. 2004). Portanto, experimentos com animais para análises histológicas são sugeridos (Hwang et al. 2011) para se obterem resultados potencialmente compatíveis com a realidade clínica.

Proposição

3. PROPOSIÇÃO

O presente estudo foi dividido em duas etapas sequenciais e complementares

Etapa 1 – Estudo *in vitro*

Tem como objetivo avaliar o potencial da água de coco com pH ajustado e do leite de soja em manter a viabilidade de células PDL comparando-os ao leite integral bovino, leite desnatado bovino e HBSS em dois períodos experimentais, 50 minutos e 24 horas, por meio do teste de exclusão azul de tripan.

Etapa 2 – Estudo *in vivo*

O presente estudo *in vivo* tem como objetivo avaliar o processo de reparo do periodonto quantitativamente e qualitativamente de dentes de cães reimplantados após armazenagem em leite integral bovino, leite de soja e água de coco com pH ajustado, por meio de análise histomorfométrica e μ CT.

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais, pela Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), protocolo nº. 101/11. A apresentação será detalhada em etapa 1 – Estudo *in vitro* e etapa 2 – estudo *in vivo*.

4.1. Estudo *in vitro*

Foram utilizados nesse estudo 11 cães da raça Beagle adultos (18 meses) obtidos do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram pré-anestesiados com sulfato de atropina 1% (Atropion; Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas, São Paulo, SP, Brasil; 0.04 mg/kg). Após um período de 5 minutos, os animais foram anestesiados intramuscularmente com cloridrato de xilazina 2% (Anasedan; Agribrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil; 1mg/Kg) e cloridrato de Ketamina (Dopalen; Sespo Indústria e Comércio Ltda, Jacareí, SP, Brasil; 15mg/Kg) para obtenção da anestesia geral. Foi realizada antisepsia da cavidade bucal com solução de clorexidina 0,2% (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda. São José do Rio Preto), e após a colocação de campos estéreis, a submucosa dos cães foram anestesiadas com mepivacaína 2% com adrenalina 1:100.000 (DFL Indústria e Comércio S.A., Rio de Janeiro, RJ) para obtenção de hemostasia. Inicialmente realizou-se uma sindesmotomia cortante com bisturi (Duflex S.A., Rio de Janeiro, RJ) e lâmina 11 (Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japão) no sulco gengival, em direção à crista óssea, até sentir-se a resistência óssea, complementada com ação de sindesmótomo (Duflex), e a seguir a exodontia foi realizada cuidadosamente com fórceps pediátricos (Duflex) e movimentos suaves de luxação. Foram extraídos 52 pré-molares inferiores, e seccionados, separando as raízes por meio de broca diamantada nº 2200 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) (Figura1).



Figura1. Raízes seccionadas para extração.

As 104 raízes obtidas foram randomizadas e divididas em 13 grupos (n=8):

Grupo I (Controle positivo): os dentes foram avaliados imediatamente após a extração;

Grupo II (Controle negativo): os dentes foram mantidos secos sobre uma superfície durante 30 minutos e 24 horas;

Nos demais grupos, os dentes foram mantidos secos por 30 minutos e armazenados em 5 diferentes soluções de armazenagem para dentes avulsionados (Figura 2), com 2 períodos experimentais diferentes: 50 minutos e 24 horas, mantidas sobre refrigeração à 4°C.

Grupo III: Água de coco (Ducoco, Itapipoca, CE, B): com pH ajustado para 7 com uso de trietanolamina (Bothanica, Uberlândia, MG, Brasil);

Grupo IV: Solução Balanceada de Hanks – HBSS (Cutilab, São Paulo, Brasil);

Grupo V: Leite Integral (Italac Integral, Italac, Corumbaíba, GO, Brasil);

Grupo VI: Leite Desnatado (Italac Desnatado, Italac, Corumbaíba, GO, Brasil);

Grupo VII: Leite de soja (Sollys Original, Nestlé, Araras, SP, Brasil).



Figura 2. Soluções experimentais utilizadas para armazenar os dentes avulsionados. A) Grupo III – água de coco. B) Grupo IV – Solução Balanceada de Hank's. C) Grupo V – leite integral. D) Grupo VI – leite desnatado. E) Grupo VII – leite de soja.

Cada dente após o período experimental, foi lavado com solução tampão fosfato-salino, PBS (LGC Standards, Teddington, UK) 0,1M por 3 vezes, e incubado por 30 minutos em tubos de 2 ml contendo 500 μ l de 0,2mg/ml $^{-1}$ de colagenase - CLS II (Cooper Biomedical, Malvern, PA, USA) e 2,4mg/ml $^{-1}$ de solução dispase II (Gibco, Taastrup, Denmark) em PBS. Após o período de incubação, foi acrescentado 20 μ l de soro fetal bovino – FBS (Invitrogen, New Jersey, USA) para inativação enzimática. Todos os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 110 \times g. O sobrenadante que se formou foi removido, o pellet foi re-suspendido, e as células foram misturadas com azul de tripan 0,4%. Alíquotas de 10 μ l da suspensão celular e a mesma proporção do corante azul de tripan foram adicionadas no hemocitômetro para determinar o número de células viáveis e não viáveis, com o uso de um microscópio de luz no aumento de 20x (Figura 3). A contagem para cada dente foi realizado por um único examinador cego e calibrado, e o número de células viáveis foram calculados por porcentagem.

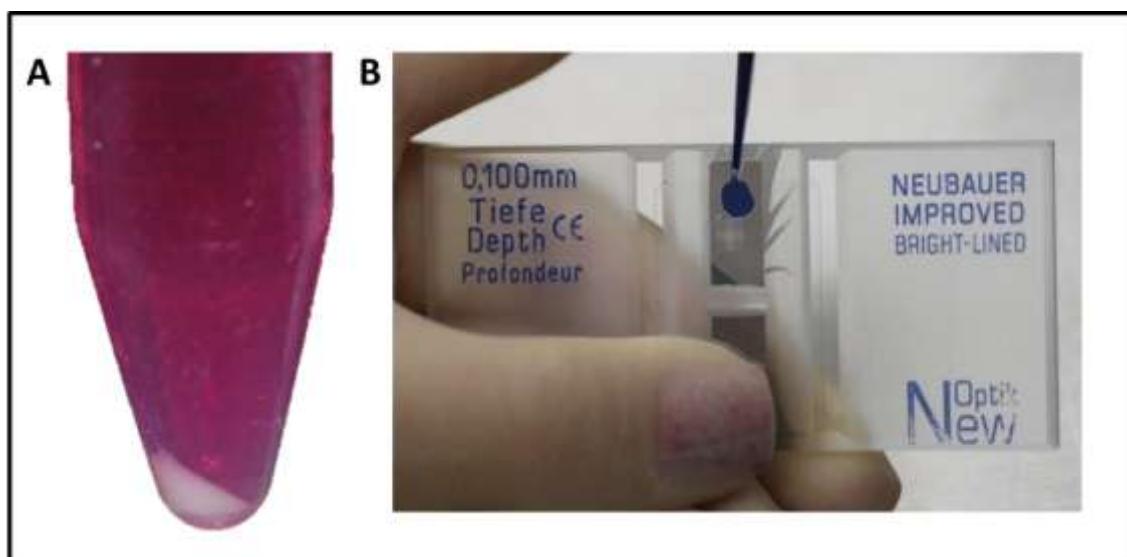


Figura 3. A) Sobrenadante formado. B) Suspensão celular com azul de tripan para contagem no hemocitômetro.

4.1.2. Análise Estatística

A porcentagem obtida de cada célula contada por grupo, 50 minutos e 24 horas se apresentaram dentro do padrão de normalidade da distribuição dos dados e homogeneidade das variâncias. Desta forma foram realizadas duas análises estatística destes dados. Na análise inicial, buscando comparar os fatores em estudo: meio de armazenagem e período experimental, os dados foram analisados com ANOVA fatorial seguido do Teste de Tukey. Na segunda análise, para avaliar a diferença na viabilidade celular entre os grupos controle positivo, controle negativo, e os demais grupos de soluções avaliadas em cada tempo de avaliação, os dados foram analisados com ANOVA em fator único seguido do Teste de Dunnet. Em todos os testes realizados, os grupos foram considerados com diferença estatística significante: $P = 0,05$.

4.2. Estudo *in vivo*

Foram utilizados os mesmos cães da raça Beagle adultos utilizados na etapa 1 deste estudo. Estes animais foram submetidos ao mesmo protocolo de anestesia, descrito na etapa 1, para extração dos incisivos centrais, intermédios e laterais superiores e inferiores, de forma menos atraumática possível, a fim de simular avulsão dental. Quarenta e dois dentes foram extraídos medidos com régua milimetrada (Microdont, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 4), e imediatamente armazenados em uma das 4 soluções experimentais durante 50 minutos:

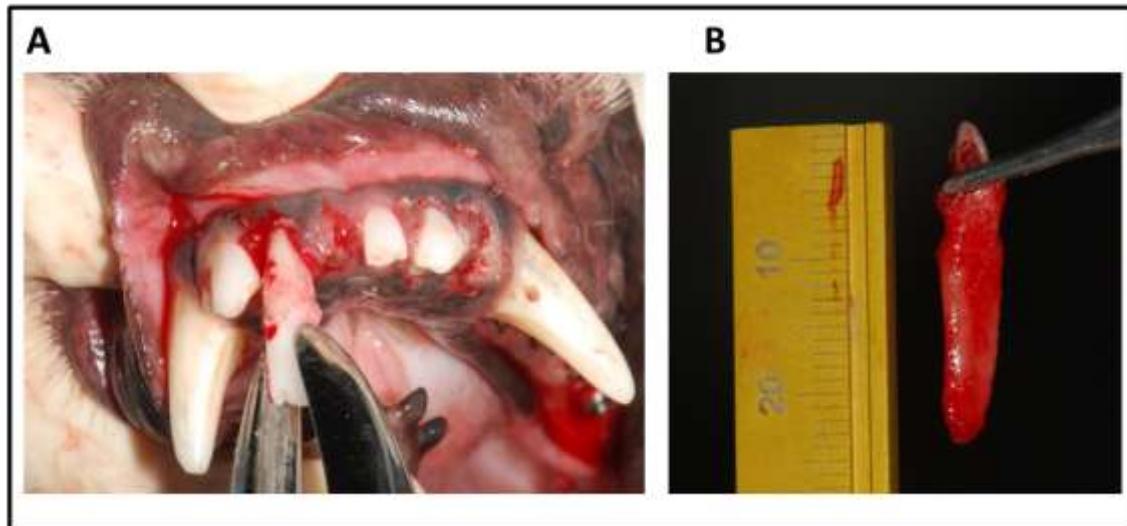


Figura 4. A) Extração dos incisivos superiores. B) Realização da odontometria.

Grupo I: Leite Integral Bovino;

Grupo II: Leite de Soja;

Grupo III: Água de Coco com pH ajustado por trietanolamina

Grupo IV: Controle Positivo, os dentes foram irrigados com soro fisiológico 0.9% e reimplantados imediatamente (Cloreto de Sódio 0.9%, Drogasil S.A, Uberlândia, MG, Brasil) (Figura 5).

