

Viabilidade das células mononucleares de sangue periférico humano em diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados

Denise Fernanda de Melo¹, Ana Maria Sell², Carlos Marcelo Lopes¹ e Mirian Marubayashi Hidalgo^{1*}

¹Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: mmhidalgo@uem.br

RESUMO. Neste estudo comparou-se a viabilidade de células mononucleares humanas mantidas durante 24 horas, a 20°C, em diferentes meios de estocagem para dentes avulsionados: água destilada, leite pasteurizado tipo C, leite ultrapasteurizado integral, saliva, solução fisiológica e meio de cultura celular McCoy. Nos tempos 0, 30min, 1h, 3h, 6h, 10h e 24h foram coletadas amostras e analisadas pelo método de exclusão com azul de Tripán. Também foi medido o pH de cada meio de estocagem. Os testes indicaram que todos os meios tiveram melhor desempenho que a água ($p < 0,05$). A partir de 3h, os dois tipos de leite e o McCoy mostraram viabilidade estatisticamente melhor ($p < 0,05$) que a saliva e a solução fisiológica. Não houve diferença entre os leites, não sendo possível realizar a leitura de 24h devido ao depósito de material biológico. Os leites, saliva e McCoy apresentaram pH compatível com a proliferação celular. Os resultados sugerem que o meio de cultura McCoy e o leite são efetivos para estocagem de dentes avulsionados por possibilitarem a manutenção da viabilidade celular.

Palavras-chave: avulsão dentária, meios de estocagem, leite, saliva, meio de cultura McCoy, reimplante dentário.

ABSTRACT. Human peripheral blood mononuclear cells viability in different storage media for avulsed teeth. This study aims to compare the viability of the human mononuclear cells for 24 hours at 20°C in different storage media for avulsed teeth: distilled water, type C pasteurized milk, whole ultra-pasteurized milk, saliva, physiologic solution, and McCoy culture cells medium. At times 0, 30min, 1h, 3h, 6h, 10h and 24h was extracted sample and analyzed for the exclusion with Trypan blue method. The pH of each storage medium was also measured. The tests indicated that all media performed better than water ($p < 0,05$). Since 3h, both types of milk and the McCoy showed viability statistically better ($p < 0,05$) than saliva and physiologic solution. There was no difference between two types of milk and it was not possible to make the reading of 24 hours due to deposit of the biologic material. The milk, saliva, and McCoy showed pH compatible with the cell proliferation. The results suggest that McCoy culture medium and milk are effective to storage of the avulsed teeth for making possible the maintenance of the cell viability.

Key words: tooth avulsion; storage media; milk; saliva; McCoy culture medium; tooth reimplant.

Introdução

A avulsão dentária, também referida como exarticulação ou avulsão completa, é um tipo de trauma complexo que leva ao deslocamento total do dente para fora do seu alvéolo, podendo acometer múltiplos tecidos, como o ligamento periodontal, osso alveolar, cimento, polpa dentária e a gengiva (De Deus, 1992; Ingle e Bakland, 1994; Walton e Torabinejad, 1997). A incidência de avulsões completas está entre 1% a 16% de todos os traumatismos da dentição permanente (Marino *et al.*, 2000).

Após ter sido avulsionado, o reimplante dentário se refere à reposição do dente em seu alvéolo com o objetivo de conseguir sua reinserção (Grossman, 1976), processo complexo que depende da viabilidade de cada compartimento celular afetado, das condições do acidente de avulsão, de como foi reimplantado e de fatores específicos do paciente (Barret e Kenny, 1997). O melhor prognóstico para a manutenção da integridade do ligamento periodontal ocorre quando o reimplante é imediato, ou seja, parece estar diretamente relacionado ao

tempo extra-alveolar, ao meio de estocagem do dente durante esse período e se houve necessidade de manipulação da porção radicular (Andreasen, 1981; Lindskog *et al.*, 1983; Consolaro, 2002).

Assim, dentistas e pessoal auxiliar devem estar preparados para orientar a população que necessite de esclarecimentos urgentes nos casos de avulsão dentária. Entretanto, freqüentemente, os indivíduos não são capazes de seguir as instruções oferecidas e alguns pesquisadores têm recomendado que o paciente procure assistência odontológica imediata (Andreasen, 1981; Courts *et al.*, 1983; Raphael e Gregory, 1990; De Deus, 1992; Barret e Kenny, 1997). Propõem ainda que deve haver divulgação à comunidade em geral sobre os meios de estocagem mais adequados para os dentes avulsionados a fim de se manter a integridade e a viabilidade das células do ligamento periodontal e garantir maior probabilidade de sucesso da intervenção (Courts *et al.*, 1983; Walton e Torabinejad, 1997; Consolaro, 2002; IADT, 2003).

A complicação mais séria e comum após o reimplante de um dente avulsionado é a reabsorção radicular externa, que pode ser do tipo inflamatória ou por substituição subsequente a uma anquilose alvéolo-dentária (Barret e Kenny, 1997; Consolaro, 2002).

Meios de estocagem de dentes avulsionados comumente descritos e utilizados.

A maneira ideal de se estocar o dente é recolocá-lo no seu alvéolo (Cohen e Burns, 1994). Muitas vezes, porém, isso não é possível de se realizar imediatamente, sendo necessário recorrer a meios de estocagem para o dente avulsionado até que o mesmo seja levado ao consultório odontológico.

Na literatura são propostos vários meios de estocagem dos dentes avulsionados a fim de se manter a viabilidade celular do ligamento periodontal e proporcionar um melhor prognóstico. Dentre eles estão: a água de torneira, o leite, a saliva, a solução fisiológica, a solução fisiológica balanceada de Hanks e alguns meios de cultura de células.

A água é um meio hipotônico que causa rápida lise das células. Quando utilizada, aconselha-se acrescentar cubos de gelo. Embora seja um meio desfavorável, é ainda melhor do que deixar o dente seco (Marino *et al.*, 2000).

O leite vem sendo amplamente estudado por vários pesquisadores e tem se mostrado um líquido isotônico e relativamente livre de contaminação microbiana (Courts *et al.*, 1983). Apresenta pH aproximadamente neutro (Lindskog *et al.*, 1983) e é de fácil disponibilidade no local do acidente. Embora

não proporcione condições para que ocorra a restauração da morfologia das células, nem de sua diferenciação e mitose, o leite previne a morte celular e tem se mostrado um meio adequado para o armazenamento em períodos de até seis horas (Soares e Goldberg, 2001).

A saliva é um meio mais efetivo que a água, sua disponibilidade é óbvia, seu pH é aproximadamente neutro, mas possui um grande potencial de contaminação microbiana (Lindskog *et al.*, 1983; Marino *et al.*, 2000). Quando o dente não pode ser reimplantado no local do acidente e um meio de estocagem adequado não está disponível, ele deve ser colocado na boca do paciente, sob a língua ou no espaço entre os dentes e a bochecha. Mas, este método é somente indicado para crianças maiores ou adultos, pois há o risco de se engolir o dente durante o trajeto até a clínica odontológica (Weine, 1998).

A solução fisiológica tem sido sugerida como meio de estocagem temporário devido à sua osmolalidade¹ fisiológica (Marino *et al.*, 2000).

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) possui osmolalidade e pH ideal por ser um meio desenvolvido especialmente para cultura de células, o que minimiza os danos às células do ligamento periodontal durante a estocagem. Proporciona condições de proliferação celular de segmentos vitais do ligamento para recobrir partes desnudas da superfície radicular ou que possuam ligamento necrótico. Desabona-o sua indisponibilidade nos consultórios dentários e menos ainda no local do acidente. De forma análoga, outros meios utilizados para cultura de células e tecidos como RPMI 1.640 e McCoy podem ser utilizados para estocagem dos dentes avulsionados (Soares e Goldberg, 2001).