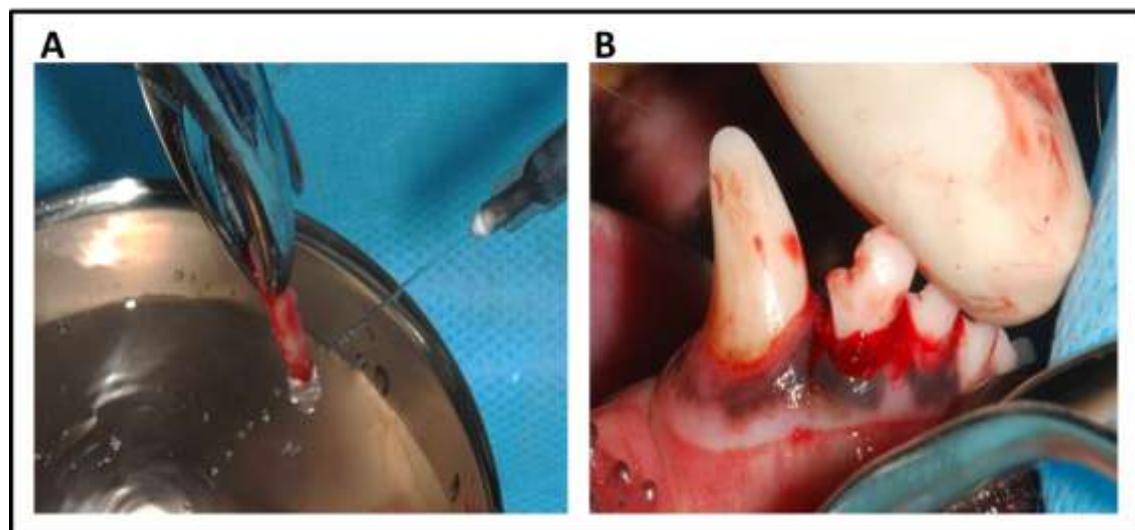


Figura 5. A) Dente irrigado com soro fisiológico. B) Reimplante dental.

Após estes procedimentos, os dentes foram reimplantados em seus alvéolos por meio de pressão digital suave verificando que o correto posicionamento dos mesmos no interior dos alvéolos. Os dentes foram então fixados aos dentes vizinhos por meio de fixação semirrígida. A contenção foi realizada envolvendo todo o seguimento anterior (canino direito – canino esquerdo do arco superior e inferior. Foi realizado condicionamento ácido do esmalte empregando ácido fosfórico a 37% em gel (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) durante 30 segundos, remoção com soro fisiológico estéril (Sanobiol, São Paulo, SP, Brasil), aplicação de sistema adesivo de frasco único, Single Bond 2 Plus (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) em duas camadas seguido da polimerização por 20 segundos em cada dente empregando fonte de luz LED de alta intensidade (RadieCAL, SDI, Melbourne, Australia). Incremento de resina composta híbrida, Filtek Z250 (3M ESPE, St. Paul, MN, USA) foi inserida na face vestibular de todos os dentes e em seguida uma linha de poliamida de diâmetro 1mm (Dourado, São Paulo, SP, Brasil) foi estabilizada sobre todos os dentes e fotoativado por 40 segundos (Figura 6). Foi analisado a oclusão dos dentes superiores e inferiores para que não houvesse interferência no fechamento e movimentos de lateralidade. Cuidado adicional foi dispensado na avaliação do espaço entre a contenção e o periodonto para que não favorecesse o acúmulo de placa.

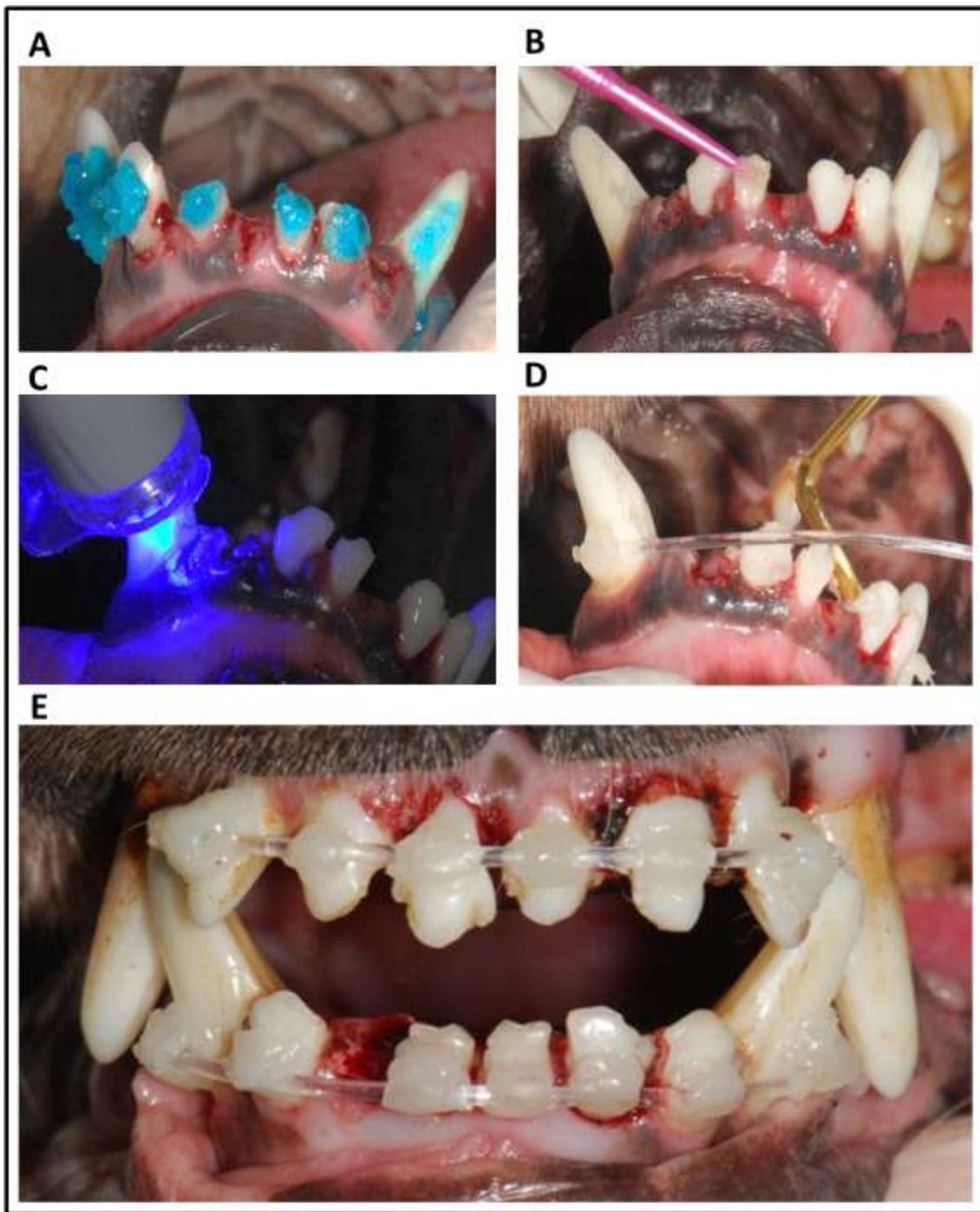


Figura 6. Confecção da contenção semirrígida. A) Condicionamento ácido. B) Aplicação de sistema adesivo. C) Polimerização do adesivo. D) Incremento de resina composta híbrida. E) Contenção semirrígida finalizada arco superior e inferior.

Todos os animais receberam dose única 3.000.000 UI de penicilina G procaína e 100.000 UI de penicilina G sódica (Fort Dodge Animal Health

Ltda, Campinas, SP, Brasil), via intramuscular. Os animais foram mantidos em cuidado permanente de veterinário responsável em ambiente específico, mantendo atividades normais com dieta pastosa.

Decorridos 15 dias do reimplante, os animais foram novamente anestesiados, a fixação semirrígida removida com broca diamantada nº 2200 (KG Sorensen) e turbina de alta rotação (Kavo, Joinville, SC, Brasil), foi avaliado o grau de mobilidade de todos os dentes reimplantados. Com uso de um raio-X portátil (DIOX, Inter-Kor Inc, Seoul, Coreia do Sul), foram realizadas radiografias do arco superior e inferior para acompanhamento da condição periodontal (Figura 7)Após 4 semanas do reimplante, foram realizadas as eutanásias dos animais por aprofundamento anestésico, com aplicação de uma injeção endovenosa de MPA- Acepromazina (0,2mg/kg) (Fort Dodge Animal Health Ltda), após um período de 15 minutos, administrado Tiopental sódico 10mg/kg (Thiopentax; Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), e em seguida Cloreto de potássio 19,1% (1ml/kg) (Fort Dodge Animal Health Ltda), por via endovenosa. Após constatação da morte os animais foram liberados pelo médico veterinário para retirada das peças anatômicas.

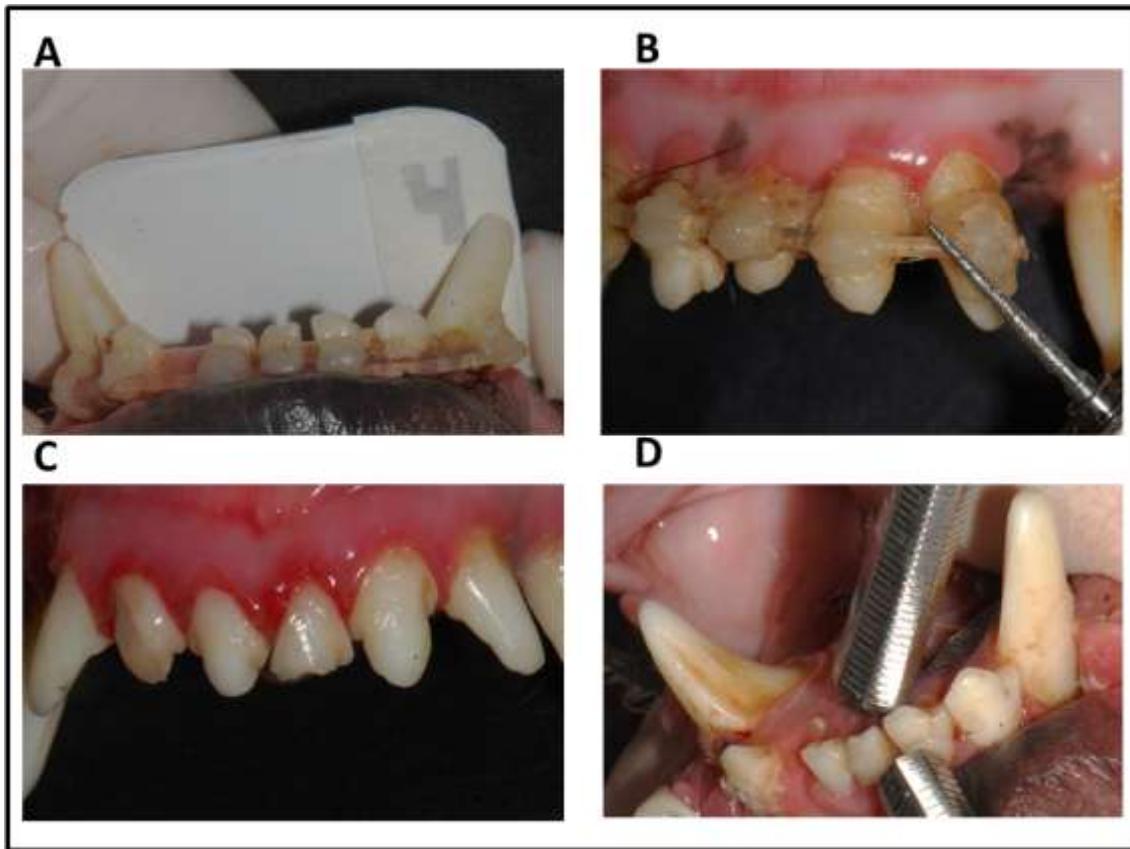


Figura 7. Acompanhamento radiográfico. B) Remoção da contenção semirrígida. C) Contenção removida. D) Avaliação do grau de mobilidade.