Com base na descrição da literatura e da importância para o prognóstico dos dentes avulsionados, o propósito deste estudo foi comparar a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano em diferentes meios de estocagem em um período de tempo entre 30 minutos e 24 horas em temperatura ambiente de 20°C.

Material e métodos

Obtenção de amostras de saliva e células mononucleares humanas

A saliva utilizada como meio de estocagem foi coletada de apenas um voluntário e centrifugada por 20min a 2.000 rpm para que estivesse livre de células e outros materiais orgânicos em suspensão. Para

¹ Osmolalidade é o número total de partículas osmoticamente ativas em uma solução e é igual à soma da molalidade (concentração da cada soluto em um kg de solvente) de todos os componentes presentes na solução.

obtenção de células mononucleares, 15 mL de sangue venoso de seis doadores foram obtidos assepticamente em tubos heparinizados (2 gotas de Liqueenine). As células foram isoladas pelo método descrito por Böyum (1968) modificado. Os tubos foram centrifugados a 1.500 rpm durante 10min à temperatura ambiente. A interface entre eritrócitos e plasma foi colhida, diluída em igual volume de tampão salina fosfato (PBS) e depositada sobre 2 mL de um gradiente descontínuo de Histopaque® (Sigma Chemical Co.) com densidade 1.076. Após centrifugação a 2.000 rpm durante 20min à temperatura ambiente, o anel de leucócitos foi removido da interface com pipeta Pasteur e transferido para outro tubo. Realizou-se então o processo de lavagem com PBS, centrifugando por 10min a 1.500 rpm, desprezando o sobrenadante e adicionando-se mais 2 mL de PBS que foi centrifugado por mais 1min a 500 rpm para eliminação das plaquetas. O precipitado celular resultante foi ressuscitado em PBS e a suspensão celular ajustada a uma concentração final de 10^7 cel/mL contadas em câmara de Neubauer.

Medida do pH dos diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados

Os meios de estocagem utilizados neste trabalho foram: água destilada, leite pasteurizado tipo C, leite ultrapasteurizado integral, saliva, solução fisiológica e meio de cultura celular McCoy. Para os dois tipos de leite, teve-se o cuidado de sempre utilizar a mesma marca comercial, facilmente encontrada. O pH de todos os meios de estocagem foi medido ao iniciar os experimentos através da utilização de pHmetro (Digimed, DM20).

Ensaio da viabilidade celular nos diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados

Cinquenta μ L da suspensão celular de mononucleares foram colocadas em cada tubo com 450 μ L dos diferentes meios testados, de modo que a concentração final fosse de 1×10^6 cels/mL. Foi calculada a viabilidade celular inicial, sendo que o método utilizado foi o de exclusão através da coloração com azul de Tripán. As células eram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, estavam incluídas com o azul de Tripán ou apresentavam degeneração em forma de balão. Foram contadas as células viáveis em relação à quantidade de células presentes nos quatro campos mais externos da câmara de Neubauer. O ensaio foi repetido três vezes para cada meio de estocagem. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente de 20°C até 24h. Nos tempos 30min, 1h, 3h, 6h, 10h e

24h foram coletadas amostras de 10 μ L da suspensão celular de todos os meios testados para nova contagem de viabilidade celular. Os experimentos foram realizados com as células mononucleares dos seis doadores voluntários. As diferenças estatísticas dos grupos experimentais foram determinadas usando-se o Teste t de Student ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Os resultados da mensuração do pH dos diferentes meios testados estão apresentados na Tabela 1. O pH dos leites pasteurizado e ultrapasteurizado e da saliva foram similares, e da solução fisiológica e da água destilada apresentaram-se um pouco mais ácido e, como já se esperava, o McCoy apresentou um pH neutro.

Tabela 1. pH dos diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados.