As peças anatômicas que envolviam o segmento anterior da maxila e da mandíbula foram retiradas e separadas por regiões e devidamente identificadas, região superior e inferior, lado esquerdo e direito empregando serra de fita elétrica (Rioby Limited C.O., Hiroshima-ken, Japão). Em seguida as peças anatômicas foram fixadas em solução formalina a 10% durante 48 horas, em temperatura ambiente (Figura 8). Após este período os espécimes foram mantidos em solução tampão, PBS.

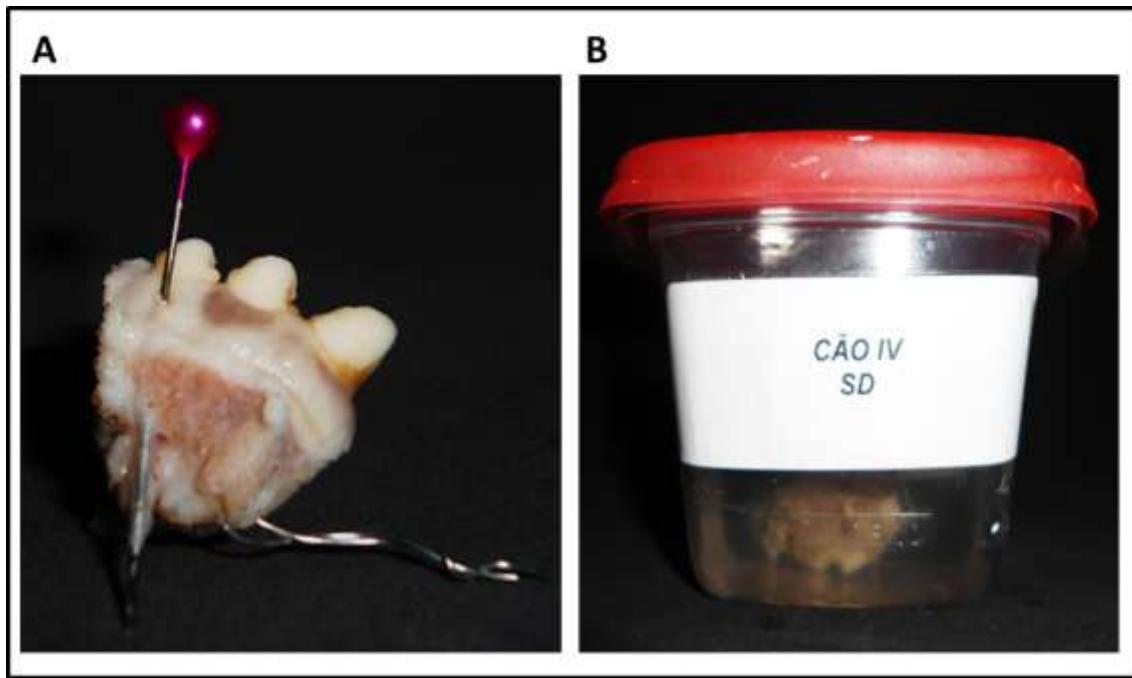


Figura 8. A) Peça anatômica removida e dente reimplantado identificado. B) Bloco mantido em solução formalina a 10% para fixação.

4.3. Análise por μ CT

Foram selecionados 3 espécimes por grupo, e montados em dispositivo específico para estabilização da amostra facilitando o posicionamento individualmente no interior do microtomógrafo computadorizado (SkyScan 1174v.2; SkyScan N.V., Kontich, Belgium) com resolução isotrópica de 22.6 μ m. As imagens de cada espécime foram reconstruídas com uso de software (NRecon v1.6.4; SkyScan), o qual obtém cortes axiais da estrutura interna das amostras. O software Data Viewer v.1.4.4 (SkyScan) foi utilizado para avaliar o periodonto e áreas de reabsorções (Figura 9).

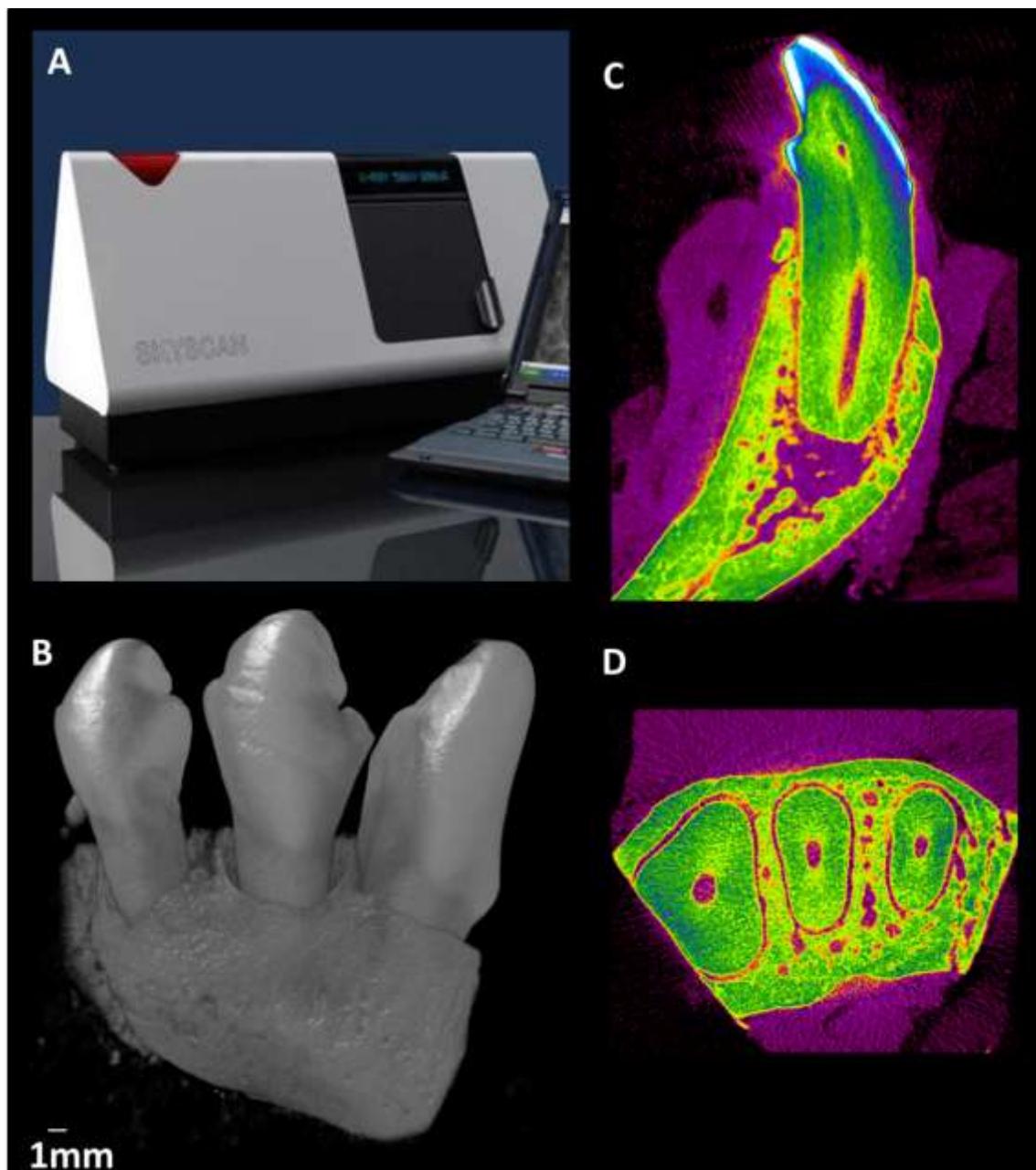


Figura 9. Análise μ CT. A) Equipamento μ CT utilizado (SkyScan 1174). B) Reconstrução volumétrica do bloco contendo osso alveolar e os dentes reimplantados. C) Imagem μ CT linear representando o bloco osso alveolar e dente. D) Cortes axiais da estrutura interna das amostras. Escala bar = 1 mm.

4.4. Análise Histonormorfométrica

Após a análise por μ CT os blocos foram descalcificados em ácido fórmico a 10% (Neon, Ipiranga, São Paulo), seccionados em três terços (cervical, médio e apical) com uso de navalha, diafanizados por meio de álcool em diversas concentrações (Allkimia, Campinas, São Paulo) e xanol (Allkimia, Campinas, São Paulo), e incluídos em parafina (Allkplast, Campinas, São Paulo). Foram realizados cortes transversais semi-seriados com intervalo de 50 μ m entre estes, espessura de 5 μ m com uso de micrótomo automatizado (Leica RM 2145, Pennsylvania, EUA) e corados por hematoxilina e eosina para análise histológica (Figura 10).

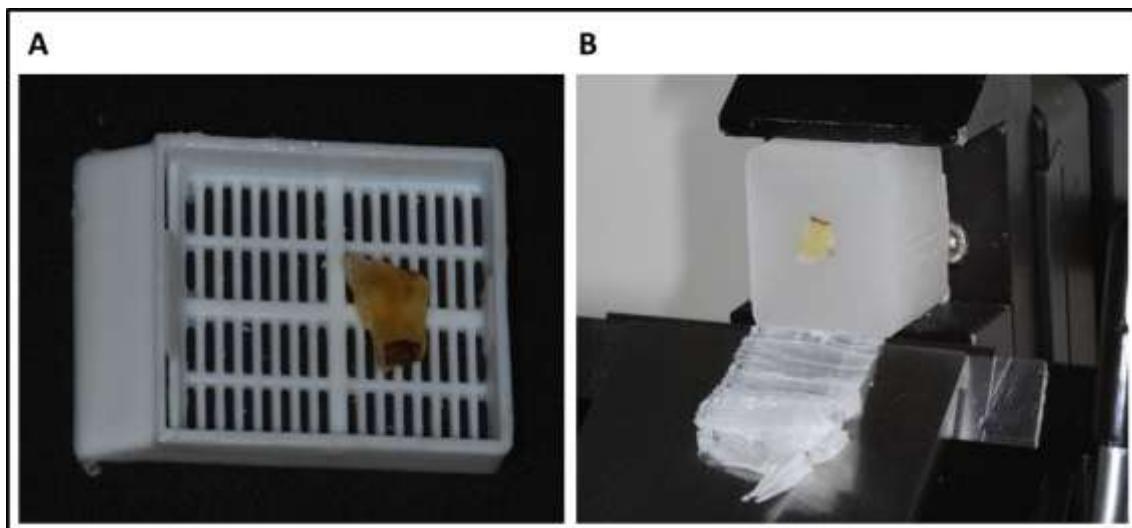


Figura 10. A) Espécime seccionado em terços e preparado para iniciar o processamento histológico. B) Realização dos cortes semi-seriados em micrótomo automatizado (Leica RM 2145).

Para a análise histomorfométrica foram selecionados cinco cortes de cada segmento de raiz, sendo 15 cortes por dente de cada grupo experimental. As imagens foram capturadas com aumento de 4X, usando câmera digital (DXM-1200, Nikon, Tokyo, Japão) acoplada ao microscópio óptico (Eclipse E200, Tokyo, Japão). As imagens de todo o perímetro das raízes foram utilizadas para medição (μ m) dos eventos de reparo presentes, empregando

software Motic Images Advanced versão 3.2 (Moticam Pro 252B, Tokyo, Japão) (Figura 11).

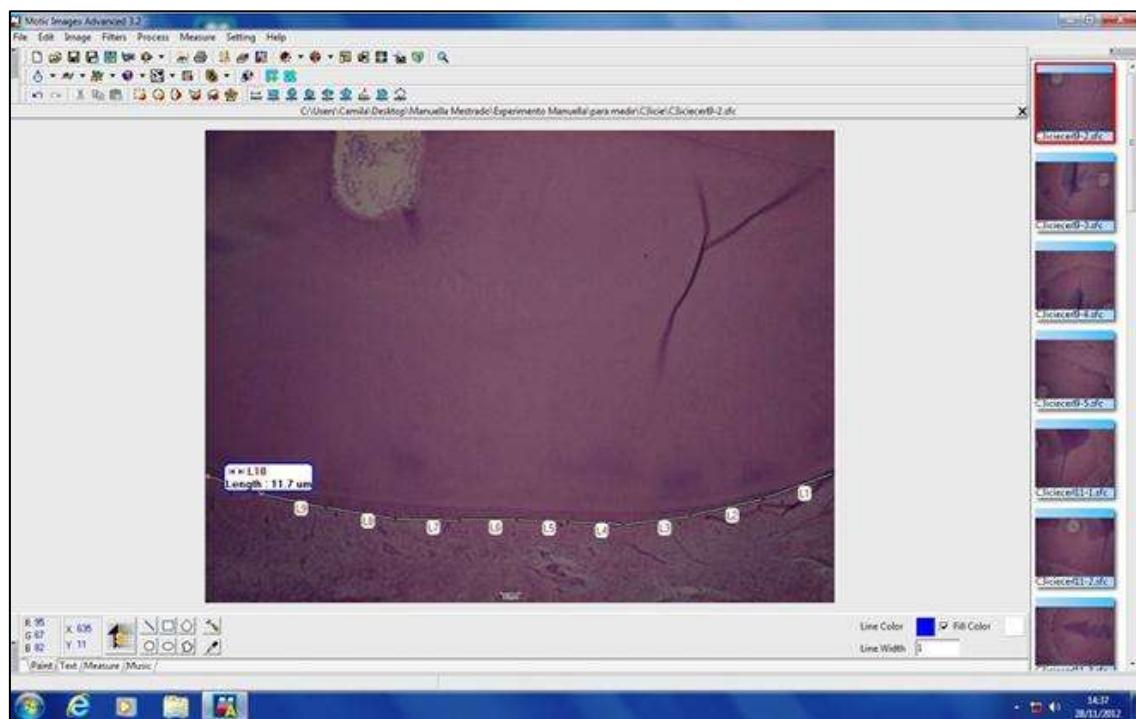


Figura 11. Mensuração em μm do perímetro radicular empregando software Motic Images Advanced versão 3.2.

O total de 3.683 imagens de todos os grupos foram analisadas. As áreas foram avaliadas de acordo com as características observadas: periodonto normal, área reabsorvida reparada, reabsorção inflamatória, anquilose, reabsorção por substituição, e reabsorção superficial (adaptado de Saito et al. 2010 e Andreasen, 1980) (Figura12).

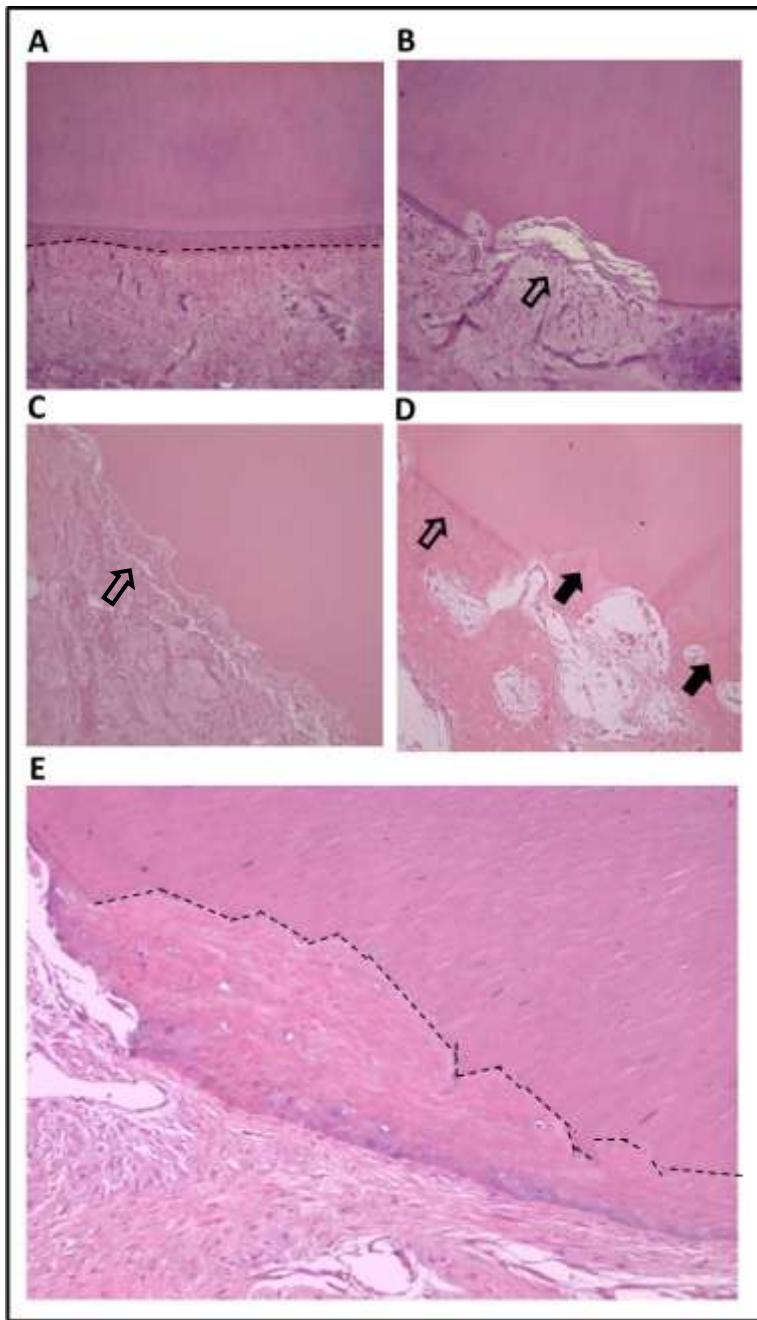


Figura 12. A) Periodonto normal – PDL com fibras colágenas organizadas e camada de cemento (linha). B) Reabsorção superficial com áreas de cavidades (seta). C) Área de reabsorção radicular inflamatória com destruição de dentina radicular (seta). D) Tecido ósseo ocupado por área de dentina reabsorvida (seta), caracterizando reabsorção por substituição. Área de anquilose pode ser observada (seta vazia). E) Presença de tecido reparado (linha) e fibras do PDL reorganizadas (aumento com objetiva 10X).

A área total e a área de cada evento foram avaliadas por raiz e foram mensuradas em micrometros e valores absolutos foram convertidos em porcentagem para análise estatística. SPSS Statistics (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) foi usado para a análise estatística. Todos os dados são apresentados como valor da média \pm DP (desvio padrão). Os dados não apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância e portanto foi empregado análise não paramétrica por meio dos testes Teste Kruskal-Wallis e Teste Dunn ($\alpha = 0.05$), O Teste Mann-Whitney U foi usado para definir a diferença estatística para cada condição do periodonto entre cada grupo comparado com o grupo controle.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Etapa 1 - Estudo *in vitro*

As médias e o desvio padrão do número de células viáveis para as 5 diferentes soluções experimentais e os 2 períodos analisados estão na Tabela 1. No período inicial, o leite desnatado resultou em porcentagem significante menor de células viáveis que os grupos leite de soja e água de coco. Não houve diferença significante entre leite integral, água de coco, HBSS e leite de soja. No período de 24h, o leite de soja resultou em porcentagem significativamente superior de células viáveis que HBSS, leite desnatado e leite integral. A água de coco demonstrou desempenho similar ao leite integral, e ambas soluções resultaram em porcentagens significativamente superior de células viáveis que o leite desnatado e HBSS. Em relação ao período avaliado, o leite de soja e água de coco não foram influenciados pelo tempo de armazenagem, contudo, os dentes armazenados em HBSS, leite integral e leite desnatado exibiram significantemente menor número de células viáveis após 24h (Tabela1).

Tabela 1. Média e desvio padrão (SD) em porcentagem de células viáveis e os dados estatísticos foram determinados pelo Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Grupos	Média (SD)	
	Inicial	24 horas
LS – Leite de Soja	80,5 (8,8) ^{Aa}	78,7 (5,6) ^{Aa}
AC – Água de Coco com pH ajustado	79,8 (6,4) ^{Aa}	74,5 (6,2) ^{ABa}
HBSS – Solução Balanceada de Hank's	78,9 (6,4) ^{ABa}	39,9 (8,3) ^{Cb}
LI – Leite Integral	76,6 (5,4) ^{ABa}	64,8 (11,3) ^{Bb}
LD – Leite Desnatado	68,1 (6,0) ^{Ba}	40,8 (15,0) ^{Cb}

Diferentes letras indicam diferença estatística significante ($P < 0,05$) verificada por ANOVA two-way e Teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas representam comparação entre os tipos de meios de armazenagem (análise

na direção vertical), e letras minúsculas representam comparação entre os períodos de armazenagem (análise na direção horizontal).

O teste ANOVA em fator único demostrou diferença significativa entre os grupos experimentais e controles para o período inicial (Tabela 2). O Teste de Dunnett demostrou que para o período inicial, o grupo controle positivo teve número de células viáveis显著mente superior aos grupos controle negativo e leite desnatado.

Tabela 2. Média e desvio padrão (SD) em porcentagem de células viáveis para o controle e grupos experimentais no período inicial, com o valor de *P* calculado pelo Teste Dunnett.

Grupos	Médias (SD)	Valor de <i>P</i>	
		Controle	Controle
		Positivo	Negativo
CP- Controle Positivo	83,1 (11,6)	-	0,005*
CN – Controle Negativo	71,5 (12,8)	0,005*	-
LI – Leite Integral	76,6 (5,4)	0,826	0,128
LD – Leite Desnatado	68,1 (6,0)	0,001*	0,824
LS – Leite de Soja	80,5 (8,8)	0,924	0,085
AC – Água de coco com pH ajustado	79,8 (6,4)	0,663	0,204
HBSS – Solução Balanceada de Hank's	78,9 (6,4)	0,269	0,537

* indica diferença estatística significante entre os grupos experimentais e os grupos controle.

O teste ANOVA em fator único demostrou que houve diferença estatística significante entre os grupos experimentais e controle também no período de 24h (Tabela 3). O leite de soja e água de coco resultaram em viabilidade celular similar ao grupo controle positivo. No período 24h, os grupos de leite desnatado, leite integral, HBSS e controle negativo demonstraram

níveis de viabilidade celular significativamente inferior que o grupo controle positivo. Nesse mesmo período o controle negativo não apresentou células viáveis.