Meios de estocagem	pH
Água destilada	5,4
Leite pasteurizado tipo C	6,6
Leite ultrapasteurizado integral	6,6
Saliva	6,7
Solução fisiológica	5,8
Meio de cultura celular McCoy	7,3

Ao analisar a viabilidade celular nos diferentes meios de estocagem, observou-se que, particularmente com a solução fisiológica, o número total de células decrescia muito de um tempo para o outro, entretanto, a proporção do número de células mortas e células vivas naquele momento mantinha-se constante, o que poderia propiciar a falsa idéia de que a viabilidade celular se manteve a mesma. Isso não era verdadeiro, pois ocorria a lise de muitas células com conseqüente redução no número total das células mononucleares ao longo do tempo. Por essa razão, recalculamos a viabilidade celular na solução fisiológica considerando a redução no número de células nos diferentes tempos a partir do tempo inicial, como pode ser visto na Figura 1. Se comparados o comportamento celular expresso pelos dois cálculos (linhas pontilhada e cheia) percebe-se bem essa diferença e a fidedignidade do critério adotado.

A viabilidade das células mononucleares humanas mantidas nos diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados por um período de zero a 24 horas pode ser observada na Figura 2.

A água destilada foi considerada o meio mais insatisfatório, pois com apenas 30 minutos havia redução drástica no número de células viáveis e a partir de 1h a viabilidade era nula. Assim, a água foi estatisticamente pior ($p < 0,05$) que todos os demais

meios em todos os tempos. Já os dois tipos de leite e o McCoy foram estatisticamente melhores ($p < 0,05$) que a saliva e a solução fisiológica a partir do tempo 3 horas. Nesta última, após 10 horas de estocagem, somente 41% das células mantinham sua viabilidade, enquanto na saliva 54% e nos dois tipos de leite e no meio de cultura McCoy, aproximadamente 97%. Não houve diferença estatística em tempo algum entre os dois tipos de leite. Ao simular a situação de estocagem de dentes avulsionados, os experimentos foram realizados e os meios foram mantidos em ambiente com ar refrigerado a 20°C e não em geladeira. Com isso, não foi possível realizar a leitura de 24 horas para os dois tipos de leite, pois eles precipitavam o seu material biológico impossibilitando a contagem em microscopia óptica. Além disso, em dois casos, foi verificada também a presença de bactérias e fungos no leite pasteurizado tipo C. Ao final do período estudado (24h) o meio de cultura McCoy apresentava viabilidade celular de 95%, saliva de 38% e solução fisiológica de 24%.

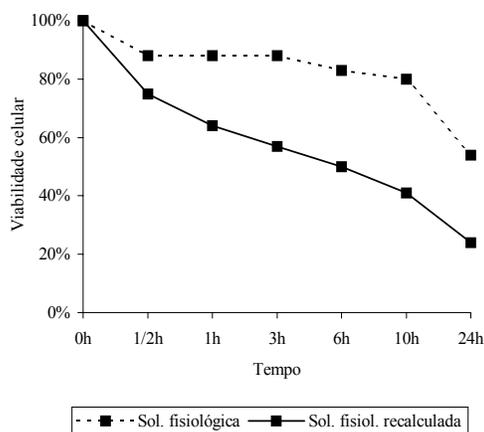


Figura 1. Média da porcentagem de viabilidade das células mononucleares de seis doadores voluntários mantidas em solução fisiológica por um período de 24h. A linha pontilhada representa a porcentagem da viabilidade celular em cada tempo e a linha cheia considera a redução no número de células a partir do tempo inicial no cálculo da porcentagem da viabilidade celular.

Neste estudo, foram utilizadas células mononucleares humanas considerando a maior facilidade de obtenção destas quando comparada às células do ligamento periodontal. As células foram cultivadas em diferentes meios de estocagem descritos na literatura para que se pudesse comprovar qual o mais eficiente para manutenção da viabilidade celular, visto que a preservação de células vivas sobre a superfície radicular é de fundamental importância para o sucesso de um implante dentário, ou seja, para a não ocorrência de uma

anquilose alvéolo-dentária ou reabsorção radicular por substituição (Huang *et al.*, 1996).