Tabela 3. Média e desvio padrão (SD) em porcentagem de células viáveis para o controle e grupos experimentais no período 24 horas, com o valor de *P* calculado pelo Teste Dunnett.

Grupos	Médias (SD)	Valor de <i>P</i>	Valor de <i>P</i>	
			Controle	
			Controle	Negativo
			Positivo	
CP- Controle Positivo	83,1 (11,6)	-	< 0,001*	
CN – Controle Negativo	0,0 (0,0)	< 0,001*	-	
LI – Leite Integral	64,8 (11,3)	0,002*	< 0,001*	
LD – Leite Desnatado	40,8 (15,0)	< 0,001*	< 0,001*	
LS – Leite de Soja	78,7 (5,6)	0,823	< 0,001*	
AC – Água de coco com pH ajustado	74,5 (6,2)	0,270	< 0,001*	
HBSS – Solução Balanceada de Hank's	39,9 (8,3)	< 0,001*	< 0,001*	

* indica diferença estatística significante entre os grupos experimentais e os grupos controle.

5.2. Estudo *in vivo*

Os valores de percentual de ocorrência de cada um dos eventos de reparo analisados para o grupo controle e os 3 grupos experimentais estão demonstrados nas Figuras 13 a 18. O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que o fator em estudo condição do periodonto foi significantemente diferente entre os grupos ($p < 0,001$). O teste de Dunn's demonstrou que a condição periodontal normal do periodonto foi significantemente a mais prevalente entre

os eventos de reparo analisados ($p < 0.001$) independente do grupo. A reabsorção superficial foi significantemente mais prevalente que as demais condições de periodonto reparado ($p < 0.001$), independente do grupo analisado. O nível de anquilose foi estatisticamente superior para o leite de soja que para o grupo controle ($p = 0.034$). Todas as soluções de armazenagem apresentaram condições periodontais similares compradas com o grupo controle ($p = 0.763$).

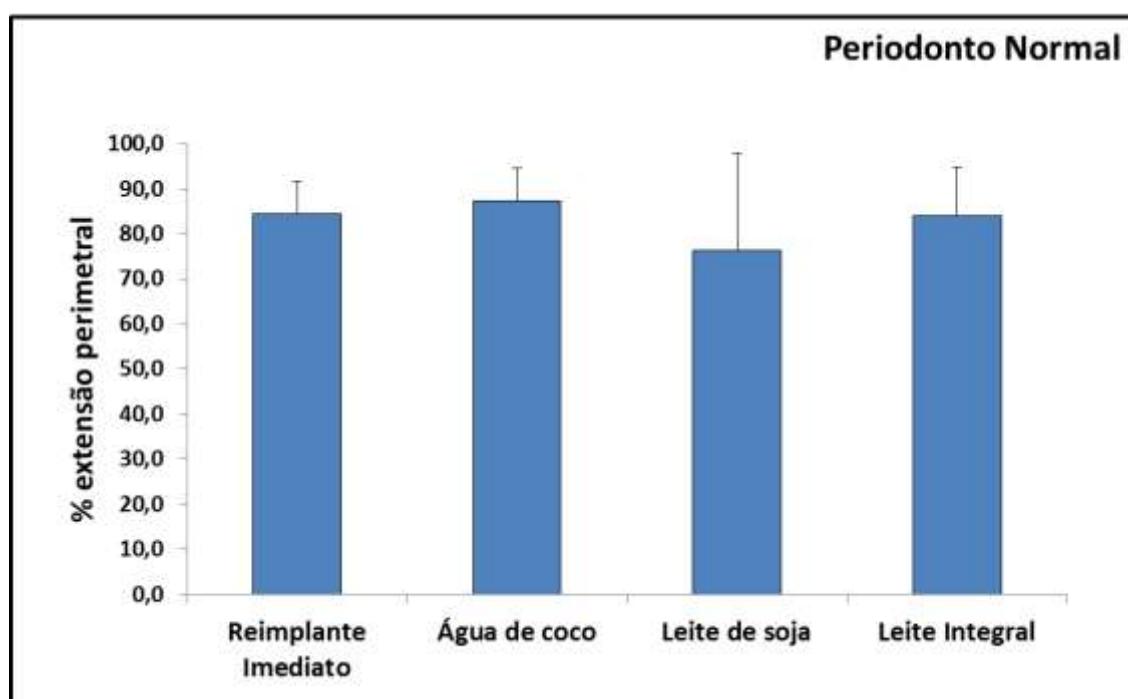


Figura 13. Análise Histológica de todos os grupos experimentais para a condição periodonto normal ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). Erro de barras representa desvio padrão.

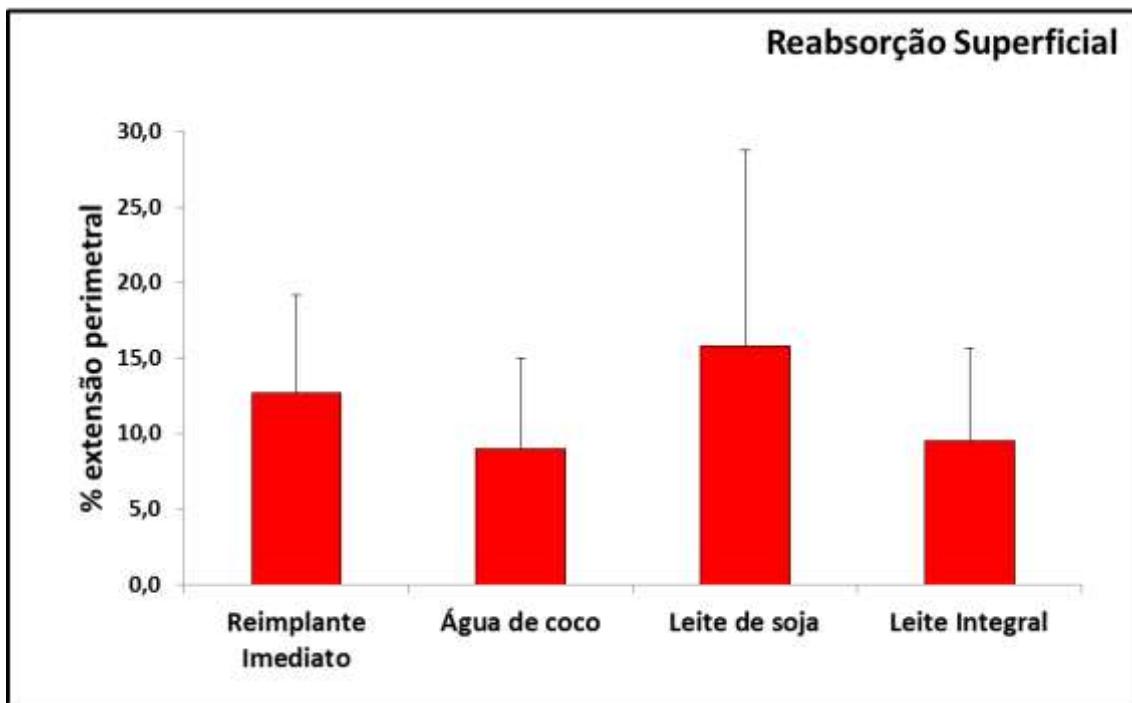


Figura 14. Análise Histológica de todos os grupos experimentais para a condição reabsorção superficial ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). Erro de barras representa desvio padrão.

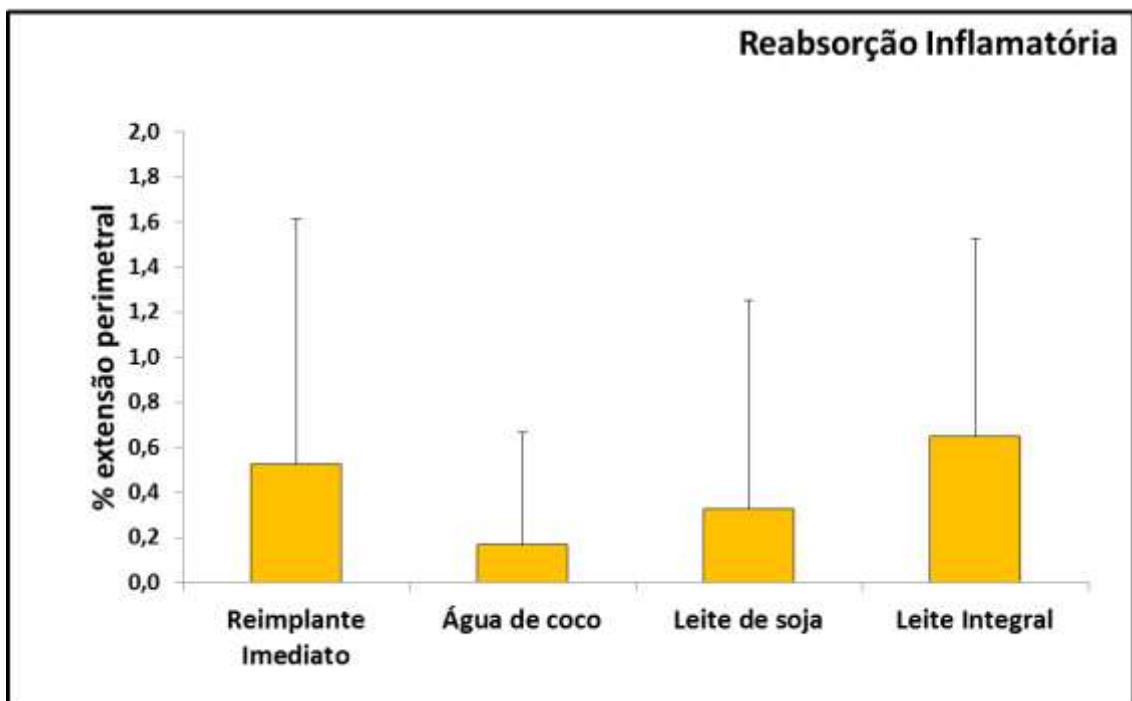


Figura 15. Análise Histológica de todos os grupos experimentais para a condição reabsorção inflamatória ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). Erro de barras representa desvio padrão.

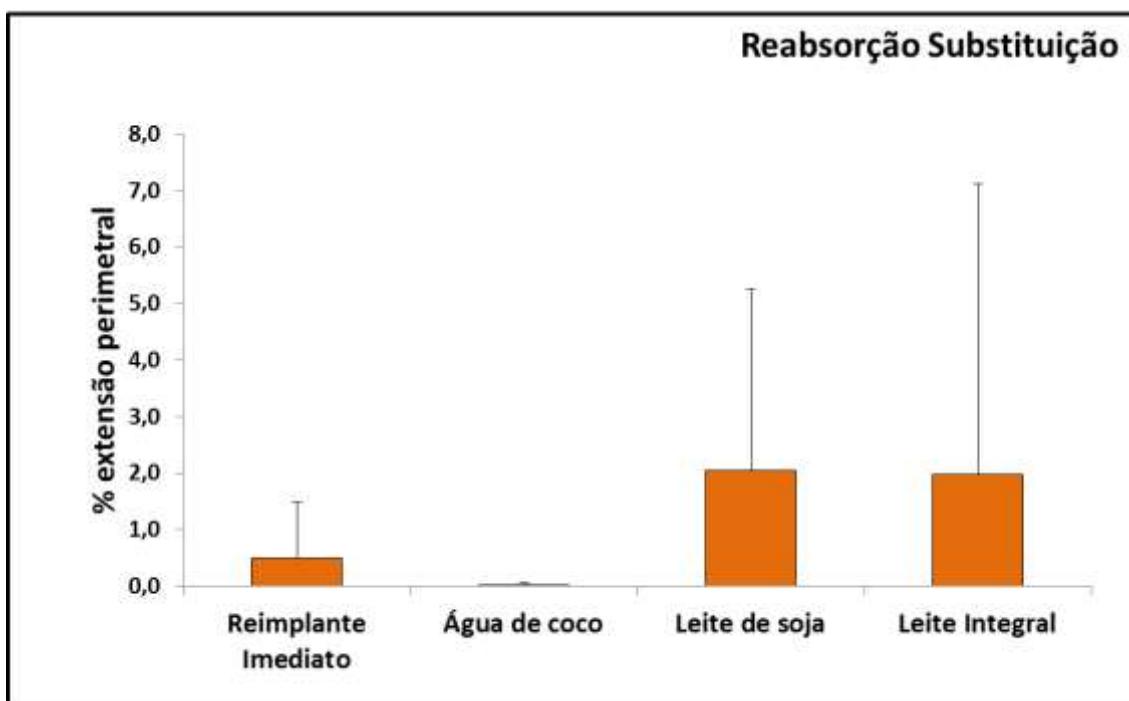


Figura 16. Análise Histológica de todos os grupos experimentais para a condição reabsorção por substituição ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). Erro de barras representa desvio padrão.

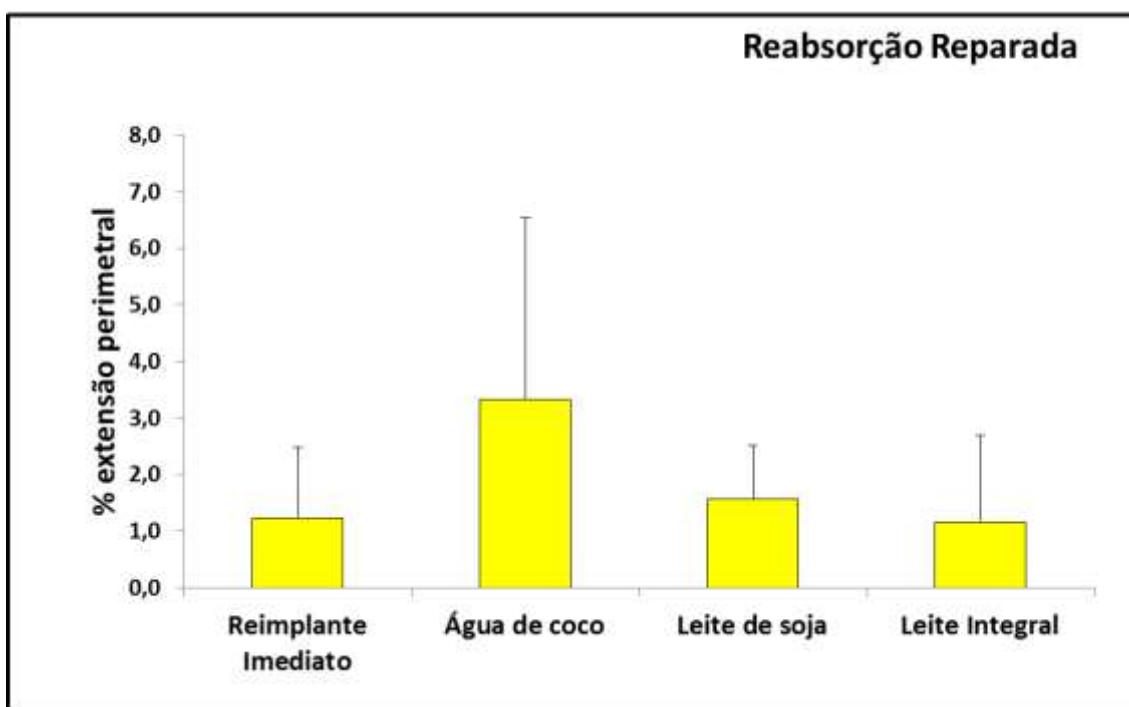


Figura 17. Análise Histológica de todos os grupos experimentais para a condição reabsorção reparada ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). Erro de barras representa desvio padrão.

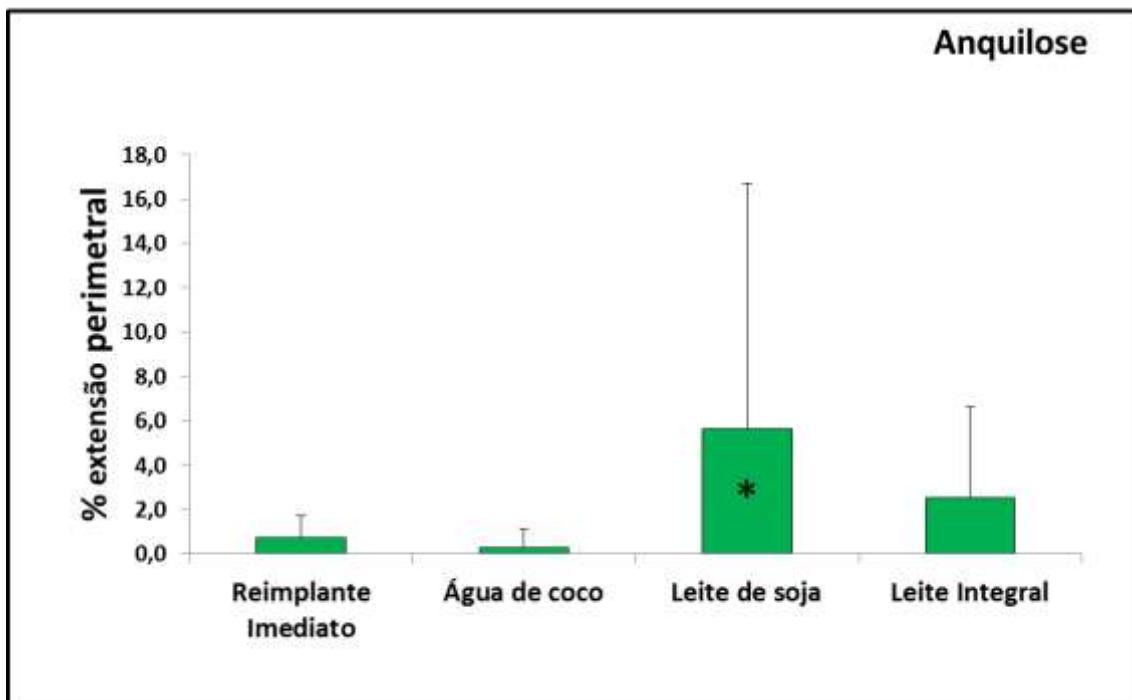


Figura 18. Análise Histológica de todos os grupos experimentais para a condição anquilose. * demonstra que o grupo leite de soja apresentou estatisticamente nível superior de anquilose em relação ao grupos reimplanto imediato ($P = 0.034$; Teste de Dunn's). Erro de barras representa desvio padrão.

A análise por μ CT demonstrou que o periodonto normal foi a condição periodontal mais prevalente para todos os grupos (Figura 19). O leite de soja apresentou mais áreas de anquilose do que os demais grupos. A condição reabsorção verificado por μ CT não é possível ser classificada em diferentes tipos como da forma como foi realizado na análise histomorfométrica.

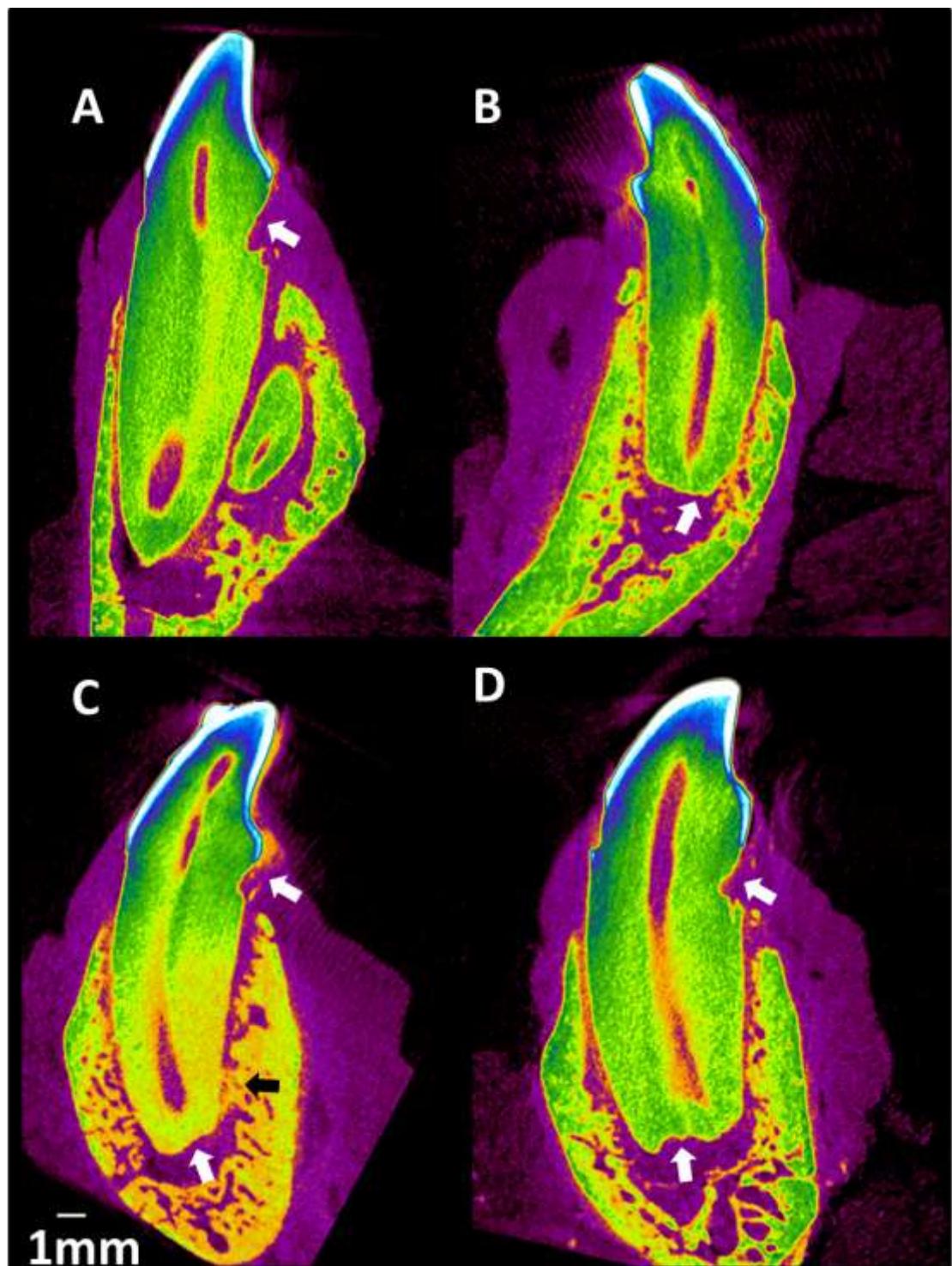


Figura 19. Análise µCT. A) Imagens de µCT linear representando o bloco ósseo alveolar e dente do grupo RI. B) Imagens de µCT linear representando o grupo LS. C) Imagens de µCT linear representando o grupo AC. D) Imagens de µCT linear representando o grupo LI. Setas brancas demonstram presença de reabsorção e setas pretas demonstram presença de anquilose. Escala bar = 1 mm.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Considerando o estudo *in vitro* a água de coco e leite de soja tiveram desempenhos similares no período inicial e resultou em nível de viabilidade celular no período de 24h significativamente superior ao leite desnatado, leite integral, e HBSS. A água de coco e leite de soja resultaram em viabilidade celular similar ao nível obtido pelo controle positivo. Os resultados obtidos no estudo *in vivo*, a água de coco e o leite de soja obtiveram desempenho similar ao leite integral. No entanto, o leite de soja teve significantemente mais anquilose do que o dente reimplantado imediatamente (grupo controle).