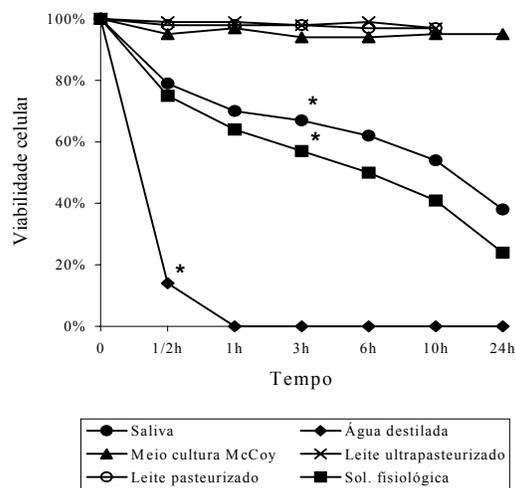


Figura 2. Média da porcentagem de viabilidade das células mononucleares de seis doadores voluntários mantidas nos diferentes meios de estocagem de dentes avulsionados por um período de 24h.

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) a partir deste tempo em relação aos dois tipos de leite e ao meio de cultura McCoy.

A combinação de uma osmolalidade e um pH fisiológicos refletem na sobrevivência das células do ligamento periodontal em meios de estocagem (Raphael e Gregory, 1990). O crescimento celular pode ocorrer entre 230 a 400mOsm e o crescimento ótimo ocorre entre 290 a 330mOsm. O pH deve estar entre 7,2 a 7,4, mas, pode ocorrer crescimento em uma faixa de pH de 6,6 a 7,8 (Marino *et al.*, 2000). Um bom meio de estocagem deve se enquadrar a essas características. Não se pôde medir a osmolalidade nos meios utilizados nos experimentos, mas a literatura relata que o leite possui uma osmolalidade de aproximadamente 250 mOsm/kg (Blömlöf *et al.*, 1981) e a saliva, sendo uma solução hipotônica, entre 60–80 mOsm/kg, o que causa lise das células (Blömlöf *et al.*, 1981; Marino *et al.*, 2000). Os resultados mostraram que o meio de cultura celular McCoy apresenta o pH na faixa ideal, porém, leite e saliva também se encontravam na faixa de pH que permite o crescimento celular.

Entre os diferentes meios de estocagem para dentes avulsionados, a água, muitas vezes, pode ser o único disponível no momento do acidente e é preferível usá-la do que deixar o dente seco até chegar ao consultório odontológico (Marino *et al.*, 2000). Neste trabalho foi comprovado que em 30

minutos a água destilada mantinha apenas 14% das células viáveis e seu pH não é o mais adequado para a proliferação celular.

A solução fisiológica, além de muitas vezes não estar disponível no local do acidente, apresenta uma osmolalidade descrita na literatura e o pH mensurado no trabalho, desfavorável ao crescimento celular. Foi pouco eficiente na preservação da viabilidade celular, mas ainda demonstrando resultados superiores aos da água destilada.

A saliva, embora com pH favorável à proliferação celular, em 10 horas mantinha 54% das células vivas e em 24 horas, 38%. Outros autores encontraram resultados menos satisfatórios: Blömlöf *et al.* (1981) sugeriram que a estocagem de dentes avulsionados em saliva por 2 a 3 horas causava lise na membrana das células do ligamento periodontal devido sua osmolalidade não fisiológica e Lindskog *et al.* (1983) verificaram que depois de 3 horas de estocagem de dentes de macacos em saliva, praticamente nenhuma atividade mitótica era vista.

O leite se apresentou como um bom meio de estocagem mantendo uma viabilidade celular de aproximadamente 97% em 10 horas. Em 24 horas não foi possível realizar a leitura, devido à precipitação de material biológico. Huang *et al.* (1996) demonstraram que o leite mantinha a viabilidade das células do ligamento periodontal em 24,4% em 72 horas e Marino *et al.* (2000), cultivando essas mesmas células, tiveram resultados similares aos apresentados aqui, pois em 8 horas de estocagem, os leites ultrapasteurizado e pasteurizado tipo C se mostraram mais eficientes do que o HBSS.

A eficiência do leite como meio de estocagem foi também comprovada por Lindskog *et al.* (1983), utilizando dentes extraídos de macacos. Foi verificado que depois de 3h, mais da metade da atividade mitótica original da membrana periodontal ainda estava presente, exceto nas suas partes mais superficiais. Para dentes humanos extraídos, Courts *et al.*, no mesmo ano, demonstraram que estocados durante uma hora em leite pasteurizado integral mantinham a viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal de forma significativamente superior à saliva e água destilada e inferior ao HBSS.

Alguns autores citam meios de cultura de células e tecidos como possíveis meios de estocagem de dentes avulsionados, sendo o HBSS o mais descrito (Hiltz e Trope, 1991; Marino *et al.*, 2000). Neste trabalho foi utilizado o meio McCoy, pois era aquele disponível no Laboratório de Imunologia da Universidade Estadual de Maringá e que vem sendo utilizado com bastante frequência e com bons resultados na preservação das células. O McCoy

também demonstrou ser efetivo, chegando a manter 95% das células vivas em 24h. Todavia, sua disponibilidade no local do acidente ou no consultório odontológico é quase nula. O mesmo é descrito por Hiltz e Trope (1991) para o HBSS, com capacidade de manter a viabilidade celular na superfície radicular por até 72h, mas, na maioria das vezes, inviável no momento ou no local do acidente.

Ao discutir os altos níveis de viabilidade celular do leite quando comparados com o de outros meios com igual pH e osmolalidade, Marino *et al.* (2000) sugeriram que se deveria ao valor nutritivo e à presença de fatores de crescimento como o EGF (fator de crescimento epidérmico ou epitelial), além de nutrientes essenciais para as células. Se comparado à saliva, o leite pasteurizado possui ainda um número reduzido de bactérias.

O EGF é um peptídeo sintetizado e liberado pelos restos epiteliais de Malassez com envolvimento na manutenção do espaço periodontal pela promoção da reabsorção óssea (Consolaro, 2002). Em 1961, Loe e Waerhaug sugeriram que os restos epiteliais de Malassez possuíam um papel importante na proteção da superfície radicular contra a anquilose alvéolo-dentária, fato demonstrado por Lindskog *et al.* (1988), Hammarström *et al.* (1989) e Wallace e Vergona (1990). Brice *et al.* (1991), utilizando dentes que serviram de ancoragem para aparelhos ortodônticos e em seguida foram indicados à extração, verificaram que em áreas de reabsorção induzida ortodonticamente e com subsequente reparação havia a presença de células epiteliais similares às encontradas nos restos epiteliais de Malassez adjacentes. Discutiram que estas células estavam intimamente envolvidas com o reparo da reabsorção radicular ortodôntica e reconstituição do periodonto após movimentação dentária. Logo, o sucesso nos implantes dentários parece estar diretamente relacionado com manutenção da viabilidade dos remanescentes periodontais, como os cementoblastos e os restos epiteliais de Malassez, prevenindo a ocorrência da anquilose alvéolo-dentária e possível reabsorção dentária por substituição (Consolaro, 2002).

O leite e a saliva são secreções glandulares, produtos derivados de tecidos de natureza epitelial, e contêm EGF em sua constituição. O embebedimento do dente no leite ou na saliva permeia os remanescentes aderidos à superfície dentária de EGF, que estimula a proliferação e regeneração dos restos epiteliais de Malassez e ativa a reabsorção do osso alveolar, ajudando a dificultar a proximidade do tecido ósseo na superfície dentária, diminuindo a

probabilidade de instalação da anquilose alvéolo-dentária (Consolaro, 2002).

Esta ação do EGF no meio de estocagem acontece nos momentos iniciais e norteadores da reparação do ligamento periodontal com estrutura comprometida. O papel do EGF sobre a osteoclasia, estimulando-a, explica o porquê dos melhores resultados dos reimplantes em quase todas as casuísticas clínicas ou experimentais com armazenamento do dente em leite ou saliva, mesmo quando o tempo de permanência fora do alvéolo for igual a outras formas de armazenamento (Consolaro, 2002).

Conclusão

A partir dos resultados obtidos nas condições experimentais, conclui-se que: o leite ultrapasteurizado integral pode ser considerado um bom meio de estocagem de dentes avulsionados, pois apresenta uma boa efetividade na manutenção da viabilidade celular, sendo facilmente armazenado em escolas e academias, onde mais freqüentemente acontecem acidentes de avulsões; o EGF pode ser um dos fatores, além da osmolalidade e pH fisiológicos, que contribuem para que o leite mantenha a viabilidade celular dos remanescentes periodontais, evitando assim uma anquilose alvéolo-dentária e subsequente reabsorção por substituição.

Referências

- ANDREASEN, J. O. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int. J. Oral Surg.*, Copenhagen, v. 10, p. 43-53, 1981.
- BARRET, E. J.; KENNY, D. J. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v. 13, p. 153-163, 1997.
- BLÖMLOF, L. et al. Storage of human periodontal ligament cells in a combination of different media. *J. Dent. Res.*, Alexandria, v. 60, p. 1904-1906, 1981.
- BRICE, G. L. et al. An ultrastructural evaluation of the relationship between epithelial rests of Malassez and orthodontic root resorption and repair in man. *Aust. Orthod. J.*, v. 12, p. 90-94, 1991.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Oslo, v. 21, p. 77-89, 1968.
- COHEN, S.; BURNS, R. C. *Pathways of the pulp*. 6. ed. St. Louis: Mosby, 1994.
- CONSOLARO, A. *Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas*. Maringá: Dental Press, 2002.
- COURTS, F. J. et al. Milk as an interim storage medium for avulsed teeth. *Pediatr. Dent.*, Chicago, v. 5, p. 183-186, 1983.
- DE DEUS, Q. D. *Endodontia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992.
- GROSSMAN, L. I. *Endodontia prática*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976.
- HILTZ, J.; TROPE, M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hanks balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v. 7, p. 69-72, 1991.
- HAMMARSTRÖM, L. et al. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod. Dent. Traumatol.*, Copenhagen, v. 5, p. 163-175, 1989.
- HUANG, S. C. et al. Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J. Endod.*, Chicago, v. 22; p. 30-33, 1996.
- IADT – International Association of Dental Traumatology guidelines. Disponível em: www.sbt.org.br. Acesso em: 05/03/2003.
- INGLE, J. I.; BAKLAND, L. K. *Endodontics*. 4. ed. Malvern: Lea & Febiger, 1994.
- LINDSKOG, S. et al. Mitoses and microorganisms in the periodontal membrane after storage in milk or saliva. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v. 91, p. 465-472, 1983.
- LINDSKOG, S. et al. Evidence for a role of odontogenic epithelium in maintaining the periodontal space. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 15, p. 371-373, 1988.
- LÖE, H.; WAERHAUG, J. Experimental replantation of teeth in dogs and monkeys. *Arch. Oral Biol.*, Kidlington, v. 3, p. 176-184, 1961.
- MARINO, T.G. et al. Determination of periodontal ligament cell viability in long shelf-life milk. *J. Endod.*, Chicago, v. 26, p. 699-702, 2000.
- RAPHAEL, S. L.; GREGORY, P. J. Parenteral awareness of the emergency management of avulsed teeth in children. *Aust. Dent. J.*, St. Leonards, v. 35, p. 130-133, 1990.
- SOARES, I. J.; GOLDBERG, F. *Endodontia – Técnica e Fundamentos*. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- WALLACE, J. A.; VERGONA, K. Epithelial rests' function in replantation: Is splinting necessary in replantation? *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v. 70, p. 644-649, 1990.
- WALTON, R. E.; TORABINEJAD, M. *Princípios e prática em Endodontia*. 2. ed., São Paulo: Santos, 1997.
- WEINE, F.S. *Tratamento endodôntico*. 5. ed. São Paulo: Santos, 1998.

Received on January 30, 2003.

Accepted on May 15, 2003.