No estudo *in vitro*, o uso de dentes extraídos para simular casos de avulsão tem sido recomendado em outros estudos prévios (Gopikrishna et al. 2008ab; Moazami et al. 2012). Buscando representar melhor este procedimento, nos quais os dentes normalmente permanecem secos e em seguida são armazenados em algum meio, no presente estudo *in vitro* os dentes foram mantidos secos durante 30 minutos (Huang et al. 1996; Chamorro et al. 2008). Os períodos de armazenagem estabelecidos no delineamento experimental da etapa 1 deste estudo (50 minutos e 24 horas) representam as duas situações extremas que pode ocorrer, o armazenamento a curto e em longo prazo.

Para este estudo foram usados cães como modelo experimental, devido a melhor representatividade aos humanos em relação ao processo de reparo (Sottovia et al. 2010; Boer et al. 2008; Azevedo et al. 2007). Contenção semirrígida foi usada na etapa 2 deste estudo por um curto tempo (15 dias), tempo este que não interfere negativamente no reparo dos dentes reimplantados (Sottovia et al. 2010). Apesar de alguns estudos realizarem o tratamento endondôntico previamente ao reimplante, no presente estudo esse tratamento não foi realizado. Foi observado baixo nível de reabsorção radicular por inflamação entre os grupos, suportando que o tratamento endodôntico pode ser adiado sem prejudicar o processo de reparo no periodonto (Azevedo et al. 2007). A associação do histológico e μ CT usado neste estudo demonstrou ser altamente vantajoso para ilustrar a extensão de reabsorção e anquilose sem

causar nenhum dano aos espécimes. Entretanto esta metodologia não é capaz de clarificar o tipo de reabsorção observada em cada região. Por outro lado, a análise histológica foi suficiente para identificar o tipo de reabsorção em cada corte do dente, entretanto é difícil ter a análise integral do elemento dental por inteiro.

Considerando que o tratamento ideal para dente avulsionado é o reimplante imediato, o meio de armazenagem apropriado deve ter desempenho similar a este tratamento. No estudo *in vitro*, este requisito foi analisado no período inicial avaliado, onde todos os meios de armazenagem apresentaram habilidade similar em manter a viabilidade das células. Esta similaridade pode ser atribuída ao uso das próprias células no sistema homeostático para manter a fisiologia normal (Blömlöf & Ostteko, 1980). Durante este período, os nutrientes presentes no meio de armazenagem não foram consumidos para a manutenção da viabilidade celular. Após 2 h em condições extra orais, as células consomem seus próprios metabólitos armazenados, requerendo uma fonte de nutrientes adicional para preservar sua viabilidade (Andreasen, 1981).

No estudo *in vivo* este requisito de similaridade ao reimplante imediato também foi observado entre os grupos, o qual confirma a habilidade do leite integral em preservar a viabilidade das células PDL, como demonstrado *in vitro* para o mesmo período avaliado. Água de coco com pH ajustado, testado neste estudo, resultou em desempenho similar ao leite integral em periodonto reparado, este último considerado como padrão ouro pela literatura. Entretanto, é importante notar a variabilidade dos resultados observados para água de coco foi menor do que no leite integral. Os valores nutricionais da água de coco são fatores importantes que permitem o crescimento celular e sua viabilidade, como demonstrado no presente estudo *in vitro* durante o período de 24h avaliado. Porém, estudos *in vitro* apresentam resultados contraditórios da efetividade desta solução como meio de armazenagem (Gopikrishna et al., 2008ab; Moreira-Neto et al., 2009; Souza et al., 2011) que podem estar relacionados com o ajustamento prévio do pH. Água de coco tem um pH ácido, o qual é deletério para o metabolismo celular (Moreira-Neto et al. 2009), no

presente estudo o pH da água de coco foi ajustado para 7.0 com trietanolamina, a qual demonstra inibir inflamação (Ramsay et al. 1990), outro possível fator que pode explicar a performance da água de coco.

No estudo *in vitro* os meios de armazenagem tradicionais avaliados não foram capazes de manter o nível inicial de viabilidade celular durante 24h. Apesar das recomendações clínicas para o uso de HBSS como meio de armazenagem para dentes avulsionados (Trope, 2011; Andersson et al. 2012), não há um consenso quanto à sua capacidade de preservar a viabilidade celular a longo prazo (Blömlöf & Osttekkog, 1980; Souza et al. 2010; Souza et al. 2011). No presente estudo *in vitro*, a redução da viabilidade ao longo do tempo pode ser devido a alterações de seus componentes que não nutrem as células a partir de 6h (Souza et al. 2010). Este aspecto foi também observado nos grupos leite integral e leite desnatado, os quais alteram o nível de desempenho apresentado inicialmente. Postula-se que o pH do leite decresce ao longo do tempo, criando ambiente inadequado para a sobrevivência das células (Blömlöf & Osttekkog, 1980).

Os resultados obtidos no estudo *in vivo* do grupo leite de soja são contraditórios ao presente estudo *in vitro* e em outros estudos recentes que utilizam células PDL e fibroblastos (Moazami et al. 2012; Silva et al., 2012). No estudo *in vitro* o leite de soja mostrou resultados promissores e similares à água de coco em longo prazo. No estudo *in vivo* leite de soja demonstrou nível similar de periodonto normal aos demais grupos analisados, entretanto este grupo resultou em um nível significantemente superior de anquilose comparado ao grupo reimplantado imediatamente. Este aspecto confirma a importância de estudos *in vivo* para validar resultados *in vitro*, considerando que alguns fatores estão envolvidos como o manuseio do dente e a presença de vários tipos celulares (Sottovia et al. 2010).

O presente estudo demonstrou que a associação de análise histológica e por µCT para estudo *in vivo* é um método promissor para identificar melhor os tipos de reabsorções e áreas reparadas, bem como avaliar a extensão total do periodonto.

Na avaliação *in vivo* ficou evidenciado que água de coco e leite de soja tiveram desempenho similares ao leite integral como meio de armazenagem em relação à resposta periodontal após o reimplante. Entretanto a água de coco demonstrou menor variabilidade da condição periodontal comparado ao leite de soja. Este fator sugere que maior homogeneidade de desempenho da água de coco que não é tão influenciada por fatores específicos do indivíduo como demonstrado pelo leite de soja. Frente a todos estes parâmetros analisados neste estudo sequencial pode-se inferir que dentre as soluções testadas a água de coco demonstrou ser a solução de eleição para continuidade de estudos que objetivem o desenvolvimento de produto específico a ser distribuído nos ambientes de prevalência do trauma dental e na rede pública de saúde para viabilizar melhor armazenagem de dentes avulsionados.

Conclusão

7. CONCLUSÕES

De acordo com as metodologias utilizadas neste estudo pode-se concluir que:

*Etapa 1 - Estudo *in vitro**

- No período inicial (50 minutos) o leite desnatado apresentou o pior desempenho na manutenção da viabilidade celular.
- No período de 24 horas a água de coco com pH ajustado e o leite de soja mostraram superior desempenho na manutenção da viabilidade celular que leite integral bovino e HBSS.

*Etapa 2 - Estudo *in vivo**

- O leite de soja resultou em maior nível de anquilose que o grupo de reimplante imediato;
- A água de coco com pH ajustado apresentou níveis de mensuração de periodonto normal similar ao leite integral e reimplante imediato e menor variabilidade de resultados que as demais soluções testadas demonstrando ser um meio alternativo superior de armazenagem para dentes avulsionados até o momento do reimplante.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Alacam T, Gorgul G, Omurlu H, Can M. Lactate dehydrogenase activity in periodontal ligament cells stored in different transport media. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1996; 82:321-3.
2. Andersson L, Friskopp J, Blomlof L. Fiberglass splinting of traumatized teeth. **ASDC J Dent Child.** 1983 Jan-Feb; 50(1): 21-4.
3. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. **Dent Traumatol.** 2012 Apr;28(2):88-96.
4. Andreasen JO. Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. **Scand J Dent Res.** 1970;78: 329-342.
5. Andreasen JO. A Time-related Study of Periodontal Healing and Root Resorption Activity after Replantation of Mature Permanent Incisors in Monkeys. **Swed Dent J.** 4:101-110, 1980.
6. Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. **Int J Oral Surg.** 1981 Feb;10(1):43-53.
7. Andreasen JO, Kristerson L. The effect of extra-alveolar root filling with calcium hydroxide on periodontal healing after replantation of permanent incisors in monkeys. **J Endod.** 1981 Aug;7(8):349-54.
8. Andreasen JO. Challenges in clinical dental traumatology. **Endod Dent Traumatol.** 1985;1: 45-55.
9. Andreasen JO. Review of root resorption and the homeostatic mechanisms of the periodontal ligament. In: Davidovitch ed. The Biologic Mechanisms of Tooth Eruption and Resorption. Birmingham, Alabama: EB-SCOP Media, 1989.
10. Andreasen JO. **Atlas de reimplante e transplante de dentes.** 1^a ed. Editora Panamericana 2004; 40-125.
11. Andrigotti-Fröhner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CR, Simões CM. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein

- produced by *Chromobacterium violaceum*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2003 Sep;98(6):843-8.
12. Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. **Endod Dent Traumatol**. 1999;15:149–56.
 13. Ashkenazi M, Sarnat H, Keila S. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in six different media. **Endod Dent Traumatol**. 1999 Aug;15(4):149-56.
 14. Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacity of periodontal ligament cells after storage in four media at room temperature. **Endod Dent Traumatol**. 2000;16:63–70.
 15. Ashkenazi M, Marouni M, Sarnat H. In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacities of periodontal ligament fibroblasts after storage in four media supplemented with growth factors. **Dent Traumatol**. 2001 Feb;17(1):27-35.
 16. Azevedo PC, Moura CC, Zanetta-Barbosa D, Bernadineli N. Time of endodontic treatment in autogenic transplants of mature teeth: histological study in dogs. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2007;104:287-93.
 17. Barrett EJ, Kenny DJ. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. **Endod Dent Traumatol**. 1997 Aug;13(4):153-63.
 18. Blomlöf L, Otteskog P. Viability of human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. **Scand J Dent Res**. 1980;88:436-40.
 19. Blomlöf, L. Storage of human periodontal ligament cells in combination of different media. **J Dent Res**. 1981; 60(11): 1904-1906.
 20. Blomlöf L, Lindskog S, Hammarström L. Periodontal healing of exarticulated monkey teeth stored in milk or saliva. **Scand J Dent Res**. 1981 Jun;89(3):251-9.
 21. Boer [FA](#), [Percinoto C](#), [Ferelle A](#), [Cunha RF](#). Immediate reimplantation of primary teeth: a histological study in dogs. **Dent Traumatol**. 2008;24:337-42.

22. Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RK, Moreschi E et al. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. **Dent Traumatol.** 2010 Aug;26(4):323-31.
23. Chamorro MM, Regan JD, Operman LA, Kramer PR. Effect of storage media on human periodontal ligament cell apoptosis. **Dent Traumatol.** 2008; 24:11-16.
24. Consolaro A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas.** 2^a ed. Editora Dental Press, 2012.
25. Consolaro A. **Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas.** 2^a ed. Editora Dental Press 2005; 1-53.
26. Cvek M. Endodontic treatment of traumatized teeth. In: ANDREASEN JO, ed. **Traumatic injuries of the teeth.** 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard, 1981; 321-84
27. Caglar E, Sandalli N, Kuscu OO, Durhan MA, Pisirciler R, Caliskan EA et al. Viability of fibroblasts in a novel probiotic storage media. **Dent Traumatol.** 2010 Oct;26(5):383-7.
28. de Souza BD, Bortoluzzi EA, da Silveira Teixeira C, Felippe WT, Simões CM, Felippe MC. Effect of HBSS storage time on human periodontal ligament fibroblast viability. **Dent Traumatol.** 2010 Dec;26(6):481-3.
29. Gassner R, Bösch R, Tuli T, Emshoff R. Prevalence of dental trauma in 6000 patients with facial injuries: implications for prevention. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1999;87(1):27-33.
30. aGopikrishna V, Baweja P, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2008;105:61-65.
31. bGopikrishna V, Baweja PS, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. Comparison of coconut water, propolis, HBSS, and milk on PDL cell survival. **J Endod.** 2008 May;34(5):587-9.
32. Goswami M, Chaitra T, Chaudhary S, Manuja N, Sinha A. Strategies for periodontal ligament cell viability: An overview. **J Conserv Dent.** 2011 Jul;14(3):215-20.

33. Harkacz OM Sr, Carnes DL Jr, Walker WA 3rd. Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. **J Endod.** 1997 Nov;23(11):687-90.
34. Hammarström L, Pierce A, Blomlöf L, Feiglin B, Lindskog S. Tooth avulsion and replantation--a review. **Endod Dent Traumatol.** 1986 Feb;2(1):1-8.
35. Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hanks balanced solution and Viaspan storage media. **Endod Dent Traumatol.** 1991; 7: 69-72.
36. Huang SC, Remeikis NA, Daniel JC. Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. **J Endod.** 1996; 22:30-3.
37. Hwang JY, Choi SC, Park JH, Kang SW. The use of green tea extract as a storage medium for the avulsed tooth. **J Endod.** 2011 Jul;37(7):962-7.
38. Kenny DJ, Barret EJ. Recent developments in dental traumatology. **Pediatric Dent.** 2001; 23: 464-68.
39. [Kim JS](#), [Nam MH](#), [An SS](#), [Lim CS](#), [Hur DS](#), [Chung C](#), [Chang JK](#). Comparison of the automated fluorescence microscopic viability test with the conventional and flow cytometry methods. [**J Clin Lab Anal.**](#) 2011;25(2):90-4.
40. Krasner P, Person P. Preserving avulsed teeth for replantation. **JADA** 1992; 123: 80–88.
41. Kühnisch J, Galler M, Seitz M, Stich H, Lussi A, Hickel R, Kunzelmann KH, Bücher K. Irregularities below the Enamel-Dentin Junction May Predispose for Fissure Caries. **J Dent Res.** 91(11):1066-1070, 2012.
42. Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. **J Histochem Cytochem.** 1985 Jan;33(1):77-9.
43. Lekic PC, Kenny DJ, Barrett EJ. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. **Int Endod J.** 1998;31:137–40.
44. Lin S, Zuckerman O, Fuss Z, Ashkenazi M. New emphasis in the treatment of dental trauma: avulsion and luxation. **Endod Dent Traumatol.** 2007; 23: 297-303.

45. Lindskog S, Pierce AM, Blomlof L, Hammarstrom L. The role of the necrotic periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. **Endod Dent Traumatol.** 1985 Jun;1(3):96-101.
46. Lindskog S, Blomlöf L, Hammarström L. Cellular colonization of denuded root surfaces in vivo: cell morphology in dentin resorption and cementum repair. **J Clin Periodontol.** 1987 Aug;14(7):390-5.
47. Liu JR, Chen MJ, Lin CW. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains in soymilk. **J Food Sci.** 2002;67:104-8.
48. Loe H, Waerhaug J. Experimental replantation of teeth in dogs and monkeys. **Arch Oral Biol.** 1961 Apr;3:176-84.
49. Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. **Endod Dent Traumatol.** 2006; 22:30-35.
50. Moreira-Neto JJ, Gondim JO, Raddi MS, Pansani CA. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. **Int Endod J.** 2009 Sep;42(9):827-30.
51. Marino TG, West LA, Liewehr FR, Mailhot JM, Buxton TB et al. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. **J Endod.** 2000 Dec;26(12):699-702.
52. Mariotti A, Cochran DL. Characterization of fibroblasts derived from human periodontal ligament and gingiva. **J Periodontol.** 1990 Feb;61(2):103-11.
53. Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, de Moraes IG, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. **Dent Traumatol.** 2010 Feb;26(1):80-5.
54. Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. **Dent Traumatol.** 2004 Apr;20(2):85-9.
55. Moazami F, Mirhadi H, Geramizadeh B, Sahebi S. Comparison of soymilk, powdered milk, Hank's balanced salt solution and tap water on periodontal ligament cell survival. **Dent Traumatol.** 2012 Apr;28(2):132-5.

56. Moura CCG, Soares PBF, Reis MVP, Fernandes-Neto AJ, Soares CJ. Soy milk as a storage medium to preserve human fibroblast cell viability: an *in vitro* study. **Braz Dent J.** 2012; 23(5):559-63.
57. Ng KH, Lye HS, Easa AM, Liang MT. Growth characteristics and bioactivity of probiotics in tofubased medium during storage. **Annals Microbiol.** 2008;58:477- 87.
58. Oikarinen KS, Seppa ST. Effect of preservation media on proliferation and collagen biosynthesis of periodontal ligament fibroblasts. **Endod Dent Traumatol.** 1987 Jun;3(3):95-9.
59. Ozan F, Polat ZA, Er K, Ozan U, Değer O. Effect of propolis on survival of periodontal ligament cells: new storage media for avulsed teeth. **J Endod.** 2007 May;33(5):570-3.
60. Pearson RM, Liewehr FR, West LA, Patton WR, McPherson JC 3rd, Runner RR. Human periodontal ligament cell viability in milk and milk substitutes. **J Endod.** 2003 Mar;29(3):184-6.
61. Polson AM, Caton J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. **J Periodontol.** 1982 Oct;53(10):617-25.
62. Rajendran P, Varghese NO, Varughese JM, Murugaiyan E. Evaluation, using extracted human teeth, of Ricetral as a storage medium for avulsions--an in vitro study. **Dent Traumatol.** 2011 Jun;27(3):217-20.
63. Ramsay B, Lawrence CM, Bruce JM, Shuster S. The effect of triethanolamine application on anthralin-induced inflammation and therapeutic effect in psoriasis. **J Am Acad Dermatol.** 1990; 23:73-6.
64. Scalabrini P, Rossi M, Spettoli P, Matteuzzi D. Characterization of Bifidobacterium strains for use in soymilk fermentation. **Int J Food Microbiol.** 1998;39:213–9.
65. Schwartz O, Andreasen FM, Andreasen JO. Effects of temperature, storage time and media on periodontal and pulpal healing after replantation of incisors in monkeys. **Dent Traumatol.** 2002 Aug;18(4):190-5.
66. Shaul L, Omri E, Zuckerman O, Imad Ael-N. Root surface conditioning in closed apex avulsed teeth: a clinical concept and case report. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2009 Sep;108(3):e125-8.

67. Sigalas E, Regan JD, Kramer PR, Witherspoon DE, Opperman LA. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. **Dent Traumatol.** 2004 Feb;20(1):21-8.
68. Silva EJ, Rollemburg CB, de Souza Coutinho-Filho T, Zaia AA. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of soy milk with different storage media. **Dent Traumatol.** 2012 *in press*.
69. Smee DF, Morrison AC, Barnard DL, Sidwell RW. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. **J Virol Methods** 2002;106:71-9.
70. Soares Ade J, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. Relationship between clinical-radiographic evaluation and outcome of teeth replantation. **Dent Traumatol.** 2008 Apr;24(2):183-8.
71. [Söder PO](#), [Otteskog P](#), [Andreasen JO](#), [Modéer T](#). Effect of drying on viability of periodontal membrane. **Scand J Dent Res.** 1977 Mar;85(3):164-8.
72. Somerman [MJ](#), [Archer SY](#), [Imm GR](#), [Foster RA](#). A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. **J Dent Res.** 1988 Jan;67(1):66-70.
73. Sottovia [AD](#), Sottovia Filho D, [Poi WR](#), [Panzarini SR](#), [Luize DS](#), [Sonoda CK](#). Tooth replantation after use of Euro-Collins solution or bovine milk as storage medium: a histomorphometric analysis in dogs. **J Oral Maxillofac Surg.** 2010;68:111-9.
74. [Souza BD](#), [Lückemeyer DD](#), [Reyes-Carmona JF](#), [Felippe WT](#), [Simões CM](#), [Felippe MC](#). Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconut water as storage media. **Int Endod J.** 2011;44:111-5.
75. Souza BDM, Lückemeyer DD, Felippe WT, Simões CM, Felippe MC. Effect of temperature and storage media on human periodontal ligament fibroblast viability. **Dent Traumatol.** 2010; 26:271-275.
76. Stanley HR. **Diseases of the Dental Pulp.** In: Tieck RW, ed. Oral Pathology. New York: McGraw Hill Co, 1965.

77. Stenvik A, Mjör IA. Pulp and dentine reactions to experimental tooth intrusion. A histologic study of the initial changes. **Am J Orthod.** 1970 Apr;57(4):370-85.
78. Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. **Skin Pharmacol.** 1990;3(3):157-63.
79. Tour G, Wendel M, Moll G, Tcacencu I. Bone Repair Using Periodontal Ligament Progenitor Cell-seeded Constructs. **J Dent Res.** 91(8):789-794, 2012.
80. Trope M, Friedman S. Periodontal healing of replanted dog teeth stored in Viaspan, milk and Hanks' balanced salt solution. **Endod Dent Traumatol** 1992;8, 183-8.
81. Trope M. Root resorption of dental and traumatic origin: Classification based on. etiology. **J Pract Periodont Aesthet Dent.** 1998; 10: 515–524.
82. Trope M. Root resorption due to dental trauma. **Endod Topics** 2002; 1: 79-100.
83. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. **Dent Traumatol.** 2011;27:281-94.
84. Tronstad L. Root resorption- etiology, terminology and clinical manifestations. **Endod Dent Traumatol.** 1988; 4: 241-252.
85. Wang YC, Yu RC, Chou CC. Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured milk drinks. **Food Microbiol.** 2002;19:501–8.
86. Wedenberg C, Lindskog S. Experimental internal resorption in monkey teeth. **Endod Dent Traumatol.** 1985 Dec;1(6):221-7.

Апекос

Anexo 1. Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 203/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 101/11**

Projeto Pesquisa: "Avaliação da água de coco para armazenagem de dentes
avulsionados. Estudo experimental em cães".

Pesquisador Responsável: Carlos José Soares

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com
animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO
DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE À CEUA PARA FINS DE
ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO.
O MODELO DESTE ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 14 de dezembro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU