



UNICAMP

MARCELO MARIGO



**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES
SENSÍVEIS AO NÍQUEL PROVENIENTE DE APARELHOS
ORTODÔNTICOS FIXOS**

**Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências – Área de concentração:
Ortodontia**

**PIRACICABA
1999**

MARCELO MARIGO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES
SENSÍVEIS AO NÍQUEL PROVENIENTES DE APARELHOS
ORTODÔNTICOS FIXOS**

**Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências – Área de concentração:
Ortodontia**

**Orientador: Prof. Dr. Darcy Flávio
Nouer -FOP – UNICAMP
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia
Alves de Oliveira Fraga – CENBIOS -
UNIVALE**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, _____

Assinatura do Orientador

**PIRACICABA
1999**



7912614



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 05 de Fevereiro de 1999, considerou o candidato MARCELO MARIGO aprovado.

1. Prof. Dr. DARCY FLAVIO NOUER _____

2. Prof. Dr. KIKUO SATO _____

3. Prof. Dr. KURT FALTIN JUNIOR _____

4. Profa. Dra. VANIA CELIA VIEIRA DE SIQUEIRA _____

5. Prof. Dr. CELSO PAULINO DA COSTA _____

**Dedico este trabalho,
À minha esposa Suely, meus filhos
Marcela e Guilherme, pela constante
manifestação de apoio e carinho.**

**Ao meu pai, meu grande incentivador,
mesmo não estando presente entre nós,**

**À minha família e à de minha esposa, pela
confiança e amizade em mim depositadas.**

**Ao professor Darcy Flávio Nouer, Coordenador
do Curso de Pós Graduação em Ortodontia,
pela confiança, atenção, amizade e
orientação desse trabalho.**

**À minha amiga, Professora
Lúcia Alves de Oliveira Fraga, que
com sua dedicação, valiosa e incansável
colaboração, este trabalho pode ser concluído**

AGRADECIMENTOS

Aos docentes da Disciplina de Ortodontia da FOP-UNICAMP, Professoras Doutoras, Maria Beatriz Magnani, Maria Helena Castro Almeida e Vânia Célia Vieira de Siqueira, pela amizade e contribuição à minha formação ortodôntica.

Ao Professor Doutor Celso Paulino da Costa pelo incentivo e entusiasmo a nós desprendido.

Aos colegas professores do Laboratório de Imunologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UNIVALE, Alda Maria Soares Silveira, Luiz Cosme Cotta Malaquias, Marisa Cristina Genelhu Leite Santos e Virgínia Ramos Pizzolo, e às técnicas, Lilia Cardoso Moreira, Maria de Fátima da Silva e Marlucy Rodrigues Lima, pela amizade e valiosa colaboração.

Aos Professores Doutores, Giovanni Gazzinelli, Pesquisador Titular do Centro de Pesquisa René Rachou e Rodrigo Corrêa Oliveira, Chefe do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Parasitas do Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) - FIOCRUZ - BH, pelo apoio e incentivo.

Ao amigo, Dr. Aloísio Proba, pela presteza e dedicação com que colaborou nos testes de sensibilidade cutânea nos pacientes, nossa admiração.

Ao Professor Doutor Alexandre Sylvio Vieira da Costa (Universidade Vale do Rio Doce), a quem foi confiado o tratamento estatístico desse estudo.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela oportunidade que nos foi concedida para a realização do curso de Doutorado e desse trabalho.

Ao Curso de Odontologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Vale do Rio Doce, na pessoa da Diretora Ayla Norma Ferreira Matos e do Magnífico Reitor Dr. Hermírio Gomes da Silva, pela compreensão e incentivo à nossa formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela valiosa contribuição para a realização desse estudo.

À Comissão Institucional de Capacitação Docente (CICD-UNIVALE), pela valiosa contribuição.

Aos colegas do Curso de Doutorado, Mestrado e Especialização, pela felicidade do convívio neste período, e em especial à amiga Dra. Laura Buso, nossa admiração.

Aos meus colegas professores no Curso de Odontologia do CENBIOS-UNIVALE, pelo apoio e compreensão durante nosso afastamento.

Ao amigo Dr. Wagner Quaresma Damásio, pela valiosa colaboração nas fotografias deste estudo e por sua eterna amizade.

Ao meu grande amigo Carlos José de Carvalho Rangel, pela presteza de nos facilitar nossas viagens para que este curso pudesse ser concluído e pela sua fiel amizade.

Aos meus amigos, que com apoio e compreensão se privaram de nosso constante convívio.

E a todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTAS.....	1
• LISTA DE FIGURAS.....	1
• LISTA DE TABELAS	4
• LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO.....	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. CORROSÃO DAS LIGAS UTILIZADAS NOS APARELHOS ORTODÔNTICOS	18
2.2. TESTES DE SENSIBILIDADE CUTÂNEA (<i>Patch Tests</i>)	30
2.3. TESTE DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS (LTT).....	42
3. PROPOSIÇÕES	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1. GRUPOS DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS.....	53
4.2. TESTE DE SENSIBILIDADE CUTÂNEA (<i>Patch Test</i>).....	56
4.3. OBTENÇÃO DE SOLUÇÕES CONTENDO NÍQUEL PROVENIENTE DA COR- ROSÃO <i>in Vitro</i> DE APARELHOS ORTODÔNTICOS (EXTRATO).....	59
4.4. SULFATO DE NÍQUEL (NiSO_4).....	60
4.5. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA	60
4.6. COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO DOS PACIENTES.....	61
4.7. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	61
4.8. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR <i>in Vitro</i> – Blastogênese.....	64

4.9. DOSAGEM DE INTERLEUCINA 5 (IL-5) E INTERFERON GAMA (IFN- γ) EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO.....	66
4.10. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	67
5. RESULTADOS.....	69
6. DISCUSSÃO.....	85
7. CONCLUSÕES	98
ANEXOS	100
• ANEXO 1 – Relação dos pacientes estudados considerando sexo, idade, teste de sensibilidade cutânea ao níquel, tempo de exposição ao aparelho ortodôntico, história de alergia e manifestação clínica avaliada	101
• ANEXO 2 – Parecer do CEP - Comitê de Ética em Pesquisa/FOP UNICAMP	102
• ANEXO 3 – Dosagem espectrofotométrica de metais (Ni, Co, Cr) provenientes da corrosão de aparelhos ortodônticos fixos em solução salina durante 7, 30 e 60 dias.....	103
• ANEXO 4 – Curva padrão IL-5 e Curva padrão de IFN- γ	104
• ANEXO 5 – Quadros de análises de variâncias dos gráficos	105
SUMMARY	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hiperplasia gengival em região de incisivos, sugerindo hipersensibilidade ao níquel proveniente da corrosão do aparelho ortodôntico	53
Figura 2 – Queilite angular proveniente da dermatite de contato do aparelho ortodôntico.....	54
Figura 3 – Manifestação clínica de sensibilidade ao níquel proveniente do aparelho ortodôntico comprometendo os lábios	54
Figura 4 – Dermatite de contato provocada por uso de brincos.....	55
Figura 5 – Hiperplasia gengival e lábios quebradiços do mesmo paciente acima sensível ao níquel	55
Figura 6 – Reação negativa ao teste de sensibilidade cutânea com NiSO ₄	57
Figura 7 – Reação positiva + ao teste de sensibilidade cutânea com NiSO ₄	57
Figura 8 – Reação positiva ++ ao teste de sensibilidade cutânea ao NiSO ₄	58
Figura 9 – Reação positiva +++ ao teste de sensibilidade cutânea com NiSO ₄	58
Figura 10 a e 10 b – Quatro diferentes montagens de aparelhos ortodônticos, imersos em solução salina por um período de 7, 30 e 60 dias	60
Figura 11a e 11b – Sangue periférico sendo adicionado sobre Ficoll-hypaque e aspecto da solução antes da centrifugação	62
Figura 12 – Destaque da separação do plasma autólogo, anel de PBMC, solução de Ficoll-hypaque e células vermelhas, após centrifugação.....	62
Figura 13 – “Pellet” das PBMC após lavagem e centrifugação.....	63
Figura 14a e 14b - Visão microscópica dos linfócitos na câmara de Neubauer, em menor e maior aumento	63
Figura 15 -Gráfico da concentração de níquel por ml de solução salina proveniente da corrosão de 4 diferentes montagens de aparelhos ortodônticos por um período de 60 dias.....	70
Figura 16 - Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB ⁺ e autólogo, utilizando 2 x 10 ⁵ PBMC em diferentes concentrações de NiSO ₄	71
Figura 17 - Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB ⁺ e autólogo, utilizando 2 x 10 ⁵ PBMC em diferentes concentrações de NiSO ₄	72

- Figura 18-** Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄ 73
- Figura 19-** Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄ 73
- Figura 20 –** Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2×10^5 e 3×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄ 74
- Figura 21-** Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis ao níquel na presença de soro AB⁺ e autólogo utilizando 2×10^5 e 3×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄ 75
- Figura 22-** Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo em diferentes concentrações de NiSO₄, independentemente do número de células 76
- Figura 23 –** Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis ao níquel na presença de soro AB⁺ e autólogo em diferentes concentrações de NiSO₄, independentemente do número de células 76
- Figura 24 –** Gráfico do índice de estimulação celular em indivíduos do sexo feminino sensíveis ao níquel, na presença de 2×10^5 e 3×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄, independentemente do soro utilizado 77
- Figura 25-** Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino e feminino sensíveis ao níquel na presença de soro AB⁺ e autólogo, com 3×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄ 77
- Figura 26-** Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino e feminino sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 3×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄ 78
- Figura 27-** Gráfico do índice de estimulação celular em indivíduos do sexo masculino e feminino sensíveis ao níquel, em diferentes concentrações de NiSO₄, independente do soro, utilizando 3×10^5 PBMC 78
- Figura 28-** Gráfico do índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino e feminino sensíveis ao níquel na presença de soro AB⁺ e autólogo em diferentes concentrações de NiSO₄, utilizando 2×10^5 PBMC 79
- Figura 29 –** Gráfico da média dos índices de estimulação celular em indivíduos do sexo feminino sensíveis ao níquel, utilizando 2×10^5 e 3×10^5 células, na presença de soro AB⁺ e autólogo em diferentes concentrações de NiSO₄ 79

- Figura 30a e 30b** – Gráfico da média dos índices de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino e feminino não sensíveis ao níquel (grupo controle) na presença de soro AB⁺ e autólogo, em diferentes concentrações de extrato e sulfato, utilizando 2×10^5 PBMC **80**
- Figura 31-** Gráfico da média dos índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2×10^5 PBMC em diferentes concentrações de extrato **80**
- Figura 32-** Gráfico da média dos índices de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2×10^5 PBMC em diferentes concentrações de extrato **81**
- Figura 33 -** Gráfico da porcentagem de indivíduos sensíveis ao níquel com índice de estimulação celular superior a 2.5 e teste de sensibilidade cutânea positivo ao NiSO₄..... **83**
- Figura 34-** Gráfico de dispersão do índice de estimulação celular de pacientes com e sem manifestação clínica bucal, utilizando 2×10^5 PBMC, na presença de soro autólogo e 10µg/mg de NiSO₄ **83**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação do teste de sensibilidade cutânea positivo com o tempo de exposição ao aparelho ortodôntico e idade, em indivíduos do sexo feminino..... 71

Tabela 2 - Análise de correlação dos índices de estimulação celular (tipo de soro, número de células, concentrações de extrato e NiSO₄), em indivíduos com teste de sensibilidade cutânea positivo..... 81

LISTA DE ABREVIATURAS

- * - Efeito significativo ao nível de 5%.
- ** - Efeito significativo ao nível de 1%.
- AISI** – American Iron Steel Institute.
- Aut** – Autólogo.
- C** – Proliferação celular das culturas controle.
- CL** – Células de Langerhans.
- CPM** – Contagem por minuto.
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico.
- E** – Proliferação das culturas estimuladas pelos alérgenos.
- ELISA** – Enzyme linked immunosorbent assay.
- GL** – Grau de liberdade.
- IFN- γ** – Interferon gama.
- IL-5** – Interleucina 5.
- LTF** – Teste de proliferação de linfócitos.
- ND** – Não realizado.
- NR** – Não relatado.
- NS** – Não significativa.
- PBMC** – Células mononucleares do sangue periférico.
- PHA** – Fitohemaglutinina.
- PPD** – Tuberculina (Derivado protéico purificado).
- QM** – Quadrado médio.
- RPM** – Rotações por minuto.
- SQ** – Soma de quadrados.
- Th1** – Linfócito T *helper* (auxiliar) 1.

Th2 – Linfócito T *helper* (auxiliar) 2.

TNF- α - Fator de necrose tumoral.

μ g – Micrograma

μ l – Microlitro

ml- Mililitro

nm- Nanômetro

μ Ci- Microcurie

M- Mol

mM- Milimol

RESUMO

Geralmente, as alergias relatadas na área odontológica, são aquelas de hipersensibilidade tardia a materiais dentários específicos, em particular aqueles que contêm níquel. Reações clínicas a esse metal, proveniente da corrosão dos aparelhos ortodônticos incluem; hipertrofia e sangramento gengival, descamação labial, queilites angulares e eczemas crônicos na mucosa bucal. Normalmente, o método de diagnóstico para a alergia ao níquel, é o teste de sensibilidade cutânea, que pode indicar resultado falso-positivo ou falso-negativo. A proposta deste estudo, foi estabelecer parâmetros imunológicos para diagnóstico diferencial em pacientes sob tratamento ortodôntico e com história clínica de hipersensibilidade ao níquel. Foram realizados testes de proliferação de linfócitos, utilizando como alérgeno, solução contendo níquel proveniente da corrosão dos aparelhos e $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, e teste ELISA para detectar o envolvimento de subpopulações de Th1 e Th2 nas culturas de PBMC. Os resultados mostraram que, a concentração de $10\mu\text{g/ml}$ de NiSO_4 , foi mais efetiva para estimular as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com manifestações clínicas bucais, quando comparada com concentrações de 5 e $2,5\mu\text{g/ml}$ de NiSO_4 . Por outro lado, as soluções contendo níquel, proveniente dos aparelhos ortodônticos, inibiram a proliferação de PBMC dos mesmos pacientes, de maneira dose-dependente. Análises estatísticas mostraram uma correlação positiva, entre os indivíduos com manifestações clínicas e o teste de proliferação de PBMC, e verificou-se ainda que quanto maior o tempo de exposição ao aparelho ortodôntico, menor a sensibilidade ao teste cutâneo, independentemente da idade, em indivíduos do sexo feminino. Finalmente, os resultados mostraram que não houve produção

significativa de IL-5, nem de IFN- γ , nos sobrenadantes das culturas de PBMC, coletados após 24 e 48 horas, nas condições específicas dos ensaios propostos.

1 – INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O níquel é considerado um dos mais comuns alergênicos e um potente metal sensibilizador, sendo descrito como o “alergênico de contato onipresente”. É um elemento do grupo VIII-B na tabela periódica, tem um peso atômico de 58,7, densidade de 8,9 e existe primariamente no estado de oxidação 0 e +2, embora 4 outros estados de valência sejam conhecidos. É solúvel de certa forma em ácidos, mas não em bases.

Há dúvidas de que compostos de níquel sejam carcinogênicos, quando administrados por via oral ou cutânea, embora alguns autores suspeitem de sua possível carcinogenicidade e ou mutagenicidade. Existem evidências de que exposições ocupacionais a certos compostos de níquel estejam associadas com o desenvolvimento de certos tipos específicos de câncer (MOFFA⁴⁸, 1984). O aumento do risco de morte por câncer nasal e pulmonar foi observado primeiramente em trabalhadores de refinaria de níquel (MORGAN⁵⁰, 1958). Este autor relatou que o índice reduziu consideravelmente após a adoção de máscara de proteção pelas refinarias.

O níquel é um elemento indispensável para as plantas e alguns animais, sobretudo os mamíferos, sendo sempre encontrado nos tecidos humanos. Numa dieta normal há uma absorção entre 300 a 600 microgramas de níquel/dia. Animais de laboratório alimentados com uma dieta contendo 250 a 1000 ppm de carbonato de níquel por vários meses, apresentaram sinais de toxicidade. A quantidade de níquel na

urina normal humana é pequena, em torno de 28 microgramas e, esta concentração permanece regularmente constante por toda a vida (MOFFA⁴⁸, 1984).

A diversidade de objetos contendo níquel e capazes de sensibilizar é abundante. O ser humano está em contato constante com componentes que contêm níquel, através do ar, do manuseio de moedas, nos alimentos, nos utensílios de cozinha, produtos domésticos de limpeza, cosméticos, botões metálicos e corpos estranhos internos e externos, como jóias, pulseira de relógio e diversos outros acessórios que fazem parte da vida diária (BENNETT⁸, 1982).

A utilização de objetos que contêm níquel e induzem à alergia é bem freqüente nas atividades médicas. Esses objetos compreendem implantes metálicos, acessórios para articulações, dispositivos de osteosíntese e intra uterinos, próteses ortopédicas, grampos cirúrgicos para a pele, equipamentos de infusão, prótese de válvula mitral, eletrodos elétricos transcutâneos de estimulação de nervos, eletrodos de eletrocardiograma e agulhas de acupuntura. Na odontologia, mais especificamente, são utilizados implantes dentários, dispositivos de fixação de coroas, próteses fixas, removíveis e aparelhos ortodônticos que também apresentam um alto teor de níquel em suas composições.

Segundo COOMBS & GELL¹⁵, 1975, no início do século, Von Pirquet definiu alergia como uma reação pronunciada de um indivíduo a uma substância quando ela é reintroduzida no organismo. A substância sensibilizante é chamada de antígeno. O antígeno é uma molécula capaz de induzir produção de anticorpos ou de ativar células específicas de defesa. As reações alérgicas induzidas por ligas contendo níquel são chamadas de dermatites de contato e são consideradas reações de hipersensibilidade do tipo IV. Nesse caso, os alérgenos ou haptenos são substâncias de

baixo peso molecular e dependem da ligação com certas proteínas endógenas para formar uma macromolécula antigênica capaz de estimular o sistema imunológico. Uma vez processados pelos macrófagos e apresentados aos linfócitos T, estes antígenos estimulam a produção de citocinas responsáveis pelas reações, que dependendo da intensidade, podem causar danos aos tecidos. Os efeitos da hipersensibilidade nas dermatites de contato aparecem geralmente na pele em forma de eczemas. Reações nas mucosas e especialmente estomatites não são raras e estão descritas na literatura (HILDEBRAND³¹, 1989).

O diagnóstico de alergia de contato é usualmente mais difícil de ser estabelecido na mucosa bucal do que na pele, já que os sintomas tais como vermelhidão ou leve tumefação não são clinicamente fáceis de ser detectados na cavidade bucal. Indivíduos manifestando características de estomatites por alergia de contato, apresentam queixas, que, de um modo geral, são confundidas com as de natureza galvânica. E ainda, a constante exposição ao níquel tem refletido um número crescente de pacientes com sensibilidade a esse metal (BURDEN & EEDY¹³, 1991).

A incidência de alergia ao níquel é mais comum em mulheres, provavelmente porque há um freqüente contato com jóias e bijuterias (MIRANDA⁴⁷, 1985). Na Europa e Estados Unidos, a manifestação alérgica ao níquel é a mais comum alergia de contato entre as mulheres (STARKJAER & MENNÉ⁶⁰, 1990). As dermatites de contato apresentam duas fases: a fase de sensibilização e a fase de indução da resposta. A primeira é o período inicial de contato com a substância até os linfócitos reconhecerem e responderem a esse agente. A fase de indução da resposta é o período da reexposição até a manifestação da dermatite propriamente dita. A maior

incidência de dermatite de contato ao níquel em mulheres, se deve à exposição crônica ao alérgeno, que se dá freqüentemente através do uso de brincos. Considerando que as hastes desses brincos são normalmente feitas em ligas de níquel banhadas a ouro, isto torna a sensibilização mais severa (BLANCO –DALMAU¹¹, 1984).

De acordo com a literatura, a freqüência de hipersensibilidade ao níquel dobrou nos últimos 10 anos. Estima-se que 15 a 30% da população seja sensível ao níquel. E esta sensibilização é bem maior nas mulheres, numa proporção homem/mulher de 1:8 (GREPPI *et al.*²⁸, 1981). Outros autores (MENNÉ *et al.*⁴⁵, 1987) acreditam que no sexo feminino essa prevalência atinja a faixa de 7 a 15% e BASS⁶, 1993, relata uma prevalência nas mulheres de 28%.

As reações alérgicas observadas em pacientes durante o tratamento odontológico são de um modo geral reações de hipersensibilidade tardia a materiais dentários específicos. Especialmente no tratamento ortodôntico, essas reações vêm despertando, na atualidade, preocupações em relação ao níquel liberado pela corrosão dos aparelhos fixos no meio bucal (GJERDET & HERO³⁶, 1987; BISHARA⁹, 1995; BISHARA *et al.*¹⁰, 1993). As bandas ortodônticas, braquetes e arcos, são universalmente fabricados com ligas de aço inoxidável austeníacas, contendo 18% de cromo e 8% de níquel. Além disso, as ligas de níquel-titânio, introduzidas nos anos 70, são atualmente usadas em larga escala. Essas ligas, segundo alguns autores (GREPPI *et al.*²⁸, 1981), chegam a conter 55% de níquel em sua composição. Visto que o meio bucal é particularmente ideal para a biodegradação de metais, e considerando a existência de diversos fatores tais como a ação dos

microrganismos, temperatura, presença de íons e atividades enzimáticas, os processos de corrosão nesse meio são acelerados.

Algumas manifestações clínicas bucais, observadas nos pacientes que se submetem ao tratamento ortodôntico, sugerem reação ao níquel proveniente desses acessórios da terapia. Hiperplasias gengivais, queilite angular, descamação labial e eritemas multiformes, podem ser observados com alguma frequência. Embora estas reações alérgicas não sejam tão comuns, elas podem contribuir para o desenvolvimento de quadros graves que comprometem o tratamento ortodôntico, a saúde bucal e geral do paciente.

Atualmente os testes alérgicos são largamente utilizados para o diagnóstico de reações de contato a diferentes componentes alergênicos. O teste de sensibilidade cutânea (*Patch Test*) foi introduzido por BONNEVIE¹², 1934, para testes de rotina compreendendo 21 substâncias, entre elas o sulfato de níquel a 5%, que vem sendo empregado amplamente como auxiliar no diagnóstico diferencial das dermatites alérgicas de contato (MARCUSSEM⁴³, 1959). Entretanto, quando o teste é aplicado na fase aguda com o antígeno específico, podem ocorrer severas manifestações de dermatites, e em alguns casos os testes revelam resultados falso-positivos.

O diagnóstico de alergia ao níquel é baseado em histórias familiares, observações clínicas e resultados dos testes de sensibilidade cutânea (MENEZES⁴⁴, 1997). Assim, métodos fidedignos *in vitro* são desejáveis para complementar testes *in vivo*. O desenvolvimento de testes específicos *in vitro*, como os ensaios de estimulação de linfócitos com sais de níquel, tem permitido avanços no diagnóstico.

Muitos autores têm relatado a aplicação desses testes para diferenciar os indivíduos níquel sensíveis dos não sensíveis. A utilização de diferentes concentrações

de sulfato de níquel (NiSO_4) nos ensaios de proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes alérgicos e controles, revelou resultados promissores (GIMENEZ-CAMARASA *et al.*²⁵, 1975; AL-TAWIL *et al.*¹, 1981).

Apesar de alguns trabalhos na literatura se referirem ao tema exposto, pouca atenção tem sido dada às possíveis manifestações alérgicas bucais conseqüentes ao uso de aparelhos ortodônticos contendo níquel. Acredita-se que com o rápido desenvolvimento tecnológico dos materiais ortodônticos na atualidade, e paralelamente com a busca de métodos específicos e mais precisos para o diagnóstico de reações de hipersensibilidade a materiais odontológicos, poderá se evitar o desconforto de um processo alérgico ao paciente quando submetido ao tratamento ortodôntico.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

As ligas de aço inoxidável austeníacas (AISI tipo 316 L) são as mais comumente usadas na fabricação dos braquetes em ortodontia. De um modo geral, essas ligas têm uma composição de 18% de Cromo (Cr), 8% de Níquel (Ni), 2 a 3% de molibidênio (Mo) e uma baixa proporção de Carbono (C). Algumas propriedades físicas e mecânicas, como a ductilidade e resistência à corrosão, tornaram essas ligas atraentes para esta aplicação⁵⁵.

A resistência à corrosão é relativamente boa nessas ligas. Entretanto, esses materiais são submetidos, quando aplicados em ortodontia, a situações adversas no meio bucal sob um baixo pH, podendo sofrer corrosões localizadas⁵⁵.

As ligas de aço inoxidável durante sua fabricação são submetidas a diversos processos. O níquel é adicionado em certa etapa para estabilizar a fase austeníaca. E, para minimizar o risco de hipersensibilidade ao níquel durante o processo de corrosão, seria necessário aumentar a resistência à corrosão dessas ligas, melhorando o controle da liberação dos íons de níquel⁵⁵.

Está bem relatada em vários trabalhos^{28,6,45} a alta incidência de pessoas alérgicas ao níquel, constatado através dos testes de sensibilidade cutânea, e ainda diversos estudos mostram reações de hipersensibilidade ao níquel por exposição aos aparelhos ortodônticos.

Os meios de diagnósticos diferenciais para estes problemas, vêm sendo desenvolvidos de diversas formas, dentre eles os testes de sensibilidade cutânea e o

teste de transformação de linfócitos T (LTT). Este último tem sido razão de estudos no sentido de se ter maior confiabilidade no diagnóstico de hipersensibilidade ao níquel¹.

Para melhor entendimento e na tentativa de individualizar os assuntos a serem abordados, conforme evolução do trabalho, este capítulo foi subdividido em três itens: 2.1- Corrosão das ligas utilizadas nos aparelhos ortodônticos; 2.2- Testes de sensibilidade cutânea (*Patch Tests*) e; 2.3- Teste de proliferação de linfócitos T *in vitro* (LTT).

2.1- CORROSÃO DAS LIGAS UTILIZADAS NOS APARELHOS ORTODÔNTICOS

Em uma revisão da literatura, GREPPI *et al.*²⁸, 1981, constataram um grande aumento da prática ortodôntica e que os diversos tipos de arcos e braquetes utilizados nessas terapias, chegam a conter 55 % de níquel em sua composição. E, segundo esses autores, já que o níquel é capaz de induzir reações de hipersensibilidade, a biossegurança dessas ligas é questionável. Relataram que a freqüência de hipersensibilidade ao níquel dobrou nos últimos 10 anos. Estima-se que 15% a 30% da população seja sensível a esse metal. A sensibilidade é maior nas mulheres, com uma proporção homem/mulher de 1:8. Esses mesmos autores afirmaram que os indivíduos na faixa etária de 10 a 20 anos se submetem mais freqüentemente ao tratamento ortodôntico. E é nesse período que apresentam os primeiros sintomas de

alergia ao níquel proveniente dos aparelhos. O processo é dividido em duas fases distintas. A primeira, que é a fase de sensibilização, é o período de contato inicial com o material alergênico para reconhecimento e resposta. A segunda é a de estímulo, que é o período da exposição ao componente alergênico até o aparecimento das manifestações clínicas. Os mesmos autores ainda relatam nesta revisão que 60 µg/l de níquel é uma quantidade suficiente para sensibilizar e que em condições propícias pode provocar dermatite de contato em indivíduos sensíveis. A mesma quantidade poderia induzir à hipersensibilidade quando presente nos fluidos corporais. Descrevem também diversos trabalhos sobre a prevalência da hipersensibilidade em relação à idade e ao sexo. Alertam quanto à percentagem crescente de níquel adicionados aos fios ortodônticos pelos fabricantes, com o objetivo de melhorar as propriedades físicas das ligas, não se preocupando quanto à biossegurança desses produtos. Concluíram que as implicações biológicas das ligas contendo níquel são preocupantes; que dispositivos ortodônticos metálicos podem provocar reações clínicas adversas em pacientes com sensibilidade ao níquel; e finalmente que essas ligas com níquel podem estimular jovens do sexo feminino à hipersensibilidade. Esses autores sugerem que as observações clínicas locais ou reações sistêmicas, monitoramento imunológico e análise de amostras sangüíneas para a dosagem do níquel, deveriam ser incluídas nos métodos de avaliação de alergia ao níquel.

Conforme citações de BENNETT⁸, 1982, o níquel é um metal largamente distribuído na natureza e é emitido na atmosfera de diversas formas, através de vulcões e de numerosos produtos que são fabricados pelo homem. Segundo esse mesmo autor, tem havido um rápido crescimento na utilização industrial do níquel na

atualidade. Esse metal é usado na produção de aço, ligas, moedas, utensílios domésticos, baterias níquel-cádmio, etc. O níquel tem sido acumulado ao longo das rodovias, resultado do uso de certos tipos de gasolina e abrasão metálica de partes de veículos. Na conversão do carvão para o metano, níquel-catalisadores podem se converter em sulfato de níquel e níquel-carbonil e possivelmente liberados no meio ambiente. Os níveis de níquel no ambiente, em geral, não produzem efeitos maléficos à saúde, embora alguns efeitos têm sido associados com a exposição ocupacional a alguma forma de níquel. Nesse trabalho, o autor avaliou dados representativos de concentrações de níquel no meio ambiente e no homem e também as vias de exposição. Com essa avaliação, o autor estimou uma dieta de níquel na ordem de 170 $\mu\text{g}/\text{dia}$, com uma absorção de 5%, uma retenção no corpo de 30% da quantidade absorvida e estimou ainda, um conteúdo médio de níquel no corpo humano de 500 μg .

MORTEN *et al.*⁵¹, 1982, propuseram medir a quantidade dos metais liberados das soldas de prata dos aparelhos ortodônticos de dois diferentes tipos, aço inoxidável e ligas de cromo-cobalto. As medições foram feitas depois de 3 e 24 dias de imersão em 0,9% de solução de cloreto de sódio. Altas taxas de cobre, zinco e cádmio foram encontradas. Conforme esses autores, as soldas de prata em aço inoxidável sofreram maior corrosão e liberaram maior quantidade de níquel do que as ligas de cromo-cobalto.

Conforme BENCKO⁷, 1983, o níquel e suas combinações pertencem às substâncias clássicas nocivas industriais, cujos efeitos desfavoráveis também são encontrados em casos de exposição não profissionais, particularmente em relação ao emprego de acessórios de uso de rotina, como bijuterias. Para as plantas e alguns

animais, sobretudo os mamíferos, o níquel é um elemento essencial. Ainda segundo o autor, entre os efeitos biológicos cancerígenos já comprovados, estão casos de exposição profissional ao níquel a longo prazo pela incidência elevada de casos de câncer de pulmão e da fossa nasal. Para monitorar a exposição ao níquel, pode-se recomendar exames de sangue e urina. Esse mesmo autor recomenda que a assistência médica profilática dos trabalhadores expostos a longo prazo, é uma exigência necessária.

GREIG²⁷, 1983, descreveu o caso de um paciente no qual já havia sido diagnosticado dermatite de contato pelo níquel nas pernas e que fazia uso de aparelho ortodôntico extra bucal, apresentando dermatite de contato causada pela corrosão das fivelas niqueladas das tiras do aparelho, que foram substituídas e a dermatite desapareceu por completo. No entanto, o paciente perdeu os acessórios do aparelho e houve a necessidade de novo aparelho extra bucal, que foi adaptado por outro profissional que desconhecia o problema alérgico do paciente. A dermatite reapareceu com maior intensidade em poucos dias.

PARK & SHEIARER⁵³, 1983, dosaram a quantidade de níquel e cromo liberados de aparelhos ortodônticos incubados em solução de 0.05% de cloreto de sódio por 3, 6, 9 e 12 dias. Conforme os resultados encontrados, a média dos metais liberados foi de 40 µg de níquel e 36 µg de cromo por dia, em aparelhos ortodônticos fixos completos. Afirmaram que na cavidade bucal alguns fatores como temperatura, quantidade e qualidade da saliva, placas bacterianas, pH, proteínas, propriedades físicas e químicas dos alimentos e líquidos, e condições gerais de saúde bucal podem influenciar na corrosão dos aparelhos. Esses mesmos autores observaram a presença

de hiperplasias gengivais manifestadas não somente por uma higiene bucal deficiente, mas também por uma hipersensibilidade ao níquel e/ou íons de cromo desprendidos durante a corrosão dos aparelhos ortodônticos. Observaram ainda nesses pacientes, estomatite de contato, eritema brando com ou sem edema, perda de paladar e de sensibilidade, sensação de queimadura, irritação na área envolvida e queilite angular.

Descrevendo um histórico do uso de níquel na odontologia e afirmando que as ligas contendo níquel não são recentes nesta área, MOFFA⁴⁸, 1984, fez um levantamento dos meios de contato com o níquel, abordando a necessidade biológica da absorção do níquel dos alimentos, água, etc. Relatou que os indivíduos que trabalham diretamente com esse metal, tiveram uma alta incidência de câncer, principalmente de pulmões. Destacou principalmente a sensibilidade ao níquel, citando incidências conforme diversos trabalhos. Concluiu fazendo as seguintes recomendações: 1) Requerer aos laboratórios industriais que identifiquem os metais usados nas ligas, dando informações de segurança à saúde; e 2) Fazer pesquisas adicionais para o desenvolvimento de procedimentos de diagnóstico para os efeitos adversos dos metais.

MIRANDA & DUNCANSON⁴⁷, 1985, afirmaram que a incidência de alergia ao níquel é mais comum na mulher, provavelmente porque há um freqüente contato com jóias e bijuterias que podem sofrer corrosão liberando metais que provocam reações alérgicas. Outros metais como mercúrio, berílio, cromo, cobalto e ouro também provocam alergia, porém menos do que o níquel.

Segundo MAJER & SMITH⁴¹, 1986, a maioria dos braquetes contém em sua composição 18 a 20% de cromo e 8 a 10% de níquel com uma pequena quantidade de

magnésio e silicone, e baixo conteúdo de carbono em níveis menores que 0,1%. A corrosão nos aparelhos ortodônticos pode ocorrer *in vivo* com o tempo e com a avaria eletroquímica, apesar da alta resistência à corrosão dos fios de níquel-titânio. Conforme esses autores, após avaliarem braquetes novos e reciclados *in vitro* em saliva artificial, os resultados indicaram que diferentes fabricantes apresentavam diferenças nos índices de corrosão, e que os braquetes reciclados são mais susceptíveis ao processo de corrosão. Concluíram também que a corrosão de braquetes pode ser avaliada por um simples teste *in vitro*.

MENNÉ *et al.*⁴⁵, 1987, estudaram 11 diferentes ligas contendo níquel com o objetivo de avaliar a estabilidade de corrosão e suas manifestações em indivíduos com sensibilidade ao níquel. Afirmaram que ligas com uma liberação de níquel em solução aquosa excedendo $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ por semana, provocam uma forte reação em teste de contato em indivíduos com sensibilidade ao níquel. As ligas com liberação de metais abaixo de $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ por semana mostraram fraca reatividade. Afirmaram que a alergia ao níquel é um problema de saúde e deve ser minimizado usando ligas com corrosão de níveis abaixo de $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ por semana e que ações podem ser tomadas por dermatologistas, indústrias e autoridades para resolver esse problema.

GJERDET & HERO²⁶, 1987, submeteram os fios ortodônticos de aço inoxidável e cromo-cobalto a testes de corrosão por imersão, visando avaliar a liberação de metais quando estas ligas eram submetidas a tratamento térmico em diferentes temperaturas. Os elementos analisados liberados pela corrosão foram o Ferro (Fe), Níquel (Ni) e Cobalto (Co). Fios sem tratamento térmico e arcos submetidos a 1 minuto de tratamento térmico em temperaturas distintas, foram

testados após uma semana de imersão em saliva artificial. Os resultados mostraram que os fios de cromo-cobalto liberam mais metais do que os de aço inoxidável, quando analisados sem tratamento térmico. Quando tratados termicamente, a liberação de metais nos fios de aço inoxidável aumentou rapidamente no momento que eram submetidos a temperaturas iguais e acima de 400° C. Já nos produtos de cromo-cobalto o aumento ocorreu a partir de 500° C. Segundo esses mesmos autores, os resultados obtidos devem ser considerados na aplicação de tratamentos térmicos em fios ortodônticos. Concluíram que a corrosão das ligas analisadas diminuiu quando o tratamento térmico foi feito em temperaturas abaixo de 400° C. E que as ligas de aço inoxidáveis são mais sensíveis às corrosões do que as ligas de cromo-cobalto. Ainda recomendam que quando houver indicação ao tratamento térmico, que se faça em temperaturas mais baixas possíveis. Com isso, o controle das corrosões dos aparelhos ortodônticos é maior, minimizando a liberação de metais.

DUNLAP *et al.*¹⁷, 1989, relataram o caso de uma menina de 14 anos de idade que iniciou um tratamento ortodôntico fixo convencional com braquetes, bandas e fios de níquel-titânio. Poucos dias após o início do tratamento, a paciente apresentou sensação de queimadura na mucosa bucal. A dor piorava e a paciente fazia uso de analgésicos e anestésicos tópicos bucais. Com isto, perdeu peso em razão da dificuldade de se alimentar. Três meses após, apresentou lesões maculares eritematosas grandes, dentro e fora da boca. A mucosa bucal, dorso da língua e palato estavam envolvidos e manifestações menores estavam presentes nos lábios. A paciente tinha história de alergia a jóias. Foi feita uma biópsia e observou-se microscopicamente edema intercelular sem epitélio, leucócitos fora e dentro do epitélio, e diversas outras manifestações que caracterizavam reações alérgicas

consistentes. Segundo esses mesmos autores, as observações clínicas e histológicas indicaram agressão após a colocação do arco níquel-titânio. As manifestações desapareceram completamente após quatro dias da remoção do fio.

De acordo com HILDEBRAND *et al.*³¹, 1989, as ligas odontológicas contendo níquel (Ni), cobalto (Co) e/ou Cromo (Cr) são largamente usadas para restaurações dentárias. Ligas Ni-Cr contêm geralmente 69-81% de níquel, ao passo que as de Cr-Co contêm geralmente menos de 1% de níquel. A maior parte dessas ligas é composta de Cobalto (60-65%), Cromo (27-30%) e Molibidênio (5-6%). Outros grupos de ligas odontológicas, não preciosas, são ligas de aço inoxidável, contendo 18% de cromo e 8% de níquel. Os mesmos autores ainda afirmaram que a citotoxicidade dos sais de níquel tem sido demonstrada nos últimos anos por várias investigações nas células epiteliais renais de macacos, células da gengiva humana e células epiteliais pulmonares de humanos. Nesse trabalho, esses autores relataram a possível correlação entre reações alérgicas e o uso de próteses ou de restaurações dentárias que contêm níquel, cobalto e cromo. Descreveram casos clínicos e afirmaram que as reações podem manifestar-se localmente, como estomatites ou mesmo distantes do agente estimulador.

BURDEN & EEDY¹³, 1991, reportaram um caso de uma menina de 13 anos de idade, portadora de uma maloclusão classe II, divisão 1, com necessidade de tratamento ortodôntico com aparelho extra bucal, para distalização dos molares superiores. Indicada a usar o aparelho por 14 horas diárias, a paciente desenvolveu prurido, bolhas e erupções eritematosas nas bochechas, de aproximadamente 2 cm de diâmetro. Os autores correlacionaram as lesões com a corrosão da fivela do aparelho extra bucal e afirmaram que a bochecha mais afetada era aquela que tinha contato

mais recente com a fivela. Relataram que a paciente era alérgica ao níquel, já que havia desenvolvido também reações semelhantes na orelha, depois do uso freqüente de brincos de bijuterias . Segundo os mesmos autores, evidências recentes sugerem que o uso freqüente dos aparelhos extra bucais reduz a probabilidade de hipersensibilidade ao níquel naqueles pacientes que não tinham história de uso de brincos ou acessórios que continham níquel. Além disso, afirmaram que as estomatites alérgicas de contato são geralmente mais difíceis de se manifestarem e de serem distinguidas das dermatites de contato.

A alta incidência de hipersensibilidade ao níquel e o aumento progressivo deste elemento nos materiais ortodônticos, têm despertado um maior interesse nas investigações relacionadas ao processo de corrosão desses materiais. Neste sentido, GRIMSDOTTIR *et al.*²⁹, 1992, propuseram analisar diferentes tipos de ligas usadas em ortodontia e avaliaram a liberação de níquel e cromo dessas ligas quando em solução salina fisiológica (cloreto de sódio 0,9% a 23° C). Analisaram aparelhos extra bucais, braquetes, bandas convencionais de ligas de aço inoxidável 18/8 . E com exceção dos arcos, muitos aparelhos ortodônticos apresentaram uma variabilidade na quantidade de soldas a prata, principalmente os aparelhos extra bucais. Após 14 dias em solução, a quantidade de níquel e cromo liberada pela corrosão foi dosada por um espectrofotômetro de absorção atômica, e os resultados indicaram que a maior quantidade desprendida foi dos aparelhos extra bucais. Os aços soldados do aparelho extra bucal foram mais susceptíveis à corrosão. Segundo esses mesmos autores, a liberação do níquel parece estar relacionada tanto com a composição quanto com método de fabricação, e a liberação não foi proporcional à quantidade de níquel na composição das ligas.

BARRET *et al.*⁵, 1993, propuseram comparar *in vitro* a taxa de corrosão de aparelhos ortodônticos compostos de: bandas, braquetes, fios de aço inoxidável e fios níquel-titânio. A avaliação foi feita a partir da imersão desses aparelhos em uma solução de saliva artificial e à temperatura de 37° C por 4 semanas. Os mesmos autores analisaram dez aparelhos, sendo cinco montagens com fios inoxidáveis e cinco com fios níquel-titânio. A liberação de níquel e cromo foi quantificada em um espectrofotômetro de absorção atômica sem chama. A análise foi feita considerando a variação do tipo de arco e o tempo de imersão durante 1, 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados mostraram que a liberação de níquel dos aparelhos ortodônticos em saliva artificial, atingiu o nível máximo após uma semana de imersão e que as taxas de níquel ou cromo não foram significativamente diferentes nos dois tipos de ligas, níquel-titânio e aço inoxidável. Para ambos os tipos de ligas dos arcos, a liberação de níquel foi 37 vezes maior que a de cromo. Finalmente, concluíram que ainda há a necessidade de se avaliar melhor a quantidade desses produtos que é de fato liberada e absorvida pelo paciente.

BISHARA *et al.*¹⁰, 1993, propuseram analisar os níveis de níquel no sangue de pacientes na fase inicial da terapia ortodôntica. Para isso, amostras de sangue periférico foram coletadas em 3 diferentes períodos do tratamento: antes da colocação do aparelho, dois meses após a colocação e quatro a cinco meses após a colocação. O estudo envolveu 31 indivíduos, 18 do sexo feminino e 13 do sexo masculino, numa faixa etária de 12 a 38 anos. Três amostras de sangue de cada paciente foram analisadas no mesmo dia, em um espectrofotômetro de absorção atômica para evitar possíveis variações do equipamento, que poderiam ocorrer se as amostras sangüíneas fossem analisadas em dias distintos. Esses autores analisaram um total de 93

amostras e concluíram que pacientes com aparelhos ortodônticos completos não apresentaram um significativo aumento dos níveis de níquel no sangue nos primeiros 4 a 5 meses de tratamento. A terapia ortodôntica usando ligas contendo níquel-titânio, não contribuiu para o aumento significativo dos níveis de níquel no sangue. Apesar de o aparelho ortodôntico sofrer corrosão no meio bucal, a quantidade de níquel e cromo liberada e presente no sangue é inferior aos níveis absorvidos a partir da dieta normal.

BISHARA⁹, 1995, descreve o caso de uma menina de 12 anos de idade submetida a uma terapia ortodôntica completa com contenção fixa inferior de canino a canino e placa de Hawley superior. Conforme relata o autor, as contenções fixas ou removíveis são freqüentemente usadas para estabilizar os casos tratados ortodônticamente e devido às interferências oclusais com os fios, o arco vestibular dessas contenções é muitas vezes estendido distalmente e soldado nos grampos de retenção dos primeiros molares. E, é sabido, que essas soldas podem provocar dermatites de contato. Sendo assim, três meses após a adaptação, a paciente apresentava irritação nas bochechas. Os exames relacionaram as soldas que unem os grampos de retenção aos arcos vestibulares, com as lesões, uma vez que as soldas mostraram aspereza e corrosão. A paciente foi orientada a não usar a contenção por alguns dias e com isso apresentou, após uma semana, melhora considerável. Entretanto três semanas de uso após a interrupção, os mesmos sintomas reapareceram. Uma nova contenção sem soldas foi feita, e um acompanhamento durante nove meses de uso, mostrou que não houve nenhum problema. A paciente não tinha história clínica de sensibilidade e não foi possível identificar qual componente da solda causou a irritação. No entanto, o autor alerta que aparelhos

ortodônticos podem causar reações alérgicas na cavidade bucal e que os testes de sensibilidade não devem ser feitos indiscriminadamente, porque podem induzir reações de hipersensibilidade.

Recentemente, WICHELHAUS *et al.*⁶⁷, 1997, analisaram através da microscopia eletrônica de varredura vários tipos de braquetes, fios, bandas e arcos de aparelhos extra bucais, em relação à composição química, natureza da superfície e percentagem de níquel. Concluíram que existem diferenças consideráveis em relação aos elementos das ligas e a sua superfície, especialmente quando foram analisadas as bandas e braquetes feitos de aço. O revestimento da superfície difere de fabricante para fabricante. A presença de porosidades e gretas nos materiais pode favorecer o processo corrosivo. Esses autores ressaltaram que é importante reconsiderar o processo de reciclagem de bandas e braquetes, pois esse processo pode alterar a microestrutura do braquete. Os mesmos autores observaram também que o revestimento da superfície com nitrito de titânio, com finalidade de reduzir a proporção de níquel, pode ser efetiva.

PLATT *et al.*⁵⁵, 1997, compararam o processo de corrosão das ligas de aço inoxidável 2205 com as ligas 316L, através de testes de corrosão por polarização eletroquímica e por imersão. Esses autores afirmaram que a liga de aço inoxidável “2205 duplex” é um material com qualidades potenciais para fabricação de braquetes ortodônticos, por ter uma baixa concentração de níquel (4 a 6 %) em sua composição, enquanto que as ligas 316 L contêm de 10 a 14% de níquel e estas ligas são mais usadas para fabricação de braquetes. Esses mesmos autores submeteram ambas as ligas a testes de corrosão por polarização eletroquímica e por imersão em solução de 0,9% de cloreto de sódio a 37° C, e concluíram que as ligas de aço inoxidável 2205

foram mais resistentes à corrosão que as ligas 316 L, indicando seu emprego na fabricação dos braquetes usados em aparatologia associada a fios de aço e titânio. Concluíram ainda que o uso das ligas 2205 poderia diminuir a exposição aos produtos de corrosão, minimizando os problemas alérgicos dos pacientes sensíveis ao níquel durante o tratamento ortodôntico.

2.2- TESTES DE SENSIBILIDADE CUTÂNEA (*Patch Tests*)

FISHER & SHAPIRO²², 1956, mostraram que o níquel era a causa de dermatites em 198 pacientes acompanhados por mais de 5 anos. Esses indivíduos invariavelmente reagiram positivamente ao teste de sensibilidade cutânea, com solução de sulfato de níquel a 10%, e somente a parafenilendiamina causou reações positivas severas maiores do que o níquel. O sulfato de níquel foi indicado como a solução de preferência para o uso de rotina na avaliação da sensibilidade ao níquel. Quarenta pacientes foram acompanhados pela reação ao níquel e somente quatro deles apresentaram perda de sensibilidade. Esses autores verificaram também que as reações eram mais comuns na orelha e pulsos, devido ao uso freqüente de brincos e pulseiras respectivamente.

MARCUSSEN⁴³, 1959, relacionou a especificidade da reação ao sulfato de níquel a 5%, com o desenvolvimento de manifestações clínicas, em 718 pacientes

adultos. Esse autor afirmou que a segurança do teste de sensibilidade cutânea dificilmente seria alterada pela concentração, visto que as reações mais fortes só constituem 1,3%, as fracas 5,7%, das quais 3,1% são provenientes de dermatites de contato pelo níquel. Reações falso-negativas foram encontradas em 3% dos indivíduos e reações falso-positivas constituíram 13,4%, mas 1/5 delas se tornaram positivas quando foram realizados novos testes vários anos depois. Provavelmente, essas reações positivas indicavam um estado de alergia latente ou avaliação clínica equivocada. Quando os testes de sensibilidade cutânea foram repetidos, após longos períodos, a maioria das reações positivas diagnosticadas clinicamente eram confirmadas. Entretanto, 1/5 das reações positivas, não comprovadas clinicamente, haviam negativado. As reações falso-positivas eram identificadas em casos de dermatites de contato causadas por outras substâncias e que a sensibilidade latente foi observada em mais de 4 por 10.000 casos. O autor concluiu que na prática, em cada 10 reações positivas com os testes de sensibilidade cutânea ao sulfato de níquel a 5%, nove indicavam sensibilidade ao níquel.

PELTONEN⁵⁴, 1979, propôs um estudo para avaliar a incidência da sensibilidade ao níquel, em uma população acima de 10 anos, através do teste de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel a 5%. Esse estudo foi realizado em cinco grupos constituídos de pacientes jovens, estudantes de medicina, trabalhadores de gráfica e pacientes mais velhos, acima de 60 anos. Esse autor constatou sensibilidade ao níquel em 44 casos (4,5%) dos 980 indivíduos testados, entre os quais 8% eram do sexo feminino e 0,8% do sexo masculino. Verificou também que 42 dos 44 que eram sensíveis ao níquel tinham história de dermatites de contato a metais.

Com o objetivo de avaliar a prevalência de alguns alérgenos, PRYSTOWSKY *et al.*⁵⁶, 1979, realizaram um estudo em 1158 adultos voluntários utilizando o teste de sensibilidade cutânea e história prévia de exposição a quatro alérgenos. Esses autores verificaram uma maior prevalência de indivíduos que apresentavam teste de sensibilidade cutânea positivo ao níquel (5,8%), seguido da neomicina (1,1%), etilenodiamina (0,43%) e benzocaína (0,17%). A maior prevalência de reações positivas ocorreu no sexo feminino (9%) quando comparada com o sexo masculino (0,9%). Os mesmos autores concluíram também que houve uma forte correlação entre os indivíduos sensíveis ao níquel com história de uso de brincos, erupções cutâneas nos lóbulos auriculares e erupções cutâneas provenientes do uso de jóias.

SHELLEY⁵⁷, em 1981, relata o caso de um paciente negro de 14 anos de idade que apresentou hiperplasia gengival vários meses após a colocação de braquetes. O paciente apresentava boa saúde, não tinha história de epilepsia, não fazia uso de medicação controlada, não havia mudança em seu creme dental ou hábito de escovação que pudesse causar uma hiperplasia gengival. Porém, tinha tido uma branda dermatite tópica. O exame clínico revelou alargamento difuso na gengiva superior e inferior por lingual e vestibular, consistência firme e sem comprometimento do palato e não havia cáries ou formações de placas que justificassem a hiperplasia. Os resultados do teste de sensibilidade cutânea específico foram negativos e não havia indicações de má nutrição ou retardo no crescimento. Dois meses após a remoção do aparelho, todo o tecido gengival retornou ao estado normal. A hiperplasia gengival, segundo o autor, pode ser devido a diferentes fatores, como característica familiar-idiopática, mudanças hormonais - puberdade e gravidez, estado nutricional - escorbuto, neoplasias - leucemia e linfoma, mudanças

hematológicas - Trombocitopenia. Além disso, o uso de aparelhos ortodônticos, dispositivos protéticos, o uso de antiepiléticos e contraceptivos, podem causar hiperplasia gengival.

VEIEN *et al.*⁶³, 1982, estudaram 168 crianças, numa faixa etária média de 14 anos, utilizando testes de sensibilidade cutânea, fazendo acompanhamento por um período de 5 anos. Da amostra citada, 77 crianças apresentaram uma ou mais reações positivas a alguns alérgenos. Resultados relevantes foram encontrados em 80% delas. Oito meninos e vinte e quatro meninas manifestaram alergia ao níquel, o que comprovou ser este o alergênico mais comum. Esses autores ainda encontraram na amostra estudada, cinco meninos e seis meninas que apresentaram reações ao cromo e ainda cinco meninos e quatro meninas que reagiram a outras substâncias químicas.

FRANZ²³, 1982, verificou um aumento de casos de alergia a materiais dentários, através de um levantamento incluindo 1.134 dentistas e 82 dermatologistas. Os resultados obtidos revelaram dentre os dentistas, 474 supostos casos de alergias, mas apenas 134 deles foram confirmados como alérgicos. No levantamento que incluía os dermatologistas, foram identificados 434 casos com suspeita de alergia, porém apenas 109 foram positivos. O material dentário mais freqüente em causar alergia em ambas as amostras foi do grupo metálico cobalto-cromo-níquel, sendo que as reações de maior grau de positividade estavam relacionadas com o níquel.

MOFFA *et al.*⁴⁹, 1983, realizaram um estudo para avaliar a incidência da sensibilidade ao níquel e cromo em pacientes odontológicos e determinar se haveria uma relação entre essa incidência e o uso de próteses dentárias que continham esses metais em suas ligas. Testes de sensibilidade cutânea foram realizados, utilizando 2,5% de sulfato de níquel e 0,5% de dicromato de potássio. Exames clínicos bucais e

história da saúde geral foram consideradas. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram uma diferença significativa entre pacientes femininos e masculinos. O risco relativo da sensibilidade do sexo feminino ao níquel, numa faixa etária de 25 a 44 anos, foi 4,8 vezes maior do que outros grupos de idade e houve uma correlação positiva muito significativa com os pacientes que faziam uso de brincos. Nessa faixa etária, 9,8% dos pacientes sensíveis ao níquel eram do sexo feminino, comparado com 0,8% do sexo masculino. Nenhuma correlação foi encontrada entre a sensibilidade do níquel e cromo com o uso de próteses contendo esses metais.

KALKWARF³⁶, 1984, relatou o caso de uma paciente do sexo feminino de 36 anos, que apresentava clinicamente tecidos gengivais inflamados e hiperplasiados adjacentes aos incisivos e caninos superiores. A história clínica da paciente revelava a colocação de coroas de *venner* em porcelana fundidas em metal e bem adaptadas seis meses atrás. A paciente apresentava boa saúde geral, porém relatou ser alérgica a alguns medicamentos. Foram feitos exames hematológicos e biópsia da gengiva, devido ao rápido agravamento da hiperplasia e os resultados hematológicos estavam dentro dos limites de normalidade, enquanto que a avaliação histológica do tecido indicou hiperplasia gengival crônica. Foi realizada uma análise da composição das coroas que demonstrou a presença de ligas de níquel-cromo-cobalto. A paciente se submeteu ao teste de sensibilidade cutânea, cujo resultado positivo confirmou a alergia ao níquel. As coroas foram substituídas por fundições a ouro e observações clínicas subsequentes revelaram um tecido gengival saudável.

BLANCO-DALMAU *et al.*¹¹, 1984, estudaram um grupo de 403 indivíduos, sendo 121 homens e 282 mulheres, através do teste de sensibilidade cutânea utilizando o sulfato de níquel a 5%. Esses autores concluíram que 28% da amostra estudada

apresentou resultado positivo ao teste, havendo diferença significativa entre os sexos. Os mesmos autores verificaram ainda que 31,9% do sexo feminino e 20,7% do masculino manifestaram reações positivas ao teste, e que não houve relação entre idade e hipersensibilidade ao níquel, entretanto observaram uma correlação positiva entre história prévia de alergias com a hipersensibilidade ao níquel.

FISHER²¹, 1985, relatou diversos casos de alergia em bebês a alérgenos variados, incluindo o níquel. Esse autor descreveu o caso de um bebê do sexo feminino, com duas semanas de vida, que teve os lóbulos auriculares perfurados para uso de brincos metálicos e duas semanas depois apresentou eczemas bilaterais. Os brincos foram analisados quimicamente e a presença de níquel foi constatada. Segundo o autor, o bebê apresentou reação positiva ao teste de sensibilidade cutânea ao níquel a 2,5%. Entretanto, os pais apresentaram resultados negativos ao teste com uma solução a 10%.

VEIEN *et al.*⁶⁴, 1985, avaliaram por um período de cinco anos, 61 pacientes com teste de sensibilidade cutânea negativo ao níquel, que apresentavam dermatites após o estímulo com uma dieta diária com 2,5 mg de níquel e 143 pacientes com teste de sensibilidade cutânea positivo ao níquel que não foram estimulados oralmente e submetidos a uma dieta controlada para evitar a ingestão de níquel durante um mês. Depois de 1 a 2 meses de dieta, as dermatites de 121 dos 204 pacientes haviam desaparecido ou visivelmente melhorado. Dos originais 204 pacientes, 88 pacientes sentiram que a dieta de “baixo níquel” proposta pelos pesquisadores melhorou ou eliminou suas dermatites.

ANGELINI *et al.*², 1986, coletaram informações epidemiológicas e clínicas de casos de dermatites de contato ao níquel durante o período de 1967 a 1982. Os autores

avaliaram o início da reação alérgica, a frequência durante o período de exames, locais propensos para desenvolvimento da alergia ao níquel, relação entre profissão e atividades extra profissionais e aspectos clínicos. Foram selecionados 859 entre 7070 pacientes, dos quais 697 (81,1%) eram do sexo feminino e 162 (12,1%) do masculino, numa faixa etária de 2 a 62 anos. Foram realizados testes de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel que revelaram que 12,1% dos indivíduos eram alérgicos ao níquel. Segundo os autores, as manifestações alérgicas ao níquel eram mais comuns no pescoço (28,2%), lóbulo auricular (24,3%), pulso (23,5%) e palma da mão (15,1%). As dermatites eritemato-papulo-vesicular predominaram em 61% dos casos quando avaliados os aspectos clínicos.

JONES *et al.*³⁵, 1986, avaliaram a incidência de hipersensibilidade ao níquel por meio de teste de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel a 5%, em 100 pacientes, sendo 50 do sexo feminino e 50 do sexo masculino. Esses autores estudaram a relação do sexo, idade, e história prévia de alergia a jóias com a hipersensibilidade ao níquel, e ainda determinaram se a urticária e dermatite nas mãos, pescoço ou olhos eram manifestações alérgicas ao níquel. E finalmente, determinaram se havia mudanças na pressão sangüínea, pulso ou temperatura naqueles pacientes com hipersensibilidade. E numa segunda etapa do estudo, os autores observaram se indivíduos com teste de sensibilidade cutânea positivo ao níquel e usando prótese removível contendo ligas com níquel, apresentariam alguma manifestação no local de contato ou em locais mais distantes. Os resultados mostraram uma incidência de sensibilidade ao níquel de 20% no sexo feminino e 1% no masculino. A média de idade em indivíduos sensíveis ao teste foi de 33 anos e vinte e uma mulheres mostraram reação alérgica a jóias. Dessas pacientes, 48% apresentava teste de

sensibilidade cutânea positivo ao níquel. Com relação às medidas de pressão sanguínea, pulso ou temperatura bucal durante o teste, não houve variações significativas. E o uso de prótese dental com ligas de níquel não alterou o resultado do teste de sensibilidade cutânea.

Estudando 700 crianças com idades variando de 5 a 12 anos, FEASBY *et al.*²⁰, 1988, distribuíram as crianças em dois grupos. O primeiro grupo usava aparelhos intra bucais como arco lingual, mantenedores de espaço e aparelhos ortodônticos com molas e grampos, que contêm níquel em suas composições. Para o segundo grupo, denominado controle, foram selecionadas crianças que não usavam aparelhos intra bucais nem tinham história de uso anterior de aparelhos ortodônticos. Foram feitos testes de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel a 2,5% em todas as crianças e as leituras dos testes foram realizadas após 48 horas. Esses autores concluíram que 8,1% das crianças apresentou reação positiva ao teste, indivíduos do sexo feminino que usavam brincos apresentaram uma taxa alta de reação positiva, enquanto que crianças com acessórios ortodônticos intra bucais que contêm níquel, apresentaram taxas mais altas. Resultados positivos ao teste de sensibilidade cutânea não aumentaram significativamente com o tempo maior de exposição aos aparelhos e, finalmente, crianças com oito anos ou mais, que possuíam antigas coroas de níquel-cromo (72% de níquel) apresentaram uma taxa positiva significativamente mais alta.

Com o objetivo de estudar a natureza e freqüência de reações adversas a materiais ortodônticos e procedimentos entre os ortodontistas e seus pacientes, JACOBSEN & HENSTEN-PETTERSEN³³, 1989, aplicaram um questionário a 75% dos ortodontistas membros da Sociedade Norueguesa de Ortodontia e relataram que 50% deles tinha alguma experiência pessoal com reações adversas a materiais. A

maioria dos problemas eram dermatoses, áreas ressecadas, isquemias, redução de sensibilidade ao tato, fissuras, coceiras, escamações e dores nas mãos e dedos. Os ortodontistas haviam observado 425 pacientes com reações dérmicas, e 67 com reações intra bucais/reações sistêmicas, indicando uma prevalência de cerca de 1%. As reações dermatológicas incluíram vermelhidão, eczemas, coceiras e fissuras na face, pescoço ou áreas peribucais, muitas vezes atribuídas às partes metálicas dos aparelhos extra bucais. As reações intra bucais consistiam de vermelhidão, irritações e inchaço na mucosa bucal, gengiva e/ou lábios e estavam associadas aos braquetes de metal, arcos vestibulares, procedimentos de colagem ou aparelhos de acrílico.

BASS *et al.*⁶, 1993, relataram que atualmente são fabricados vários fios mais resilientes de ligas níquel-titânio que contêm níquel bastante para provocar manifestações alérgicas na cavidade bucal. Afirmaram também que as ligas dos aparelhos convencionais de aço inoxidável contêm 8% de níquel, enquanto que na atualidade as ligas níquel-titânio contêm cerca de 70% de níquel, e sendo assim um número maior de reações alérgicas tem sido observado. A proposta desses autores nesse trabalho foi de determinar a prevalência de sensibilidade ao níquel num grupo de pacientes submetidos a tratamento ortodôntico, de avaliar se a terapia ortodôntica convencional pode sensibilizar os pacientes ao níquel e verificar as manifestações gengivais provenientes do níquel contido nos aparelhos ortodônticos em pacientes sensíveis ao níquel antes do tratamento ortodôntico. Esses autores estudaram 29 pacientes na faixa etária de 12 a 48 anos, sendo 18 do sexo feminino e 11 do masculino. Todos os pacientes foram submetidos ao teste de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel a 5%, e cinco pacientes do sexo feminino apresentaram respostas positivas ao teste. As cinco pacientes foram acompanhadas mensalmente por fotografias intra

buciais, exames clínicos gengivais e controle de placas. Nesse estudo os autores concluíram que a prevalência da alergia ao níquel foi alta nas mulheres (28%), o níquel contido nos aparelhos ortodônticos teve pouco ou nenhum efeito sobre a gengiva ou saúde bucal dos pacientes, mas que o tratamento ortodôntico pode induzir à hipersensibilidade ao níquel, já que dois dos pacientes que eram negativos ao teste de sensibilidade cutânea passaram a responder positivamente durante a terapia ortodôntica com aparelhos metálicos fixos.

Em estudos recentes KEROSUO *et al.*³⁷, 1996, avaliaram a freqüência de hipersensibilidade ao níquel em adolescentes em relação ao início, duração e tipo de tratamento ortodôntico, sexo e a idade em que começaram a usar brincos. Foram estudados 700 adolescentes numa faixa etária de 14 a 18 anos em que 176 tinham usado aparelhos ortodônticos metálicos. Esses autores realizaram testes de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel a 5% e obtiveram a história alérgica do paciente por um questionário. Os autores encontraram uma freqüência em todo grupo de 19% em que 30% das meninas e 3% dos meninos apresentaram reações ao níquel. Somente seis indivíduos (2%) que não usavam brincos foram sensíveis ao níquel e, no entanto, 126 (31%) daqueles que usavam brincos se mostraram hipersensíveis. O tratamento ortodôntico não pareceu afetar a prevalência de indivíduos com sensibilidade ao níquel. Nenhuma das garotas que foram tratadas com aparelhos ortodônticos fixos, antes de usar brincos, mostrou hipersensibilidade ao níquel. Entretanto, 35% dos que tinham experimentado o uso de brincos antes do tratamento ortodôntico foi sensível ao teste. Conforme os resultados encontrados, os mesmos autores sugerem que o tratamento ortodôntico não aumenta o risco de hipersensibilidade ao níquel. Ao contrário, os dados indicam que o tratamento

ortodôntico com aparelhos metálicos contendo níquel antes da sensibilização pelo uso de brincos, deve reduzir a freqüência de hipersensibilidade.

KEROSUO *et al.*³⁸, 1997, relatam um caso de uma paciente de 27 anos do sexo feminino em tratamento ortodôntico usando aparelho extra bucal cervical. A paciente apresentava ao exame clínico uma área eritematosa vesicular, com uma lesão de cada lado do pescoço, correspondendo em tamanho e localização com as partes metálicas da tala do aparelho extra bucal. A história clínica revelava alergia a brincos que não fossem de ouro. Após diagnóstico, foi indicada a remoção do aparelho extra bucal e quinze dias após, a paciente retornou sem nenhum sinal de reação alérgica.

LENZA *et al.*³⁹, 1997, estudaram um grupo de 42 indivíduos, sendo 22 do sexo feminino e 20 do masculino, numa faixa etária de 10 a 18 anos, sem história de hipersensibilidade ao níquel, com o objetivo de verificar se baixos níveis de níquel, liberados pela corrosão de aparelhos ortodônticos, seriam suficientes para a sensibilização desses pacientes. Um grupo de pacientes foi tratado ortodonticamente utilizando fios que não continham níquel. Os indivíduos do outro grupo foram tratados com fios contendo alta concentração de níquel e o terceiro grupo, denominado controle, não foi submetido a nenhum tratamento ortodôntico. Segundo os mesmos autores, todos os indivíduos realizaram testes de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel a 5%, antes da colocação do aparelho e após um período de nivelamento de 3 a 4 meses. Baseados nos resultados, os autores afirmaram que no início do estudo, nenhum dos indivíduos testados responderam positivamente ao teste de sensibilidade cutânea. Entretanto, ao final do experimento, dos 42 indivíduos estudados, 2 do sexo feminino e 1 do masculino (7% da amostra) desenvolveram reações alérgicas ao níquel. Esses três pacientes foram tratados com fios níquel-titânio

contendo altas concentrações de níquel. Os autores concluíram que o uso intra bucal de fios com alto teor de níquel durante o tratamento ortodôntico, pode induzir hipersensibilidade a esse metal em alguns indivíduos e que pacientes que já apresentavam hipersensibilidade ao níquel, não devem ser expostos aos fios com alta concentração desse metal, durante o tratamento ortodôntico.

DIÓGENES *et al.*¹⁶, 1997, avaliaram a ocorrência de dermatites por níquel num país tropical, sua distribuição entre os sexos e determinação da topografia anatômica mais acometida. Fizeram um estudo por dois anos em 404 indivíduos que tinham dermatite de contato como hipótese clínica e que foram submetidos ao teste de sensibilidade cutânea. Os testes foram aplicados nas costas dos pacientes e leituras foram realizadas após 48 e 96 horas para determinar o grau de reação. Os resultados mostraram que a ocorrência de sensibilização ao níquel foi de 19,8%, dos quais 88% eram mulheres e o restante, 11,2% eram homens. As lesões localizavam-se predominantemente nas mãos, antebraços, lóbulos auriculares e pés. Esses autores comentaram sobre possíveis variações na ocorrência de dermatites de contato por níquel nas áreas rurais e/ou nos países tropicais.

JANSON *et al.*³⁴, 1998, com o objetivo de determinar a prevalência de hipersensibilidade ao níquel em indivíduos jovens, antes, durante e depois do tratamento ortodôntico, analisaram 170 pacientes que após exame clínico foram submetidos ao teste de sensibilidade cutânea utilizando sulfato de níquel a 5%. Os autores concluíram que a prevalência das reações de hipersensibilidade ao níquel foi semelhante nos indivíduos antes, durante e depois do tratamento ortodôntico com aparelho fixo convencional; que o tratamento ortodôntico com ligas convencionais de aço inoxidável não induz a reações de hipersensibilidade ao níquel; que as mulheres

apresentaram uma freqüência 4 vezes maior que os homens, e que houve uma associação entre a história pessoal de reações alérgicas a metais e uso de objetos metálicos em contato com a pele com a hipersensibilidade ao níquel.

2.3 – TESTE DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS (LTT)

ASPEGREN & RORSMAN³, 1962, estudaram 15 pacientes do sexo feminino, na faixa etária de 23 a 57 anos, com história de eczemas devido a dermatites de contato pelo níquel e que apresentavam resposta altamente positiva ao teste de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel a 5% em solução aquosa. Com intenção de avaliar a ocorrência de mitoses em leucócitos de indivíduos normais e em indivíduos com hipersensibilidade ao níquel, esses autores utilizaram culturas de curta duração na presença de diversas concentrações de níquel. Os resultados mostraram que os leucócitos dos indivíduos normais e dos indivíduos hipersensíveis ao níquel não apresentaram níveis elevados de mitoses, quando se utilizou uma alta concentração de níquel, ou seja, 1 mM. Esses mesmos autores verificaram que a proliferação celular ocorria em 1 de cada 5 indivíduos normais e em 2 de cada 5 indivíduos hipersensíveis, na concentração de 0,3 mM de níquel. No entanto, na concentração de 0,1mM de níquel, as mitoses ocorriam regularmente, e nessa concentração, o níquel era capaz de causar reações quando aplicado intracutaneamente em 4 de 12 pacientes hipersensíveis.

Segundo BACH & HIRSCHHORN⁴, 1964, o teste de proliferação de linfócitos T *in vitro*, foi o mais adequado para avaliar a estimulação celular por antígenos do que o teste de sensibilidade cutânea, uma vez que as reações cruzadas podem ocorrer com maior frequência nos testes cutâneos.

Através de estudos autoradiográficos e morfológicos, PAPPAS *et al.*⁵², 1970, demonstraram que o acetato de níquel é um potente estimulador de linfócitos do sangue periférico *in vitro*. Nesse estudo foi coletado sangue de 3 pacientes com alergia generalizada, apresentando eczemas de contato e hipersensibilidade ao níquel e de 8 doadores normais. Os resultados desse trabalho mostraram que a resposta de transformação de linfócitos foi aproximadamente a mesma nos dois grupos de pacientes estudados. Os autores concluíram que provavelmente o efeito dos íons metálicos na proliferação de linfócitos não é específico e, portanto, deve ser considerado quando se pretende utilizar um ensaio de proliferação de linfócitos T como indicador de hipersensibilidade tardia *in vitro*.

HUTCHINSON *et al.*³², 1972, realizaram o ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro* em 8 pacientes, na faixa etária de 17 a 66 anos, todos do sexo feminino, com evidências clínicas de dermatite de contato devido ao níquel e com teste de sensibilidade cutânea positivo e, como grupo controle, 7 indivíduos também do sexo feminino, que não apresentavam quadro de alergia. Nos ensaios, foram utilizados como antígeno o sulfato de níquel e o acetato de níquel nas concentrações de 10^{-4} mEq Ni/ml. Os resultados indicaram maior proliferação de linfócitos nos indivíduos com sensibilidade ao níquel. Nenhum dos sais utilizados nesse experimento foi capaz de estimular inespecificamente a proliferação de linfócitos.

MILLIKAN *et al.*⁴⁶, 1973, avaliaram a resposta de proliferação de linfócitos T *in vitro* em 8 pacientes com história clínica de hipersensibilidade ao níquel e teste de sensibilidade cutânea positivo. Esses autores verificaram que a resposta de linfócitos *in vitro* correlacionou com os resultados do teste de sensibilidade cutânea em indivíduos sensíveis ao níquel, quando utilizaram concentrações de 40 a 120 μg de cloreto de níquel por cultura (4 ml).

GIMENEZ-CAMARASA *et al.*²⁵, 1975, avaliaram através do ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro*, um grupo de 25 pacientes com manifestações clínicas de hipersensibilidade ao níquel e teste de sensibilidade cutânea positivo e um grupo controle de 10 indivíduos sem história de eczemas e com teste de sensibilidade cutânea negativo ao sulfato de níquel. Diluições seriadas de sulfato de níquel foram utilizadas nas culturas de linfócitos. Esses autores verificaram que nenhum dos indivíduos do grupo controle apresentou um resultado positivo para o ensaio de proliferação de linfócitos. Por outro lado, linfócitos de 14 pacientes estimulados pelo sulfato de níquel nas concentrações de 0,13 mM e 0,065 mM apresentaram alta incorporação de timidina. Já os linfócitos de onze pacientes apresentaram maior incorporação de timidina, na presença de concentrações baixas de sulfato de níquel.

Com o objetivo de avaliar as condições do ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro* como método para diagnóstico de hipersensibilidade ao níquel, SVEJGAARD *et al.*⁶¹, 1978, estudaram 8 pacientes com dermatite de contato e teste de sensibilidade cutânea positiva ao níquel; 7 pacientes com dermatite de contato devido a outros fatores e negativo ao teste de sensibilidade cutânea, e ainda 9 indivíduos, dois quais 7 sofriam de desordens dermatológicas. Nesses ensaios, foi utilizado o sulfato de níquel

em várias concentrações. Os resultados mostraram que com exceção de um, todos os outros pacientes apresentaram significativa resposta ao níquel, enquanto pacientes do grupo controle apresentaram respostas inferiores. Segundo os mesmos autores, esses resultados indicaram que a hipersensibilidade ao níquel pode ser diagnosticada *in vitro*. Afirmaram ainda que o teste de proliferação de linfócitos é de grande importância nos casos de dermatite de contato aguda, onde o teste de sensibilidade cutânea é impossível ou desaconselhável, em razão das severas reações que esse teste pode desencadear. Alguns indivíduos, com teste de sensibilidade cutânea negativo ao níquel, responderam ao teste de proliferação de linfócitos T, indicando que além de agir como um antígeno específico, o sulfato de níquel pode apresentar propriedades mitogênicas não específicas.

A resposta de proliferação celular de 34 pacientes na faixa etária de 16 a 64 anos, com dermatite de contato ao níquel foi avaliada por SILVENNOINEN-KASSINEN⁵⁸, 1980, utilizando sulfato de níquel (NiSO₄), tuberculina (PPD), fitohemaglutinina - P, mitógeno de trigo e concanavalina A. Quarenta e nove pacientes com idades de 20 a 54 anos foram selecionados para o grupo controle. Esse autor verificou que a estimulação de linfócitos com sulfato de níquel era significativamente elevada nos pacientes alérgicos, enquanto que a estimulação pela tuberculina estava diminuída. A resposta para os outros mitógenos não foi significativamente diferente entre o grupo controle e os pacientes alérgicos. Segundo esse mesmo autor, a estimulação de linfócitos pelo sulfato de níquel deve requerer a participação dos macrófagos.

AL-TAWIL *et al.*¹, 1981, realizaram experimentos *in vitro* com o sulfato de níquel, com o objetivo de verificar se o teste de síntese de DNA poderia ser usado para

diagnóstico de alergia ao níquel *in vitro*. Dezesseis pacientes, com teste de sensibilidade cutânea positivo ao sulfato de níquel, numa faixa etária de 25 a 63 anos foram selecionados, e quinze eram do sexo feminino. Os linfócitos de dezoito pacientes, considerados grupo controle, também foram testados. A resposta de proliferação dos linfócitos de todos os pacientes foi significativa em relação ao grupo controle, que também respondeu, não especificamente, ao teste quando se aplicavam altas concentrações de sulfato de níquel. Os linfócitos provenientes dos cordões umbilicais de 4 recém-nascidos também foram testados e ativados por sulfato de níquel, confirmando o fato de que o sulfato de níquel pode ser um mitógeno fraco, dependendo das concentrações utilizadas. Segundo esses autores, o ensaio de proliferação de linfócitos *in vitro* parece ser um método adequado para avaliar os resultados falso-positivos ou falso-negativos, quando se aplica o teste de sensibilidade cutânea.

SILVENNOINEN-KASSINEN⁵⁹, 1981, realizou o ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro* estimulados pelo sulfato de níquel e tuberculina *in vitro* em dez famílias com um ou mais integrantes com dermatite de contato devido ao níquel. Alguns membros saudáveis da mesma família não apresentavam reações ao níquel *in vitro* e as respostas encontradas nesses indivíduos foram significativamente mais baixas do que nos indivíduos alérgicos. Nas famílias estudadas, os indivíduos atópicos não tiveram reações alérgicas maiores que os indivíduos não atópicos. Sendo assim, as reações *in vitro* ao níquel não estão relacionadas com atopia. Isso está confirmado pelo fato de que a percentagem de indivíduos atópicos (19%) nessas famílias não é mais alta que a percentagem da população em geral. Estes resultados indicaram que o ensaio de proliferação de linfócitos T estimulados por níquel *in vitro* correlacionava

com os dados clínicos de alergia ao níquel em 90% dos pacientes que apresentavam dermatite de contato ao níquel.

Um estudo comparativo *in vivo* foi realizado por VAN LOON *et al.*⁶², 1988, para avaliar a capacidade do níquel de induzir estomatite alérgica por contato, presente em ligas dentárias contendo níquel e metais preciosos não corrosivos. Quinze pacientes que apresentavam reação alérgica ao níquel na pele, foram divididos em 3 grupos (A, B e C). Os quatro pacientes do grupo A utilizaram uma liga tipo A, intra bucal, contendo níquel-cromo resistente à corrosão; os cinco pacientes do grupo B receberam uma liga do tipo B de níquel puro fortemente corrosivo. Uma porção de *paladium* puro, resistente à corrosão, foi colocada no lado contrário ao que foi colocado o níquel. A reatividade da porção de níquel puro foi também testada na pele dos pacientes do grupo C. Exames imunohistológicos da mucosa bucal, nos locais dos testes e controles foram realizados com anticorpos monoclonais dirigidos contra populações de linfócitos T e células de Langerhaus (CL). Os resultados mostraram que, nos sítios com níquel puro, as CL aumentaram significativamente no tecido conjuntivo da mucosa bucal em torno de 4 vezes. Contudo, análise estatística dos seis pacientes do grupo C, juntos não mostrou um aumento correspondente de CL no epitélio daquele sítio com o níquel puro, embora um aumento numérico de CL tenha sido observado no epitélio adjacente à porção de níquel puro em dois pacientes e cujo aumento foi bastante significativo. Esses mesmos autores concluíram, a partir da análise estatística, que tanto a liga controle como a ligas teste pode influenciar no número de linfócitos T supressores/citotóxicos no tecido conjuntivo. Os resultados mostraram também que o níquel puro pode causar uma forte infiltração de linfócitos auxiliares/indutores, especialmente no tecido conjuntivo. Essa infiltração de linfócitos

e células de Langerhans não foi observada nos locais de referência (controle) ou nos locais quando foram utilizadas lâminas contendo níquel nos grupos A e B. Ainda concluíram que, nem clinicamente, nem imunohistologicamente, a presença de alta percentagem de níquel nas ligas dentais, está necessariamente associada com estomatite alérgica de contato em pacientes alérgicos ao níquel.

EVERNESS *et al.*¹⁹, 1990, estudaram 66 indivíduos com teste de sensibilidade cutânea positivo ao sulfato de níquel a 5%, com o objetivo de diferenciar indivíduos sensíveis ao níquel, de indivíduos não sensíveis, utilizando o ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro*. Os resultados mostraram que 61 indivíduos sensíveis, ou seja 92% do total, apresentaram índices significativos de estimulação de linfócitos após 6 e/ou 7 dias de cultura, utilizando concentrações de 5 µg/ml de sulfato de níquel, ao passo que nenhum dos quarenta e três indivíduos do grupo controle apresentou resultado positivo. Os índices de estimulação não foram alterados pelo teste de sensibilidade cutânea realizado nos pacientes antes do teste de proliferação de linfócitos. Uma fraca correlação foi observada entre os resultados de proliferação e o grau da reação no teste de sensibilidade cutânea. Os autores afirmaram que a concentração de 5 µg/ml de sulfato de níquel utilizada no ensaio de proliferação celular não causou efeito mitogênico não específico significativo.

Segundo GRIMSTÓTTIR *et al.*³⁰, 1994, o teste de sensibilidade cutânea que tem sido utilizado na investigação de dermatites de contato, apresenta uma série de desvantagens. Reações falso-negativas e falso-positivas podem ocorrer e o teste pode induzir a reações adversas. Por outro lado, o ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro* tem sido utilizado em casos de dermatites de contato onde o teste de

sensibilidade cutânea foi inadequado para confirmação de diagnóstico de alergia ao níquel e cromo. Esses autores propuseram nesse trabalho avaliar se a quantidade de níquel liberado pela corrosão dos aparelhos ortodônticos metálicos era suficiente para induzir à proliferação de linfócitos T de indivíduos com sensibilidade ao níquel. Os testes de proliferação de linfócitos do sangue periférico de 5 indivíduos com história de dermatite de contato, e de 4 indivíduos positivos ao teste de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel a 5% e também de indivíduos sem história de dermatites de contato, revelaram que o níquel proveniente da corrosão dos aparelhos ortodônticos metálicos estava em quantidade suficiente e natureza química adequada para a estimulação de linfócitos. A concentração de níquel capaz de estimular a proliferação de linfócitos *in vitro* não está bem definida e esses autores acreditam que certos indivíduos apresentem respostas a altas concentrações e outros a baixas concentrações de níquel.

3 - PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Considerando o crescente número de casos de pacientes com reações de hipersensibilidade sob tratamento ortodôntico, nos propusemos a abordar este tema estabelecendo os seguintes objetivos:

- Avaliar comparativamente a resposta de proliferação de linfócitos T ao níquel, proveniente de aparelhos ortodônticos metálicos, de pacientes com manifestações clínicas bucais;
- Avaliar variáveis com relação ao número de células, concentração de níquel, e composição sorológica do meio de cultura utilizados no ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro*;
- Correlacionar os índices de proliferação celular com o teste de sensibilidade cutânea ao níquel, considerando o tempo de exposição ao aparelho ortodôntico, idade e sexo dos pacientes;
- Caracterizar populações de linfócitos T respondedoras ao níquel com relação à produção de citocinas nos sobrenadantes de culturas *in vitro*.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Grupos de indivíduos estudados

O presente estudo incluiu 32 pacientes, com idades entre 11 e 22 anos; média de 15,01 anos, todos em tratamento ortodôntico com aparelho fixo. Foram selecionados sem distinção de sexo, raça ou classe social, e em bom estado geral de saúde. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente após anamnese e divididos em dois grupos. O primeiro, constituído de 23 pacientes, apresentava manifestações bucais tais como hiperplasia gengival, queilite angular, descamação labial (figuras 1, 2 e 3), como também, de um modo geral, história de alergia de contato a metais, particularmente a brincos (figuras 4 e 5), pulseiras e bijuterias.

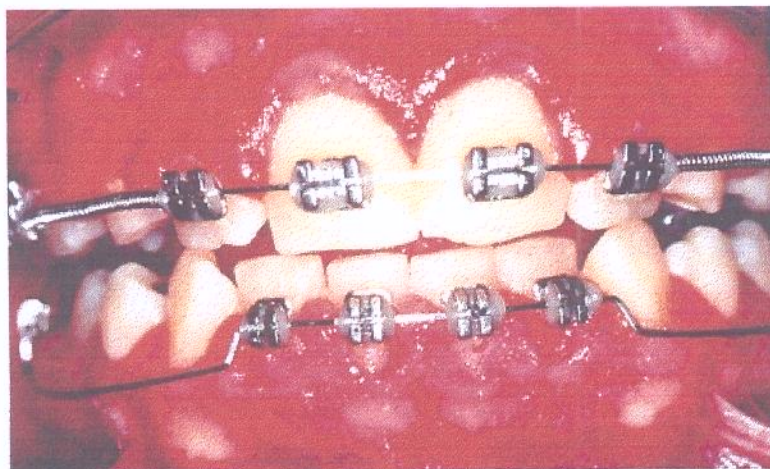


Figura 1 – Hiperplasia gengival em região de incisivos, sugerindo hipersensibilidade ao níquel proveniente da corrosão do aparelho ortodôntico

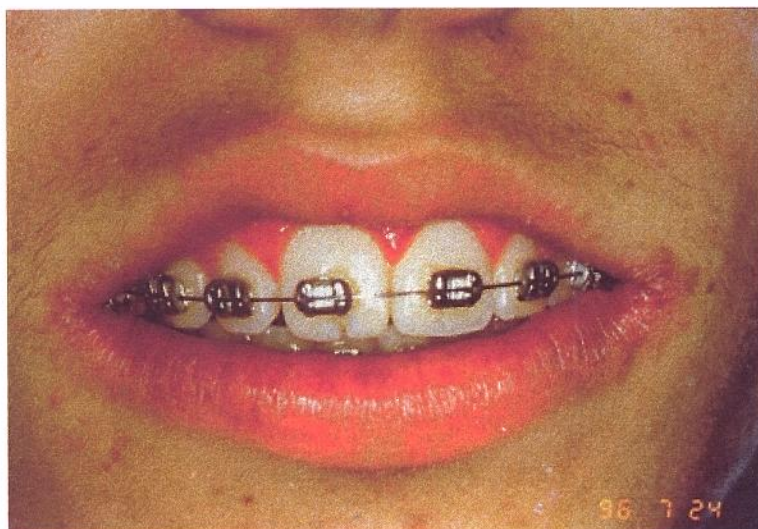


Figura 2 – Queilite angular proveniente da dermatite de contato ao níquel proveniente do aparelho ortodôntico



Figura 3 – Manifestação clínica de sensibilidade ao níquel proveniente do aparelho ortodôntico comprometendo os lábios e áreas adjacentes

O segundo grupo, constituído de 9 pacientes, selecionados para controle, não apresentavam qualquer manifestação clínica bucal nem história de alergia e possuíam boa saúde bucal. Todos os 32 pacientes foram submetidos ao teste de sensibilidade cutânea ao níquel, e os indivíduos selecionados para compor o grupo controle apresentavam resultados negativos ao teste (ANEXO 1).

Conforme exigências do Conselho de Ética em Pesquisa (CEP-FOP/UNICAMP), todos os indivíduos participantes desse estudo foram informados

através de um termo e firmaram acordo por escrito, autorizando sua participação.

Parecer e aprovação do CEP no ANEXO 2.



Figura 4 – Dermatite de contato provocada por uso de brincos



Figura 5 – Hiperplasia gengival e lábios ressecados do mesmo paciente acima sensível ao níquel

4.2 – TESTE DE SENSIBILIDADE CUTÂNEA (*Patch Test*)

O teste foi realizado na parte superior do braço de cada indivíduo (pele normal na região deltóidea), segundo técnica descrita por CARVALHO¹⁴, 1995. Após a limpeza da área com gaze umedecida em álcool para remover possíveis impurezas e desengordurar a pele, o sulfato de níquel a 5%, tendo como veículo vaselina (474 – Sulfato de Níquel 5% - ALERGOFAR – Farmácia de Alergia e Cosméticos LTDA – Rio de Janeiro), foi colocado sobre papel de filtro, aplicado na pele e coberto com uma fita protetora (Micropore hipo-alergênico). Os pacientes foram instruídos a não molhar o braço, evitar exercícios físicos ou coçar a região. A área do teste foi delineada no momento da aplicação com caneta tipo “Pilot”, de forma que qualquer reação positiva tardia pudesse ser precisamente identificada. A fita protetora foi mantida por 48 horas, e a área testada novamente limpa com algodão embebido em álcool para remover resíduos de substâncias, e 20 minutos após a remoção da fita, foi realizada a primeira leitura do teste. As reações foram registradas de acordo com a escala proposta por CARVALHO¹⁴, 1995. Os pacientes foram orientados a expor o local ao sol por 30 minutos, foi realizada uma nova leitura 24 horas após a remoção da fita protetora, ou seja 72 horas após o início do teste. As leituras foram registradas da seguinte forma: a) reação negativa (0) ; b) reação positiva + (eritema) ; c) reação positiva ++ (eritema e pápulas); d) reação positiva +++ (eritema, pápulas e vesículas) e) reação positiva ++++ (eritema, edema e vesículas acentuadas com exsudação) (figuras 6, 7, 8 e 9).

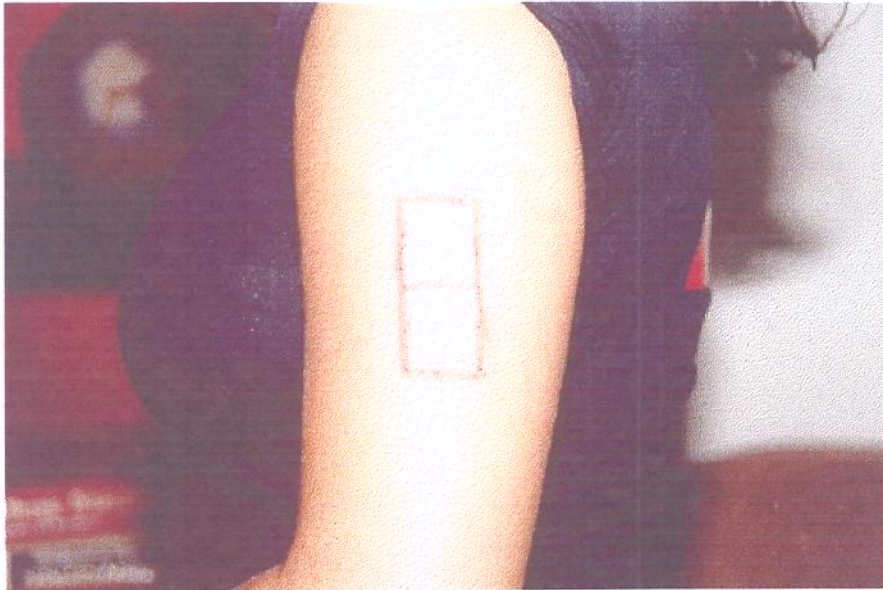


Figura 6 – Reação negativa ao teste de sensibilidade cutânea com NiSO₄



Figura 7 – Reação positiva + ao teste de sensibilidade cutânea com NiSO₄

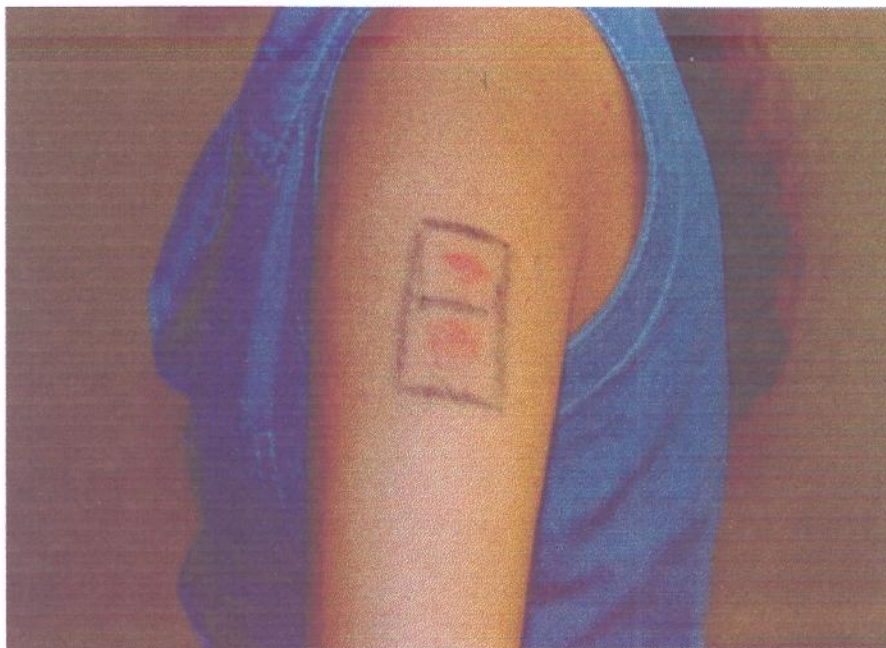


Figura 8 – Reação positiva ++ ao teste de sensibilidade cutânea ao NiSO_4



Figura 9 – Reação positiva +++ ao teste de sensibilidade cutânea com NiSO_4

4.3- Obtenção de Soluções Contendo Níquel Proveniente da Corrosão *in Vitro* de Aparelhos Ortodônticos (Extrato)

Inicialmente, quatro montagens distintas de aparelhos ortodônticos foram mantidas em solução salina para avaliar a corrosão. Em seguida foi realizada a dosagem de níquel contido nessa solução, denominada de extrato, que foi utilizado como agente estimulador nos ensaios de proliferação de linfócitos T *in vitro*.

As montagens foram assim constituídas:

- **Montagem A:** Dez braquetes (Forestadent, slot .018” Small, Germany), duas bandas para molares (Dental Morelli – Ind. Com. de Peças Ortodônticas, SP, Brasil), dois tubos duplos (Dental Morelli, slot .018”) e fio .016”x .016” (Blue Elgiloy – Rock Mountain, CO, USA);
- **Montagem B:** Os mesmos braquetes, tubos e bandas, com fio coaxial 1x6 (Wild Cotwire . 0175”- GAC International, Japan);
- **Montagem C:** Os mesmos braquetes, tubos e bandas, com fio .014” níquel-titânio (.014”*super elastic arches*, Highland Metals, USA);
- **Montagem D:** Mesma montagem anterior, porém reciclados.

As montagens foram mantidas em solução salina 0,85% estéril, durante 7, 30 e 60 dias (Figuras 10a e 10b), em estufa a 37°C. Após centrifugação para remover partículas do processo de corrosão, as soluções foram filtradas (filtros Milipore 0,2 µ de diâmetro), e as dosagens de níquel foram realizadas em espectrofotômetro de Absorção Atômica (HITACHI – Z . 8200 – JAPAN), no laboratório de Química do Instituto de Ciências Exatas – ICEX – Universidade Federal de Minas Gerais.

Os extratos obtidos foram diluídos em RPMI-1640 (GIBCO – BRL, Grand Island, NY - USA), contendo 3% de antibiótico-antimicótico (Solução estoque: 10.000 unidades de penicilina, 10.000 unidades de estreptomicina por mililitro e 25 µg de anfotericina B por mililitro- SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e 1,6% de L – glutamina (Solução estoque : 200 mM, GIBCO) denominado RPMI incompleto, nas concentrações de 5.0, 2.5 e 1.25 µg/ml e utilizadas nos ensaios de proliferação celular.



Figuras 10a e 10b – Quatro diferentes montagens de aparelhos ortodônticos, imersas em solução salina por um período de 7, 30 e 60 dias

4.4- Sulfato de Níquel (NiSO₄)

As soluções de sulfato de níquel (NiSO₄ 6H₂O - SIGMA) foram diluídas em meio de RPMI incompleto descrito acima, e em concentrações de 10.0, 5.0 e 2.5 µg/ml utilizadas nos ensaios de proliferação celular.

4.5 – Preparação do Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado nos ensaios de proliferação com células mononucleares do sangue periférico (PBMC), denominado RPMI completo, foi constituído de 1,6% de L – glutamina (solução estoque : 200 mM. - GIBCO) e 3% de antibiótico-antimicótico (SIGMA Cell Culture Reagents - 10.000 U penicilina, 10.000

U de estreptomicina por ml, 25 µg de anfotericina B por ml) em RPMI – 1640 (GIBCO).

Para a preparação de RPMI completo, foram utilizados soro AB⁺ (Gemini Products, Calabasa, CA-USA) e soro autólogo na concentração de 5%, referidos respectivamente como RPMI – AB⁺ e RPMI – autólogo.

4.6- Coleta de Sangue Periférico dos Pacientes

As amostras de sangue venoso foram coletadas de todos os 32 pacientes em tubos heparinizados, estéreis, a vácuo e descartáveis (VACUTAINER Cell Preparation Tub – CPT, Sterile Interior, net contents per tube: 143 USP Units of Sodium Heparin, Grand Island, NY, USA) em um volume total de 60 ml por paciente para os ensaios de proliferação celular e produção de citocinas.

4.7- Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos pacientes foram separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque, segundo procedimento descrito por GAZZINELLI *et al.*²⁴, 1983. Sobre 15,0 ml de gradiente de Ficoll-Hypaque foram adicionados lentamente pelas paredes de um tubo Falcon (2098 BLUEMAX Sterile, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) sangue periférico, com auxílio de uma pipeta estéril (Figuras 11a e 11b).

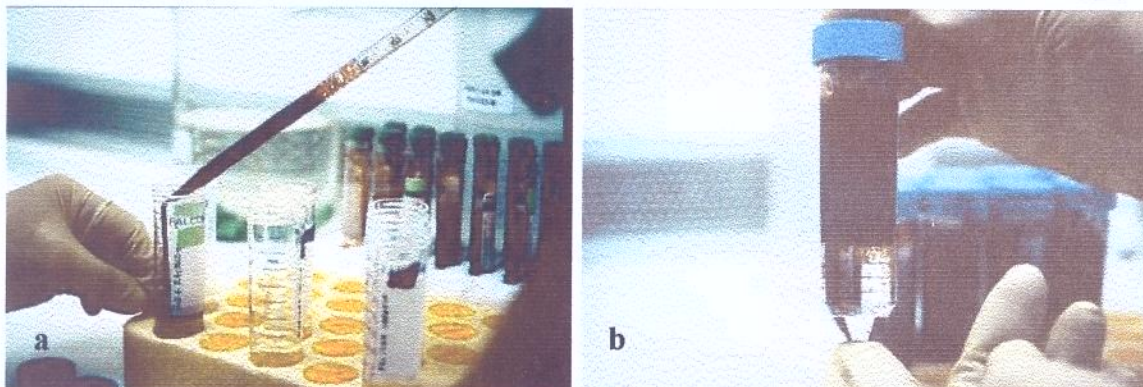


Figura 11a e 11b – Sangue periférico sendo adicionado sobre Ficoll-hypaque e aspecto da solução antes da centrifugação

Em seguida, os tubos foram centrifugados (GS – 6R CENTRIFUGE - BECKMAN, Scientific Instruments Division, Irvine, CA, USA) a 1350 rpm durante 45 minutos a 25° C. Após a centrifugação foi retirado o plasma autólogo e acondicionado para posterior utilização e congelamento. Os anéis formados de células mononucleares (linfócitos e monócitos) (Figura 12) foram então coletados com auxílio de pipetas Pasteur (Thomas laboratory Specialities, Philadelphia, PA, USA) e transferidos para tubos Falcon.

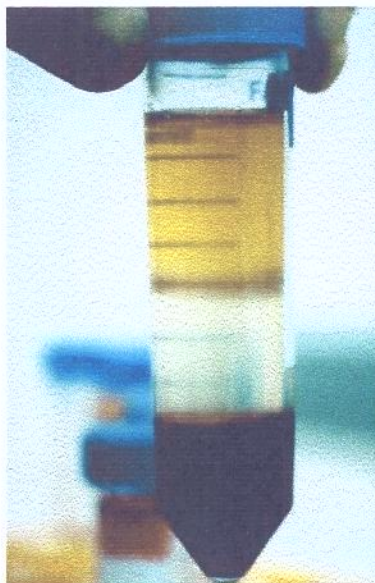


Figura 12 – Destaque da separação do plasma autólogo, anel de PBMC, solução de Ficoll-hypaque e células vermelhas, após centrifugação

As células foram lavadas 3 vezes, sendo a primeira com cerca de 40 ml de MEM (Minimum Essencial Medium, GIBCO, Grand Island, NY, USA) e as outras duas com cerca de 30 ml de MEM. Após centrifugação a 1250 rpm durante 10 minutos a 4° C, as células foram ressuspensas em 2,0 ml de RPMI incompleto (Figura 13).

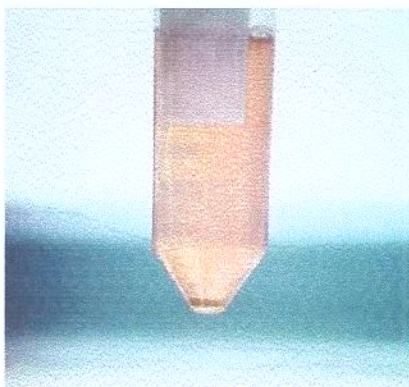


Figura 13 – “Pellet” das PBMC após lavagem e centrifugação

Em seguida, 10µl da suspensão de células foram diluídos em 190 µl de solução de Turk. Após homogeneização, as células foram contadas com o auxílio de um microscópio ótico (OLYMPUS, L 2000 A) em câmara de Neubauer (Figuras 14a e 14b) e sua concentração foi ajustada para obtenção de 10×10^6 células por ml. As células foram utilizadas nas concentrações de $2,0 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ células/poço.

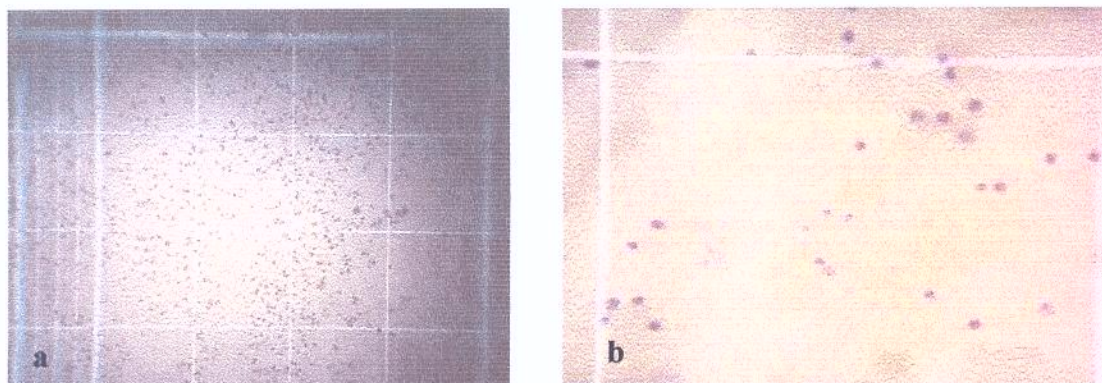


Figura 14a e 14b – Visão microscópica dos linfócitos em câmara de Neubauer, em menor e maior aumento (10 e 40x respectivamente)

4.8- ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR *in vitro* - Blastogênese.

O ensaio de proliferação celular *in vitro* também denominado blastogênese, foi realizado segundo procedimentos descritos por GAZZINELLI *et al.*²⁴, 1983, com algumas modificações aqui descritas. Esse ensaio consiste basicamente na exposição de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos a substâncias antigênicas e/ou haptênicas, com o objetivo de avaliar a proliferação celular causada por tais substâncias. Nesse estudo, o níquel proveniente da corrosão de aparelhos ortodônticos e o níquel presente em soluções de sulfato de níquel (NiSO₄), foram utilizados como antígenos no ensaio. O cultivo, em triplicatas, foi realizado em placas de 96 poços de fundo chato (IS-FB-96-TC-Limbro, Hamden, CT). Em cada poço foram adicionados 100 µl de meio de cultura RPMI completo contendo 5% de soro humano normal AB⁺ inativado pelo calor a 56° C por 30 minutos. Em outros poços das placas de cultura foram também adicionados 100 µl de meio RPMI completo, contendo 5% de plasma autólogo também inativado pelo calor. Em seguida, foram adicionados 20 e 30 µl de PBMC ressuspendidas em RPMI incompleto na concentração de 10 x 10⁶ células por ml, de modo a conter 2.0 x 10⁵ e 3.0 x 10⁵ células em cada poço, respectivamente. As preparações antigênicas (extrato e sulfato de níquel) em diversas concentrações, foram diluídas em RPMI incompleto e 100µl dessas preparações foram adicionadas em cada poço. Nas culturas controles foram adicionadas somente células e meio RPMI completo contendo soro AB⁺ e separadamente meio RPMI completo contendo plasma autólogo, nas mesmas concentrações descritas anteriormente.

Para os ensaios de proliferação na presença de mitógeno (PHA-Fitohemaglutinina, SIGMA Cell Culture, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA)

foram adicionados 25 μ l de PHA na concentração de 20 μ g/ml, ou seja 0,5 μ g em cada poço contendo 1.5×10^5 células. Em seguida foram adicionados 100 μ l de RPMI completo contendo soro AB⁺ e em outros poços 100 μ l de RPMI completo contendo plasma autólogo, nas mesmas condições descritas acima. Esse ensaio foi utilizado como controle da viabilidade celular.

As culturas que receberam extrato ou sulfato de níquel foram incubadas em estufa (QUEUE Systems Inc., Parkersburg, WV., USA), com ar úmido, contendo 5% CO₂ por 6 dias e aquelas que receberam PHA foram incubadas por 3 dias. No último dia de cultivo foram adicionados em cada poço 1.0 μ Ci de timidina tritiada (³H) em RPMI e as placas foram reincubadas por 6 horas. Numa etapa seguinte, as células foram então coletadas em papel de fibra de vidro (Whatman Inc. Clifton, NJ, USA), com o auxílio de um coletor de células automático (Semiautomatic Cell Harvester – SKATRON Inc., Sterling, VA, USA). O papel de fibra de vidro com as células radioativas foi secado e colocado em frascos de cintilação líquida contendo coquetel de cintilação. A radioatividade incorporada foi determinada em um cintilador (Beckman LS 100 C, Scientific Instruments Division, Irvine, CA, USA) onde as amostras foram contadas por 2 minutos, com canal ³H aberto.

Toda a manipulação das células foi realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar (VECO – Campinas, SP., Brasil).

Os resultados obtidos dos ensaios de proliferação celular foram expressos em contagens por minuto (CPM). O índice de estimulação celular foi calculado tomando-se o valor médio das triplicatas referentes às proliferações das culturas estimuladas com os antígenos (E) dividido pelos valores médios das triplicatas referentes às

proliferações das culturas controle (C) . Para esse estudo, o índice de estimulação superior a 2,5 ($E/C \geq a 2,5$) foi considerado significativo para as análises dos resultados de proliferação celular, baseado em HUTCHINSON *et al.*³², 1972; ALTAWIL *et al.*¹, 1981; EVERNESS *et al.*¹⁹, 1990; e GRIMSTÓTTIR *et al.*³⁰, 1994 .

4. 9 – Dosagem de Interleucina 5 (IL-5) e Interferon gama (IFN- γ) em sobrenadantes de culturas de células mononucleares do sangue periférico.

Para avaliar a produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue periférico de pacientes submetidos ao tratamento ortodôntico, sobrenadantes de culturas, contendo 1×10^6 PBMC/poço, estimuladas com sulfato de níquel ($\text{NiSO}_4 - 10 \mu\text{g/ml}$ e extrato contendo níquel – $5 \mu\text{g/ml}$), foram coletados após 24 e 48 horas de cultivo. Nesse ensaio foram incluídos controles com células não estimuladas, como também células estimuladas com mitógeno (PHA). Os respectivos sobrenadantes foram ensaiados pelo método de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) conforme descrito por LUNDE *et al.*⁴⁰, 1979, com pequenas modificações. Foram adicionados Anti-leucina 5 (DNAX, CA, USA) em placas de 96 poços (Immunolon 2, Dynatech Laboratories, Inc., Virginia, USA) com $60 \mu\text{l/poço}$ de anticorpo monoclonal anti-gama interferon (R & D SYSTEMS Inc., Minneapolis, MN, USA) por 12 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem, as placas foram bloqueadas com solução de soro albumina bovina (BSA 1%,), e em seguida foram adicionados $50 \mu\text{l}$ dos sobrenadantes das culturas. Nos poços correspondentes ao branco e aos padrões, foram adicionados respectivamente, $50 \mu\text{l}$ de tampão fosfato (PBS 1x) e $60 \mu\text{l}$ do recombinante interferon-gama (R & D SYSTEMS, Inc. Minneapolis, MN, USA) e

recombinante interleucina-5 (DINAX, CA, USA) em diferentes concentrações, para o cálculo da curva padrão. As placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente. Após a lavagem, foram adicionados 60 µl/poço de anticorpo policlonal biotinizado anti-gama interferon (R & D SYSTEMS) e anticorpo conjugado anti-IL 5 (5 A 10 – NIP, DNAX, CA, USA) e as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e foram adicionados 60 µl de substrato em todos os poços. Após incubação, ocorria o aparecimento de cor e a reação era interrompida com 50 µl de solução de ácido sulfúrico 1M. A densidade ótica foi medida em leitor automático (BENCHMARK MICROPLATE READER, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA), com filtro de 405 nm.

Todos os ensaios descritos neste capítulo foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Imunologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CENBIOS) da Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE).

4. 10 – Tratamento estatístico

Para a análise estatística dos resultados do ensaio de corrosão das quatro diferentes montagens de aparelhos ortodônticos em imersão em solução salina durante um período de 60 dias, foi utilizado o modelo de regressão linear para cada montagem, avaliando a quantidade de níquel liberada ao longo do processo corrosivo (figura 15).

Para ensaio de proliferação celular *in vitro* foi realizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo definido cada indivíduo como uma repetição.

O esquema utilizado foi um fatorial com três fatores combinando as variáveis utilizadas: sexo, número de células (200.000 e 300.000), meio de cultura contendo soro AB⁺ e plasma autólogo separadamente e concentrações das fontes de níquel (extrato em concentrações de 1.25, 2.5 e 5 $\mu\text{g/ml}$ e NiSO₄ em concentrações de 2.5, 5.0 e 10.0 $\mu\text{g/ml}$).

Como a escolha do sexo masculino e feminino foi realizada ao acaso, as repetições utilizadas na análise fatorial dos dados foram variáveis.

As fontes de níquel (extrato e sulfato de níquel) não foram avaliadas como um único fator devido às diferenças de concentrações de níquel nesses tratamentos.

Os resultados do teste de sensibilidade cutânea ao níquel foram classificados através de índices (1, 2, 3 e 4), sendo considerado o valor 1 reação negativa e o valor 4 reação positiva ++++. Dessa forma, foi realizado o estudo de correlação entre os resultados do teste de sensibilidade cutânea dos pacientes e as respostas de proliferação celular em função das fontes de níquel, suas concentrações, dos meios de cultura utilizados e o número de células. Essa análise foi realizada apenas com os pacientes do sexo feminino, já que os do sexo masculino não apresentaram qualquer tipo de reação ao teste de sensibilidade cutânea ao níquel.

Foram realizadas outras correlações entre as variáveis, tempo de exposição ao aparelho ortodôntico e idade dos pacientes (sexo feminino) com as respostas ao teste de sensibilidade cutânea.

Na análise fatorial, foi realizado o teste de Tukey (teste de médias) a 5% de probabilidade e nas correlações o teste t de Student.

5 – RESULTADOS

RESULTADOS

Os resultados obtidos através dos exames clínicos, testes de sensibilidade cutânea e laboratoriais, foram tabulados e submetidos a tratamento estatístico, sendo apresentados neste capítulo e nos anexos.

A figura 15 mostra a dosagem espectrofotométrica de níquel, de 4 montagens distintas de aparelhos ortodônticos, após terem sido submetidas a um processo de corrosão. Foi observado que os níveis de níquel liberado nos 7 primeiros dias foram relativamente baixos, em torno de 4 a 5 $\mu\text{g/ml}$. No entanto, com 30 e 60 dias de corrosão, esses níveis foram aumentando e alcançaram valores de 40 $\mu\text{g/ml}$, com pouca variação entre as montagens.

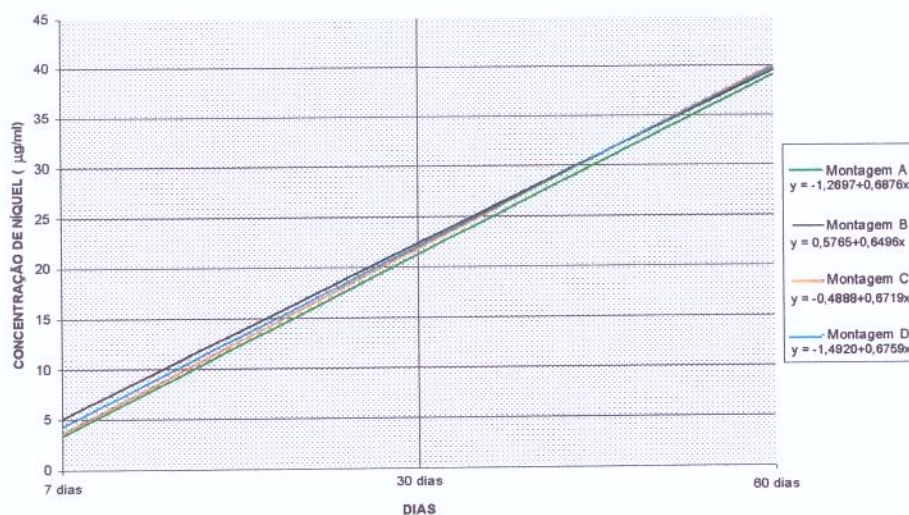


Figura 15- Concentração de níquel por ml de solução salina proveniente da corrosão de 4 diferentes montagens de aparelhos ortodônticos fixos por um período de 60 dias

TABELA 1 - Correlação do teste de sensibilidade cutânea positivo com o tempo de exposição ao aparelho ortodôntico e idade, em indivíduos do sexo feminino

Teste de sensibilidade Cutânea	Tempo de exposição	Idade
Sexo feminino	-0,5966*	0,3580

*Teste significativo a 5%

Na tabela 1 foi verificada uma correlação negativa ao nível de 5% de probabilidade, quando a variável tempo de exposição ao aparelho ortodôntico foi correlacionada aos pacientes positivos ao teste de sensibilidade cutânea, indicando que quanto maior o tempo de exposição, menor a sensibilidade ou vice-versa. No entanto, quando se correlacionou a variável idade e teste de sensibilidade cutânea, a análise não mostrou níveis significativos, indicando serem essas variáveis independentes, já que não existe correlação.

O índice de estimulação celular de 2,5, considerado significativo, está identificado nos gráficos a seguir, através de uma linha vermelha, para melhor visualização.

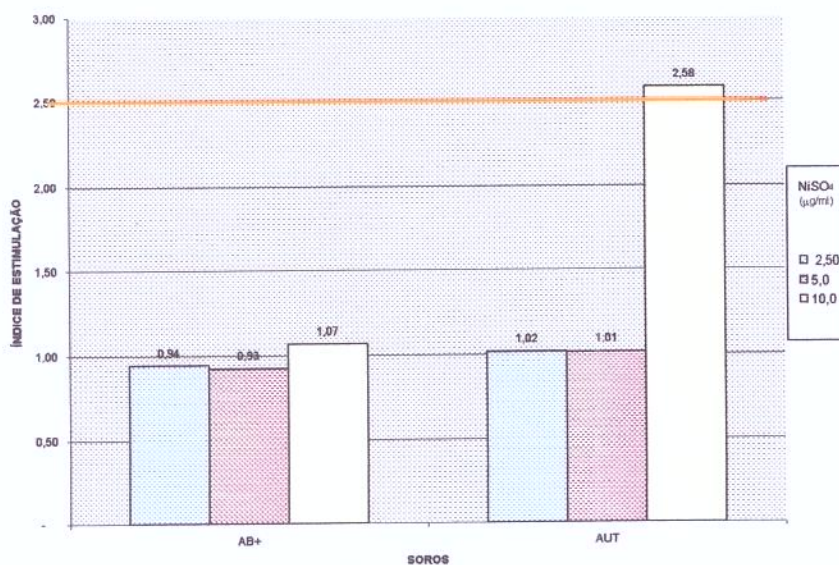


Figura 16- Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2 x 10⁵ PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄

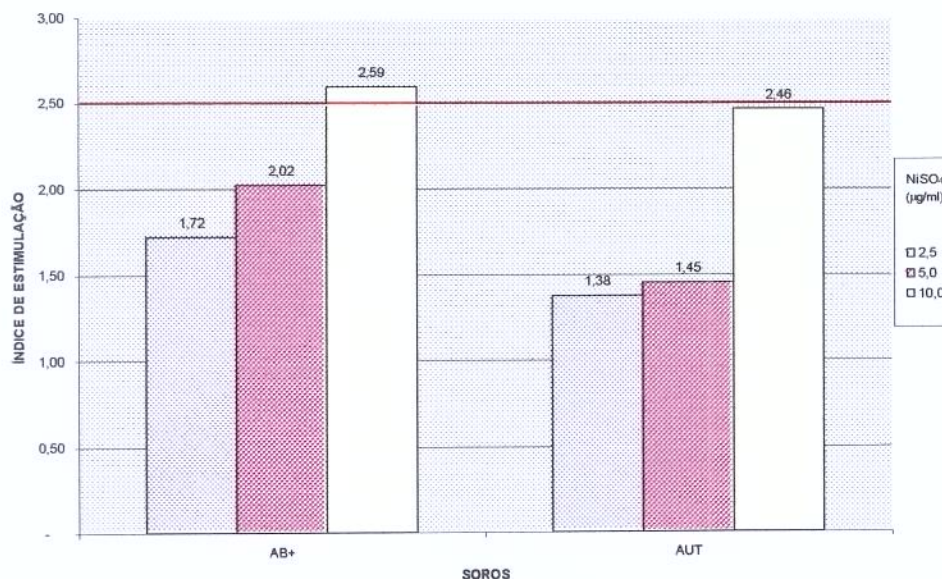


Figura 17- Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄

A figura 16 mostra que indivíduos do sexo masculino apresentaram um índice de estimulação celular elevado (≥ 2.5), quando se utilizou soro autólogo e sulfato de níquel, na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$. Entretanto, utilizando soro AB⁺ e sulfato de níquel nas diferentes concentrações, os índices de estimulação foram inferiores a 1.

Diferentemente do perfil de proliferação celular em indivíduos do sexo masculino, os resultados apresentados na figura 17 mostram que houve uma estimulação celular considerável nos indivíduos do sexo feminino, tanto na presença de soro AB⁺ quanto autólogo, quando as PBMC desses indivíduos foram estimuladas por sulfato de níquel na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$.

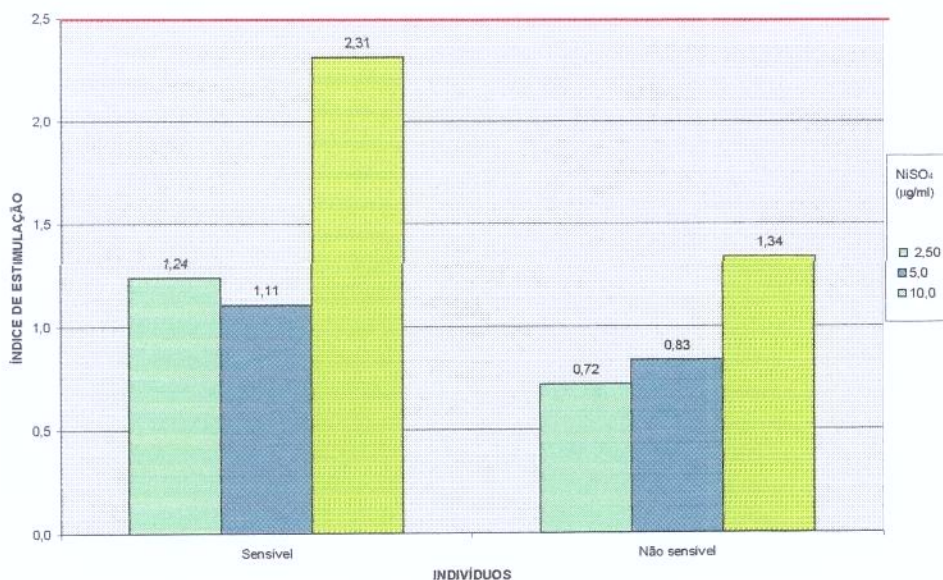


Figura 18- Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2 x 10⁵ PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄

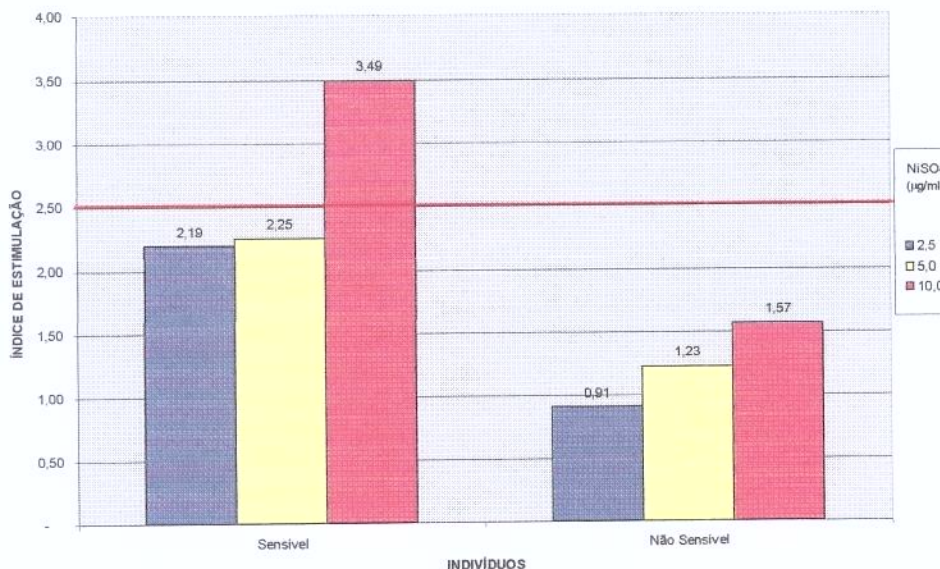


Figura 19- Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2 x 10⁵ PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄

Indivíduos do sexo masculino com manifestações clínicas bucais, considerados sensíveis ao níquel, apresentaram um índice de estimulação celular superior àqueles

do sexo masculino não sensíveis, atingindo valores bem próximos do índice de 2.5, na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ de NiSO_4 , conforme mostrado na figura 18.

Por outro lado, os resultados da figura 19 mostram que PBMC de indivíduos do sexo feminino com manifestações clínicas bucais (sensíveis), atingiram índices de estimulação consideráveis (≥ 2.5), quando foram estimuladas com sulfato de níquel, numa concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, independente do soro utilizado. Neste gráfico, também foi observado, que os índices de estimulação celular dos indivíduos não sensíveis (grupo controle) foram muito baixos nas diferentes concentrações de NiSO_4 .

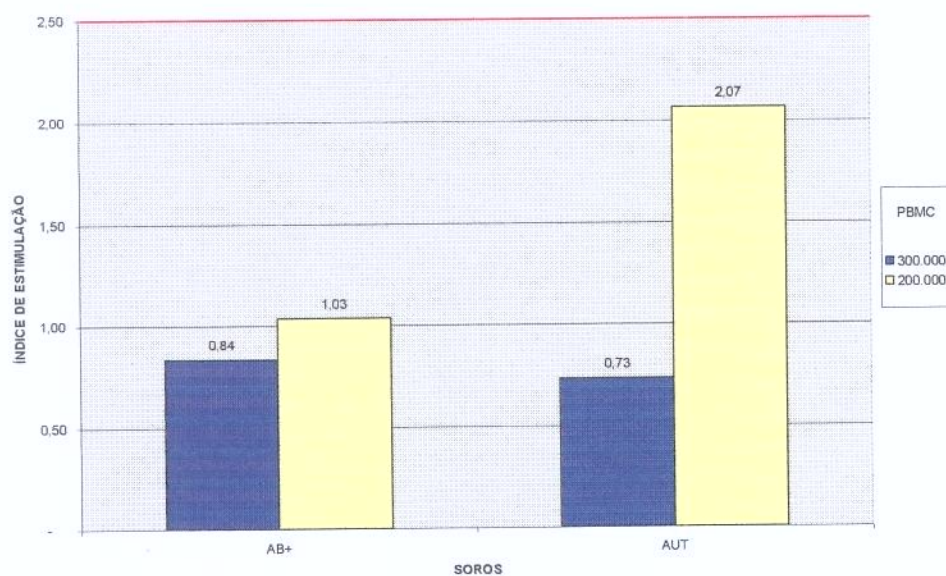


Figura 20 - Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis na presença de soro AB^+ e autólogo, utilizando 2×10^5 e 3×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO_4

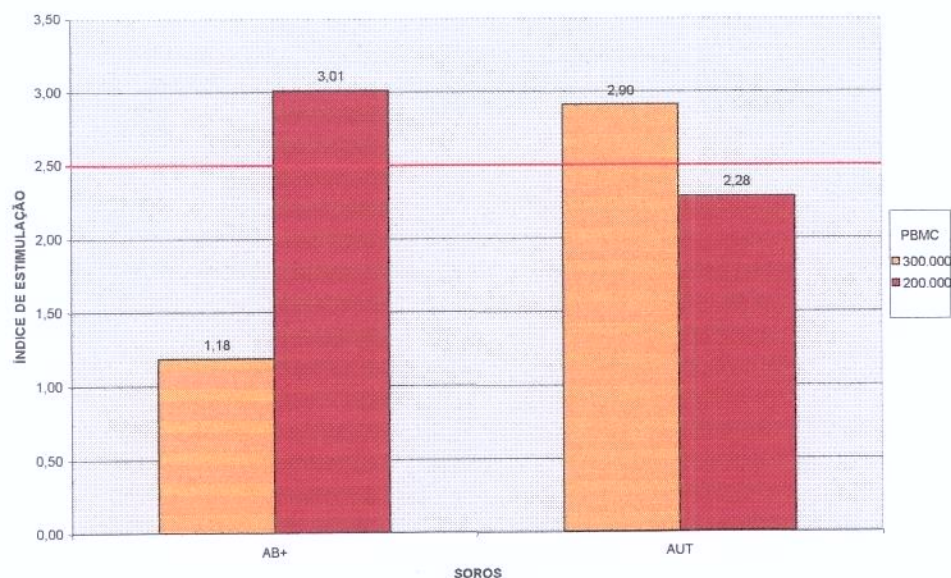


Figura 21- Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis ao níquel na presença de soro AB⁺ e autólogo utilizando 2×10^5 e 3×10^5 PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄

Na figura 20 pode ser observado que independentemente do tipo de soro utilizado, AB⁺ ou autólogo, o índice de estimulação celular com 3×10^5 PBMC foi bastante inferior, quando comparado com o índice de estimulação utilizando 2×10^5 PBMC em indivíduos do sexo masculino. Entretanto, em indivíduos do sexo feminino, os índices de estimulação celular foram bem mais elevados ($\geq 2,5$), quando foram utilizadas tanto 2×10^5 PBMC na presença de soro AB⁺, quanto 3×10^5 PBMC na presença de soro autólogo, como mostrado na figura 21.



Figura 22- Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo em diferentes concentrações de NiSO₄, independentemente do número de células

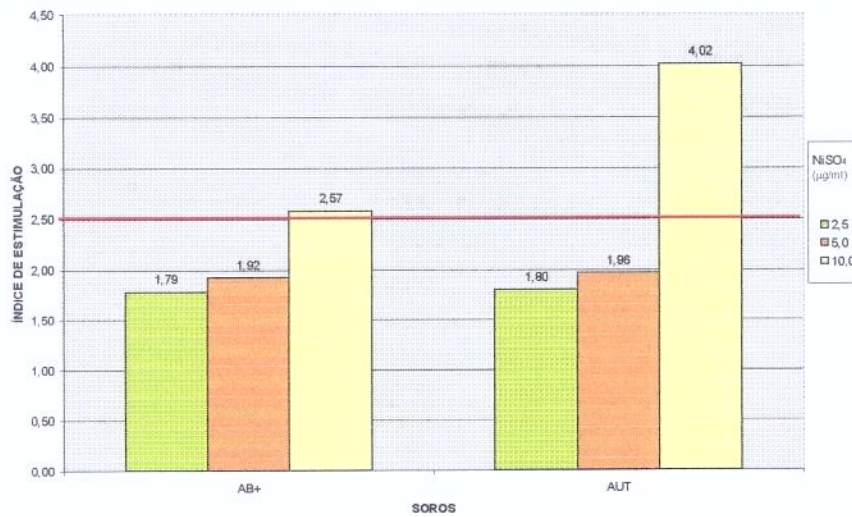


Figura 23 – Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo em diferentes concentrações de NiSO₄ independentemente do número de células

As figuras 22 e 23 mostram que independentemente do número de células utilizadas (2×10^5 e 3×10^5), o índice de estimulação celular foi sempre superior, quando se utilizou NiSO₄ na concentração de 10 µg/ml e na presença de soro autólogo, tanto em indivíduos do sexo feminino quanto em indivíduos do sexo masculino. Entretanto, esses índices foram bem mais elevados (≥ 2.5) em indivíduos do sexo

feminino, quando foi utilizado soro autólogo em comparação com o soro AB⁺, que mostrou um índice inferior, embora ainda superior ao índice de estimulação de 2,5.

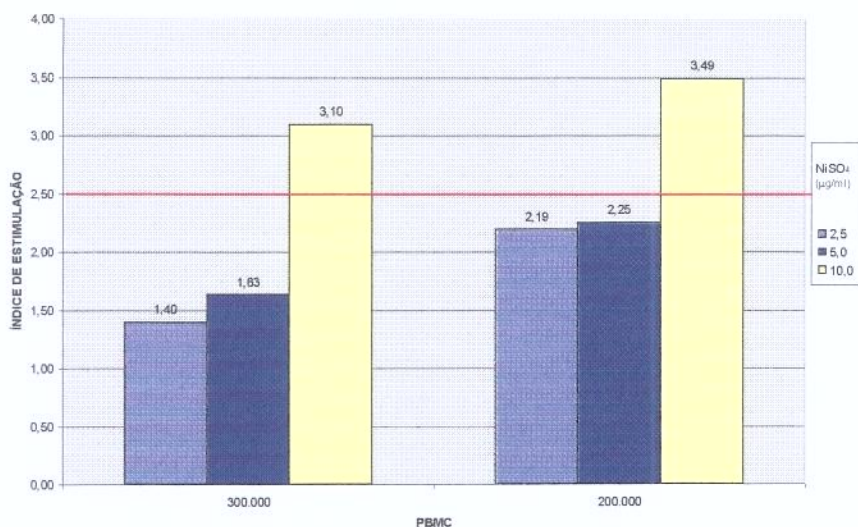


Figura 24 – Índice de estimulação celular em indivíduos do sexo feminino sensíveis ao níquel, na presença de 2 x 10⁵ e 3x10⁵ PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄, independentemente do soro utilizado

A figura 24 mostra que na concentração 10µg/ml de NiSO₄ o índice de estimulação celular foi bastante elevado (≥2.5) utilizando tanto 2 x 10⁵, quanto 3 x 10⁵ células, em indivíduos do sexo feminino independentemente do soro utilizado.

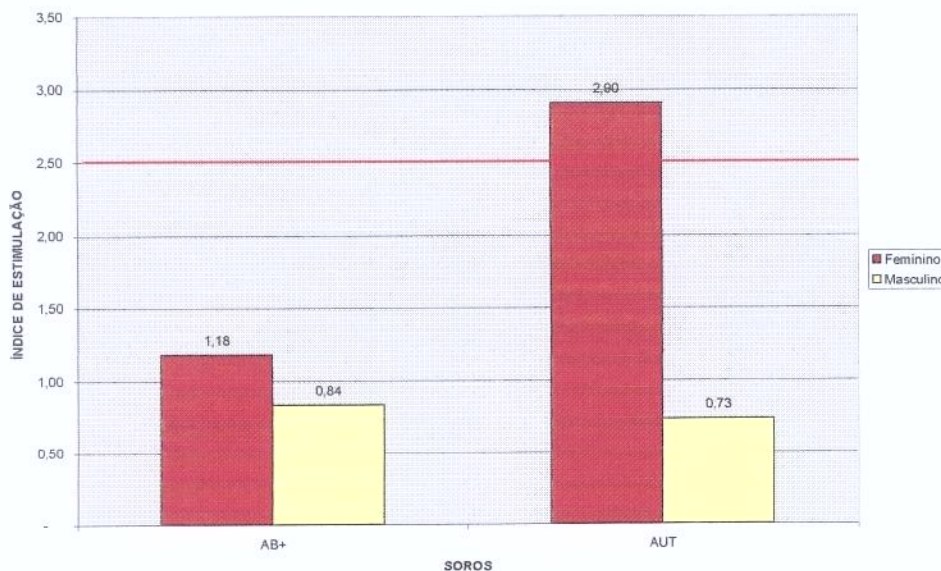


Figura 25- Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino e feminino sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, com 3 x 10⁵ PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄

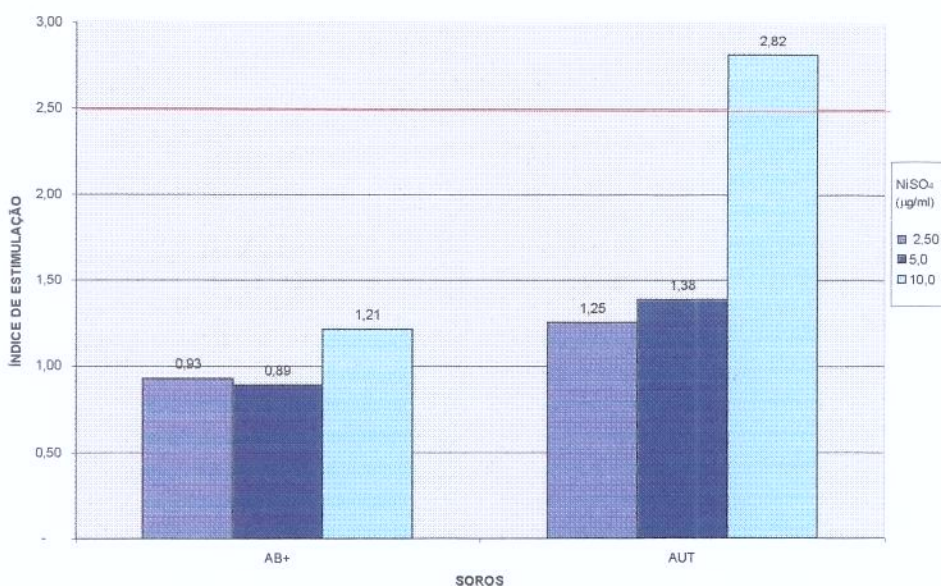


Figura 26- Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino e feminino sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 3 x 10⁵ PBMC em diferentes concentrações de NiSO₄

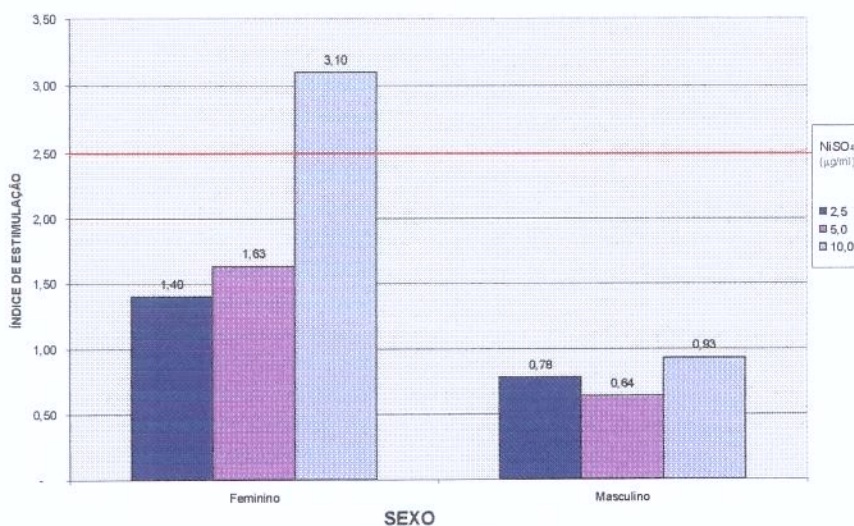


Figura 27- Índice de estimulação celular em indivíduos do sexo masculino e feminino sensíveis ao níquel, em diferentes concentrações de NiSO₄, independentemente do soro, utilizando 3 x 10⁵ PBMC

As figuras 25, 26 e 27 mostram que os índices de estimulação celular dos indivíduos do sexo feminino foram superiores a 2.5, quando comparados com os índices dos indivíduos do sexo masculino, utilizando 3 x 10⁵ PBMC, na presença de soro autólogo, e 10 µg/ml de NiSO₄. Além disso, quando se analisa o índice de

estimulação celular dos indivíduos agrupados pelo sexo, foi observado que o índice continua sendo superior na presença de soro autólogo e sulfato de níquel na concentração de $10\mu\text{g/ml}$.

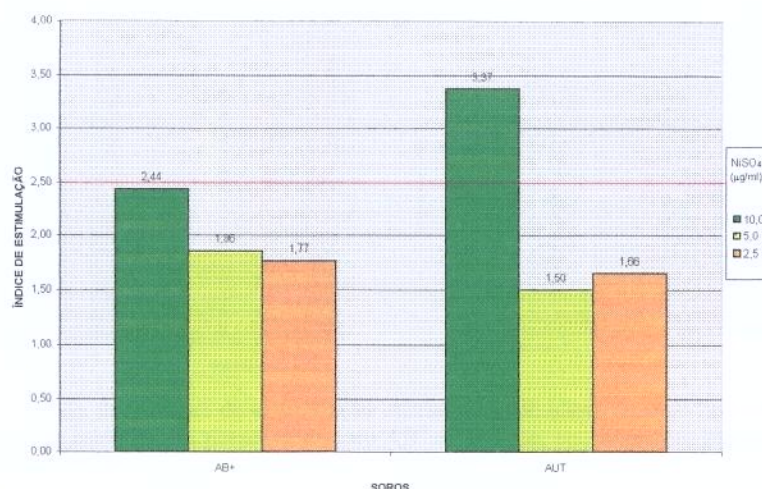


Figura 28- Índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino e feminino sensíveis ao níquel na presença de soro AB⁺ e autólogo em diferentes concentrações de NiSO₄, utilizando 2×10^5 PBMC

A figura 28 mostra que o índice de estimulação celular foi elevado (≥ 2.5) na presença de soro autólogo e NiSO₄ na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$, utilizando 2×10^5 células por poço. Da mesma maneira quando foi utilizado o soro AB⁺, o melhor índice de estimulação ocorreu na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$.

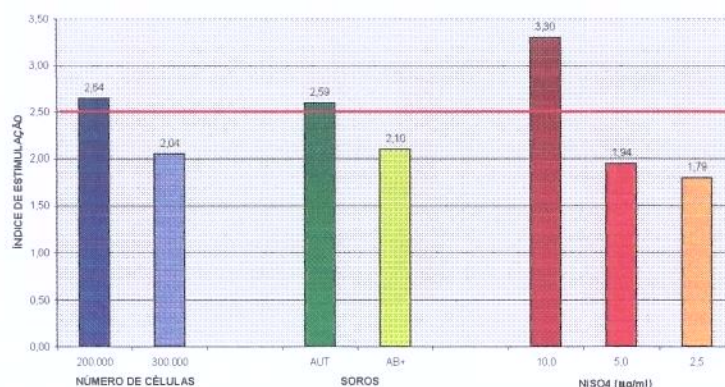
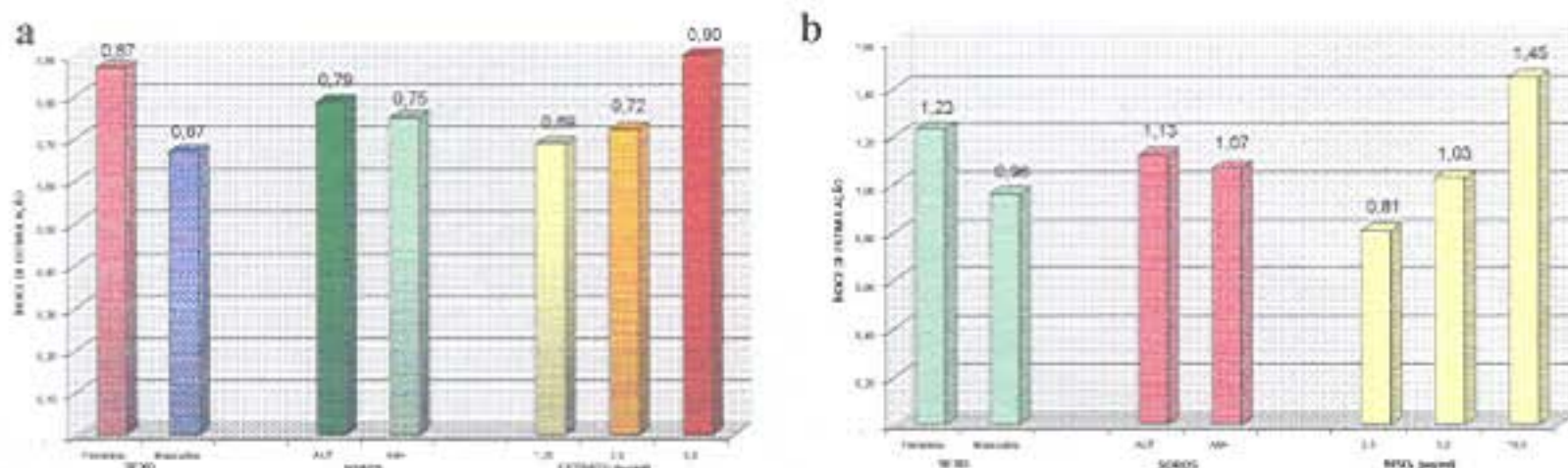


Figura 29 – Média dos índices de estimulação celular em indivíduos do sexo feminino sensíveis ao níquel, utilizando 2×10^5 e 3×10^5 células, na presença de soro AB⁺ e autólogo em diferentes concentrações de NiSO₄

A média dos índices de estimulação foi elevada (≥ 2.5) quando se utilizou 2×10^5 células, na presença de soro autólogo e na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$ de NiSO_4 , conforme mostra a figura 29.



Figuras 30a e 30 b – Média dos índices de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino e feminino não sensíveis ao níquel (grupo controle) na presença de soro AB⁺ e autólogo, em diferentes concentrações de extrato e sulfato, utilizando 2×10^5 PBMC

As figuras 30a e 30b mostram que os indivíduos do sexo masculino e feminino, representantes do grupo controle, apresentaram valores médios de estimulação celular bastante reduzidos, tanto na presença de soro AB⁺ quanto autólogo, bem como quando foram utilizadas diferentes concentrações de extrato e sulfato de níquel.

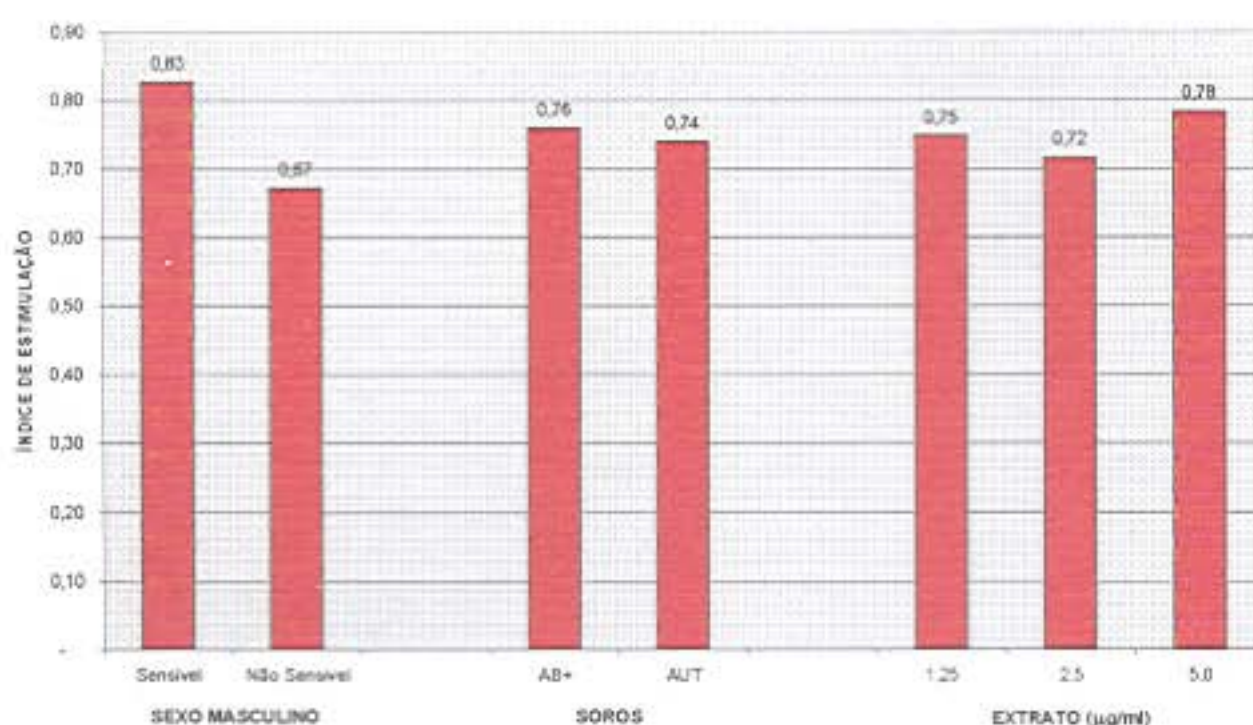


Figura 31- Médias dos índice de estimulação celular de indivíduos do sexo masculino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2×10^5 PBMC em diferentes concentrações de extrato

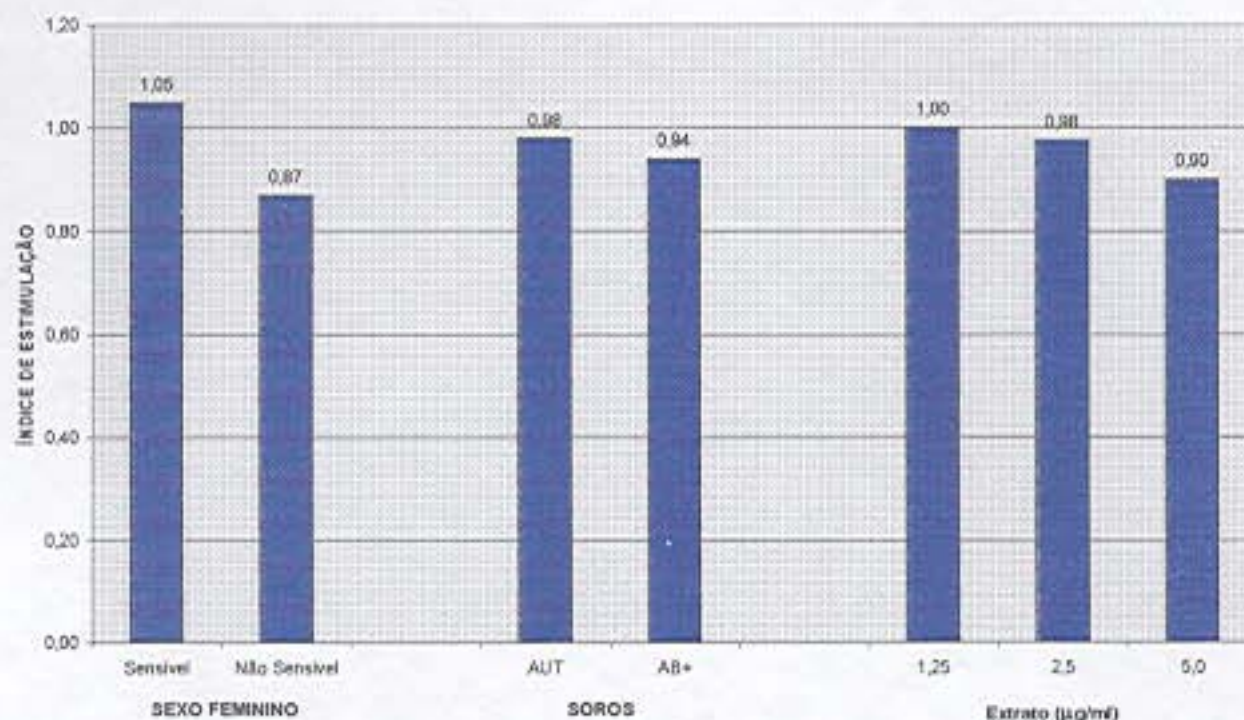


Figura 32- Média dos índices de estimulação celular de indivíduos do sexo feminino sensíveis e não sensíveis ao níquel, na presença de soro AB⁺ e autólogo, utilizando 2 x 10⁵ PBMC em diferentes concentrações de extrato

As figuras 31 e 32 mostram que independentemente do agrupamento dos indivíduos do sexo masculino e feminino sensíveis e não sensíveis ao níquel, do tipo de soro utilizado (AB⁺ e autólogo) e das concentrações de níquel, o extrato proveniente dos aparelhos ortodônticos não estimulou a proliferação de PBMC desses pacientes nas concentrações 1.25, 2.5 e 5.0 µg/ml.

Os quadros de análise de variância referentes a todas as figuras anteriores, podem ser encontrados no ANEXO 5.

TABELA 2 - Análise de correlação dos índices de estimulação celular (tipo de soro, número de células, concentrações de extrato e NiSO₄), em indivíduos com teste de sensibilidade cutânea positivo

Soro / número de células	Extrato 5µg/ml	Extrato 2,5µg/ml	Extrato 1,25µg/ml	NiSO ₄ 10µg/ml	NiSO ₄ 5µg/ml	NiSO ₄ 2,5µg/ml
AB ⁺ (2x10 ⁵ /3x10 ⁵)	0,3828	0,4964	0,5881*	0,5618*	0,4705	0,5242*
AUT (2x10 ⁵ /3x10 ⁵)	0,5840*	0,5892	0,3549	0,62295*	0,5451*	0,5660*
AB ⁺ /2x10 ⁵	0,3363	0,7114*	0,7051*	0,7094*	0,6454	0,7084*
AUT/2x10 ⁵	0,5409	0,7070*	0,4411	0,7830*	0,8096**	0,8002**
AB ⁺ /3x10 ⁵	0,3958	-0,0670	0,3518	0,3069	-0,1010	-0,1007
AUT/3x10 ⁵	0,6317	0,4260	0,1138	0,5869	0,3662	0,1219

* Teste significativo a 5%

** Teste significativo a 1%

Na tabela 2, quando foi avaliada a correlação entre o índice de estimulação celular e o teste de sensibilidade cutânea ao NiSO_4 , foi observado que o efeito do extrato, tanto na presença do soro AB^+ quanto do autólogo, independentemente do número de células, não mostrou ser significativo, com exceção do extrato na concentração de $5 \mu\text{g/ml}$ na presença de soro autólogo e na concentração de $1,25 \mu\text{g/ml}$ na presença de soro AB^+ . Quando avaliado o NiSO_4 , na presença dos soros AB^+ e autólogo, foi observado que independentemente das concentrações, todas as correlações foram significativas, com exceção da concentração de $5 \mu\text{g/ml}$ na presença de soro AB^+ .

Quando consideradas 2×10^5 PBMC, foi constatado que no extrato na presença de soro AB^+ , a correlação foi significativa nas concentrações de $2,5$ e $1,25 \mu\text{g/ml}$, sendo que na presença de soro autólogo, apenas a concentração de $2,5 \mu\text{g/ml}$ mostrou ser significativa, todos ao nível de 5% de probabilidade.

Ainda com 2×10^5 PBMC e soros AB^+ e autólogo, na presença de NiSO_4 , a análise mostrou que em todas as concentrações houve significância da correlação entre o índice de estimulação celular e o teste de sensibilidade cutânea, com exceção da concentração de $5 \mu\text{g/ml}$ de NiSO_4 , na presença de soro AB^+ . Dentro da mesma análise, os valores obtidos na correlação foram altamente significativos atingindo 1% de probabilidade em alguns casos, quando utilizado o NiSO_4 na presença de soro autólogo e 2×10^5 PBMC.

Na mesma correlação estudada, os índices de estimulação celular utilizando 3×10^5 PBMC não foram significativos, tanto na presença de extrato quanto de NiSO_4 , independentemente das concentrações, e dos soros AB^+ ou autólogo.

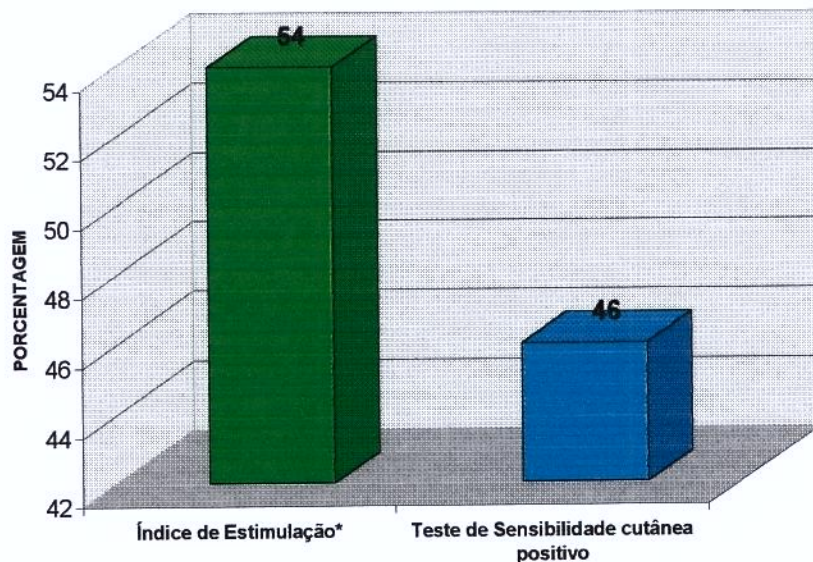


Figura 33 - Porcentagem de indivíduos sensíveis ao níquel com índice de estimulação celular superior a 2.5 e teste de sensibilidade cutânea positivo ao NiSO₄

*Ensaio de proliferação celular utilizando 2 x 10⁵ PBMC, soro autólogo e 10µg/ml de NiSO₄

A figura 33 mostra que 54% dos indivíduos que apresentavam manifestações clínicas bucais tiveram índice de estimulação celular superior a 2.5, considerando o ensaio de proliferação celular utilizando 2 x 10⁵, soro autólogo e 10µg/ml de NiSO₄, enquanto que 46% desses mesmos indivíduos manifestaram reação positiva ao teste de sensibilidade cutânea com sulfato de níquel a 5%.

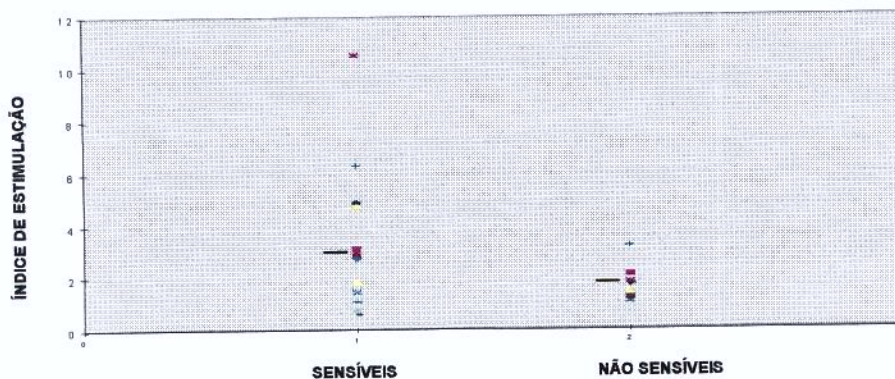


Figura 34- Índice de estimulação celular de pacientes com e sem manifestação clínica bucal, utilizando 2 x 10⁵ PBMC, na presença de soro autólogo e 10µg/ml de NiSO₄

A figura 34 compara os índices de estimulação de PBMC de indivíduos que não apresentavam manifestações bucais (não sensíveis), com os índices de estimulação de PBMC dos indivíduos que apresentavam manifestações clínicas bucais (sensíveis). Células dos indivíduos não sensíveis tiveram um índice médio de estimulação de 1.71, enquanto que, as células dos indivíduos sensíveis atingiram 3.25.

A viabilidade das células mononucleares do sangue periférico em cultura, foi determinada através do estímulo na presença de mitógeno (PHA), utilizando $1,5 \times 10^5$ células e soro autólogo. Os resultados mostraram que o índice de proliferação celular, após o estímulo mitogênico, foi significativamente superior ao controle, indicando que todas as células testadas nos experimentos apresentavam boa viabilidade.

A avaliação da concentração de citocinas, Interferon- γ e Interleucina 5 nos sobrenadantes das culturas de PBMC de pacientes sensíveis e não sensíveis ao níquel, foi realizada, utilizando o método de extrapolação a partir da curva de regressão linear, construída com os valores da curva padrão da citocina recombinante (ANEXO 4). Os resultados mostraram que não houve produção significativa de IFN- γ e IL 5 nos sobrenadantes coletados após 24 e 48 horas de cultivo, quando as células eram estimuladas com extrato e sulfato de níquel.

6 - DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Segundo GREPPI *et al.*²⁸, 1981, dados da literatura mostram que a freqüência de hipersensibilidade ao níquel dobrou nos últimos anos e tem sido estimado que entre 15 e 30% da população em geral apresenta sensibilidade ao níquel, sendo mais comum nas mulheres do que nos homens, atingindo principalmente indivíduos na faixa etária de 10 a 20 anos, que corresponde ao período mais comum de tratamento ortodôntico. Além disso, a incidência de reações de dermatite de contato ao níquel não tenderá a diminuir no futuro, ao contrário, a prevalência tenderá a aumentar, devido à utilização mais freqüente do níquel nas novas ligas metálicas que hoje vêm substituindo metais preciosos.

Nos últimos 10 anos, a prática ortodôntica vem alcançando um número cada vez maior de pacientes. De um modo geral, os braquetes e arcos utilizados nesses tratamentos apresentam diferentes composições de metais e alguns contêm mais de 55% de níquel, representando portanto, fonte potencial de liberação de níquel no ambiente ácido da cavidade bucal. Sabendo que o níquel é capaz de sensibilizar o indivíduo e até mesmo causar reações alérgicas severas, o uso dessas ligas com segurança é questionável.

Comparando o processo de corrosão de ligas de aço inoxidável, através de testes de corrosão por polarização eletroquímica e por imersão, PLATT *et al.*⁵⁵, 1997, verificaram que algumas ligas de aço inoxidável foram mais resistentes à

corrosão do que outras, mostrando dessa forma, uma preocupação com a liberação de níquel dos aparelhos ortodônticos pelo processo de corrosão no meio bucal.

Sendo assim, utilizamos em nosso estudo quatro diferentes montagens de aparelhos ortodônticos que foram submetidas a processo de corrosão por imersão, com o objetivo de avaliar os níveis de níquel proveniente dessas montagens para serem utilizados nos ensaios de proliferação celular. Os resultados mostraram que os níveis de níquel liberado nos 7 primeiros dias foram relativamente baixos. No entanto, após 30 e 60 dias de corrosão, esses níveis alcançaram $40\mu\text{g/ml}$. Por outro lado, os níveis de cobalto e cromo, dosados nas amostras de 60 dias de imersão, foram insignificantes (Figura 1 e ANEXO 3). Diferentemente, PARK *et al.*⁵³, 1983, analisando a liberação de níquel e cromo de aparelhos ortodônticos verificaram que, após 12 dias de corrosão, a quantidade de níquel máxima liberada era de $30,2\mu\text{g/ml}$ e de cromo $10\mu\text{g/ml}$. Por outro lado, BARRET *et al.*⁵, 1993, encontraram um pico máximo de liberação de níquel por volta do 7º dia de corrosão dos aparelhos, havendo um progressivo declínio até o 28º dia.

As diferenças nas concentrações de níquel, em função do tempo de corrosão, encontradas nesse trabalho quando comparadas com outros autores, pode ser devido à utilização nos ensaios, de diversos tipos de aparelhos, que segundo MAIJER & SMITH⁴¹, 1986, e WICHELHAUS *et al.*⁶⁷, 1997, existem diferenças consideráveis entre fabricantes em relação aos elementos das ligas e suas superfícies, como também a presença de porosidades e gretas nos materiais, que podem favorecer o processo corrosivo. Além disso, deve-se notar que a corrosão *in vivo* pode ser influenciada por alguns fatores, tais como: temperatura, quantidade e qualidade de saliva, placa

bacteriana, pH, proteína, propriedades físicas e químicas de alimentos e líquidos e condições de saúde geral e bucal, contribuindo para maior ou menor liberação de níquel.

O teste de sensibilidade cutânea ao níquel tem sido utilizado na rotina, não só para avaliar a incidência da reação de hipersensibilidade ao níquel da população de um modo geral, como também para fins de diagnósticos (FISHER & SHAPIRO²², 1956; MARCUSSEN⁴³, 1959; PELTONEN *et al.*⁵⁴, 1979; VEIEN *et al.*⁶³, 1982; JONES *et al.*³⁵, 1986 e DIÓGENES *et al.*¹⁶, 1997).

No presente estudo, foi verificada a correlação do teste de sensibilidade cutânea positivo com o tempo de exposição ao tratamento ortodôntico e idade, em indivíduos do sexo feminino, demonstrando que havia uma correlação negativa em relação ao tempo de exposição, indicando que quanto maior a duração do tratamento ortodôntico, menor a sensibilidade ao teste cutâneo. Por outro lado, não havia correlação com a idade, que variava de 11 a 22 anos (Tabela 1). Esse resultado corrobora os dados de FEASBY *et al.*²⁰, 1988, em que reações positivas ao teste de sensibilidade cutânea, também não aumentaram significativamente com o tempo maior de exposição aos aparelhos.

JONES *et al.*³⁵, 1986 e BASS *et al.*⁶, 1993; estudando pacientes sob tratamento ortodôntico, procuraram estabelecer correlação entre sexo, idade, história prévia de alergia a jóias com a hipersensibilidade ao níquel, através do teste de sensibilidade cutânea e verificaram que indivíduos do sexo feminino apresentavam maior índice de positividade ao teste de sensibilidade cutânea ao sulfato de níquel, da mesma maneira que em nossos resultados (ANEXO 1). Esses dados são ainda reforçados por

KEROSUO *et al.*³⁷, 1996, que também encontraram maior número de indivíduos do sexo feminino com reação positiva ao teste de sensibilidade cutânea. Finalmente, JANSON *et al.*³⁴, 1998, estudando cento e setenta indivíduos submetidos ao teste de sensibilidade cutânea ao sulfato de níquel a 5%, antes, durante e depois do tratamento ortodôntico, verificaram que a frequência de reações positivas ao teste era quatro vezes maior nos indivíduos do sexo feminino, quando comparado com os indivíduos do sexo masculino.

A tolerância imunológica induzida pelo níquel foi descrita por VREEBUR *et al.*⁶⁶, 1984, em modelo animal, quando foram realizadas administrações orais de níquel em cobaias, através de um *splint* fixado em seus dentes, ou pela incorporação de pós metálicos, ou sais na forma de pílulas de alimento. Os resultados mostraram que a administração oral de níquel induziu a um estado de tolerância parcial nesses animais. Segundo esses mesmos autores, a indução de um estado de tolerância parcial poderia contribuir para reduzir a incidência de problemas alérgicos em pacientes submetidos a tratamentos ortodônticos, em que ligas contendo níquel são frequentemente utilizadas. Considerando que, em nosso estudo, a correlação do teste de sensibilidade cutânea positivo com o tempo de exposição foi negativa, ao nível de significância de 5% (tabela 1), esse dado sugere que a exposição contínua ao aparelho ortodôntico, pode induzir a um estado de tolerância imunológica em alguns pacientes, em concordância com os resultados de VREEBUR *et al.*⁶⁶, 1984.

Os linfócitos são células brancas produzidas nos tecidos linfóides e distribuídas pelo corpo. Os linfócitos que passam pelo timo, são ativados e se tornam linfócitos T imunologicamente competentes. Em torno de 70 a 80% do total de linfócitos são

considerados linfócitos T. Linfócitos T humanos são capazes de reconhecer antígenos específicos, executar funções efetoras e regular o tipo e intensidade da resposta imune humoral e celular.

Duas sub-populações de linfócitos T têm sido demonstradas através de anticorpos monoclonais dirigidos a antígenos na superfície celular. Os linfócitos T auxiliares (*helper*) também chamados linfócitos T CD4⁺ são responsáveis pelo reconhecimento de microrganismos patogênicos, corpos estranhos. Os linfócitos T supressores (*suppressor*) ou citotóxicos, também chamados linfócitos T CD8⁺ são responsáveis pelo controle da resposta imune (EGGLESTON¹⁸, 1984).

O ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro* é um processo pelo qual novas moléculas de DNA são sintetizadas e os linfócitos sofrem divisão celular após um estímulo antigênico. Os linfócitos aumentam de tamanho, o citoplasma se torna mais extenso, os nucléolos são visíveis no núcleo e os linfócitos são denominados de células blásticas (blastos). Os linfócitos de animais imunizados e de humanos proliferam em resposta a antígenos para os quais estão sensibilizados. Essa resposta *in vitro* correlaciona com a existência de uma hipersensibilidade celular do tipo tardia (Tipo IV).

O ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro*, também denominado blastogênese, tem diversas aplicações como teste de diagnóstico para uma variedade de antígenos, alérgenos ou patógenos, bem como na determinação de citocinas: IL-5, IFN- γ , etc (MALUISH & STRONG⁴², 1986).

Considerando que o ensaio de proliferação celular *in vitro* utilizando níquel como antígeno, ainda não está adequadamente padronizado na literatura, pois,

envolve uma série de variáveis com relação ao número de PBMC, tipo de soro, tipo de antígeno, concentração do antígeno, tempo de cultivo, etc, ocorreu-nos investigar a melhor condição para estabelecer o ensaio, que permita diferenciar melhor, a resposta celular de indivíduos sensíveis e não sensíveis ao níquel.

Diante disso, o ensaio de proliferação celular realizado inicialmente, com PBMC de indivíduos do sexo masculino e feminino, teve como objetivo avaliar o padrão de resposta desses dois grupos de pacientes, independentemente da sensibilidade ou não ao níquel. Os resultados mostraram que, de acordo com ALTAWIL¹, 1981, indivíduos do sexo feminino apresentam maior sensibilidade ao níquel, o que pode ser comprovado pelos índices de estimulação celular, apresentados nas figuras 16 e 17, com valores mais elevados, quando se utilizou sulfato de níquel, na concentração de 10µg/ml.

Comparando o perfil da resposta de proliferação celular dos indivíduos do sexo masculino e feminino, sensíveis e não sensíveis ao níquel (Figuras 18 e 19), pode-se verificar que, de fato o teste de proliferação permitiu diferenciar esses dois grupos de indivíduos, uma vez que o índice de estimulação foi bastante superior naqueles indivíduos sensíveis, diferentemente dos indivíduos controles, que apresentaram índices bem inferiores. Esses dados estão de acordo com HUTCHINSON *et al.*³², 1972, que utilizando índice de estimulação inferior a 2.5, puderam diferenciar grupos de pacientes controles. Além do que, todos os pacientes, representantes do grupo controle em nosso estudo, apresentaram índices inferiores a 1.6, independentemente da concentração de NiSO₄ utilizada no ensaio (figuras 18, 19, 30a e 30b).

Quando foram avaliadas as interações das variáveis sexo, número de células, tipo de soro e concentração de níquel, conforme resultados mostrados nas figuras 20, 21, 22, 23 e 24, observamos que, no grupo de indivíduos do sexo masculino sensíveis ao níquel, a maior proliferação celular ocorreu, quando se utilizou 10 µg/ml de NiSO₄, na presença de soro autólogo, independentemente do número de PBMC. Ainda assim, os níveis do índice de estimulação celular nesse grupo de pacientes masculinos, não atingiram o parâmetro de 2.5, estabelecido neste estudo. Porém, se enquadram dentro do limite estabelecido por AL-TAWIL *et al.*¹, 1981, que definem como referência o índice de 2.0 para diferenciar pacientes sensíveis e não sensíveis ao níquel.

Dentro dessa mesma abordagem, os índices de estimulação de PBMC dos indivíduos do sexo feminino, foram analisados e pode-se observar valores relativamente mais elevados. Sendo assim, quando foi utilizada a concentração de 10 µg/ml de NiSO₄, independentemente do número de células, os índices de estimulação celular ultrapassaram 2.5 na presença de soro AB⁺, e alcançaram o valor de 4.0, na presença de soro autólogo. Esses resultados indicaram portanto, que também nos indivíduos do sexo feminino, as PBMC responderam melhor na concentração de 10 µg/ml de NiSO₄, e na presença de soro autólogo. E finalmente, quando foi analisada a interação das variáveis número de células e NiSO₄, independentemente do tipo de soro, os índices ultrapassaram consideravelmente o valor de referência de 2.5, tanto com 2 x 10⁵ quanto 3 x 10⁵ PBMC na concentração de 10 µg/ml de NiSO₄, reforçando os resultados de GRIMSDÓTTIR *et al.*³⁰, 1994, que utilizando 3 x 10⁵ PBMC, plasma autólogo e NiSO₄ na concentração de 10 µg/ml obtiveram índices de estimulação celular significativos.

SVEJGAARD *et al.*⁶¹, 1978; EVERNESS *et al.*¹⁹, 1990, e AL-TAWIL *et al.*¹, 1981, utilizaram diversas concentrações de NiSO₄ em seus experimentos, buscando definir melhor a concentração desse alérgeno, que até então, não está bem determinada e parece ser uma importante variável no ensaio de proliferação de linfócitos T *in vitro*. Considerando dessa forma, os resultados apresentados nas figuras 25, 26 e 27, apontaram para a concentração de 10µg/ml de NiSO₄, como sendo a mais indicada para estabelecer a diferenciação entre índices de proliferação celular. Sendo assim, os índices de estimulação celular dos indivíduos do sexo feminino foram superiores a 2.5 quando comparados com os índices dos indivíduos do sexo masculino, utilizando 3 x 10⁵ PBMC na presença de soro autólogo e 10 µg/ml de NiSO₄. Além disso, quando se analisou o índice de estimulação celular dos indivíduos agrupados pelo sexo, foi observado que o índice continua sendo superior na presença de soro autólogo e sulfato de níquel na concentração de 10µg/ml.

Mais uma vez, o índice de estimulação celular foi bem elevado, quando analisado em grupos de indivíduos do sexo feminino e masculino, utilizando 2 x 10⁵ PBMC, na concentração de 10µg/ml de NiSO₄, na presença de soro autólogo (figura 28). Da mesma maneira, a figura 29, representando a média dos índices de estimulação celular em indivíduos do sexo feminino nas mesmas condições descritas acima, repetiu os resultados anteriores e corrobora os dados de EVERNESS *et al.*¹⁹, 1990.

Diferentemente dos resultados dos índices de estimulação celular apresentados pelos pacientes sensíveis ao níquel, os indivíduos representantes do grupo controle apresentaram valores médios de estimulação celular, bastante reduzidos, tanto na

presença de soro AB⁺ quanto autólogo, bem como, quando foram utilizadas diferentes concentrações de extrato e NiSO₄ (figuras 30a e 30b), de acordo com GRIMSDÓTTIR *et al.*³⁰, 1994.

Objetivando avaliar se o níquel liberado de aparelhos ortodônticos (extrato) era capaz de estimular a proliferação de PBMC da mesma maneira que o NiSO₄, os resultados das figuras 31 e 32, mostraram que, ao contrário, o extrato causou inibição da proliferação celular de maneira dose-dependente. E somente altas diluições do extrato foram capazes de induzir discreta estimulação celular. Nessas condições, havia uma equivalência entre a quantidade de níquel presente no extrato e no sulfato, correspondendo a concentração de níquel em torno de 1.25µg/ml no extrato e de 10µg/ml na solução de NiSO₄. Da mesma maneira, esses resultados estão de acordo com GRIMSDÓTTIR *et al.*³⁰, 1994, que verificaram que somente concentrações mais elevadas do extrato, eram capazes de causar citotoxicidade.

A resposta de proliferação celular de 34 pacientes na faixa etária de 16 a 64 anos, com dermatite de contato ao níquel avaliada por SILVENNOINEN-KASSINEN⁵⁸, 1980, utilizando sulfato de níquel (NiSO₄), tuberculina (PPD), fitohemaglutinina - P, mitógeno de trigo e concanavalina A, mostrou que a estimulação por mitógenos não era significativamente diferente entre o grupo controle e o grupo de pacientes alérgicos. Da mesma maneira, em nosso experimento, através do estímulo por PHA, confirmamos a viabilidade das PBMC dos indivíduos estudados.

O índice de estimulação celular de 2.5, correlacionou melhor com a presença de manifestação clínica bucal do que o teste de sensibilidade cutânea ao níquel; uma vez

que, 46 % dos indivíduos com manifestação clínica bucal, apresentou resultados positivos ao teste (figura 33).

A figura 34 mostra os índices individuais de estimulação celular, em pacientes com e sem manifestação clínica bucal. Assim, foi possível notar, que havia uma maior dispersão dos índices no grupo de indivíduos com manifestação clínica bucal. Entretanto, estes valores concentravam numa faixa próxima de 3.0, com alguns indivíduos apresentando índices bem mais elevados, caracterizando assim, a variabilidade individual da resposta de proliferação celular, conforme já descrito por VIEIN *et al.*⁶⁴, 1985. Por outro lado, os índices de estimulação celular de indivíduos sem manifestação clínica bucal, se mostraram mais homogêneos, com média de 1.71, refletindo a ausência de sensibilidade ao níquel nesses indivíduos.

A análise da tabela 2, mostrou que, no ensaio de proliferação celular, utilizando 2×10^5 PBMC, soro AB⁺ e autólogo, na presença de 2,5, 5 e 10 μ g/ml de NiSO₄ e 1,25 e 2,5 μ g/ml de extrato houve significância na correlação entre o índice de estimulação celular e o teste de sensibilidade cutânea positivo. Os valores obtidos na correlação, foram altamente significativos, atingindo 1% de probabilidade em alguns casos. Esses dados reforçam, a possibilidade da utilização do ensaio de proliferação celular *in vitro*, como método confiável para diagnóstico da sensibilidade ao níquel.

Finalmente, para a análise das concentrações de citocinas presentes nos sobrenadantes de 24 e 48 horas das culturas estimuladas por extrato e sulfato de níquel, utilizamos o método de extrapolação, a partir de uma curva de regressão linear construída com a densidade ótica obtida da curva padrão da citocina recombinante em cada placa. Os resultados mostraram que a produção, tanto de IFN-

γ quanto IL-5, não foram significativos nas condições utilizadas nesse experimento. Acreditamos que outros períodos de incubação das células na presença de níquel devam ser utilizados na análise do padrão de produção de IL-5 e IFN- γ , uma vez que, segundo VIANA *et al.*⁶⁵, 1994, níveis elevados de IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC só foram obtidos após 144 horas de cultivo. No presente estudo, não foi possível introduzir outras variáveis de tempo de incubação, pelo fato de vários outros fatores já estarem sendo testados (soro AB⁺ e autólogo, concentração de células, extrato e NiSO₄), o que limitava o ensaio devido ao pequeno número de células disponíveis de cada paciente. Por outro lado, a não detecção de níveis significativos de IL-5 e IFN- γ nos sobrenadantes utilizados, não impede que outras citocinas estejam também presentes. Assim, existe interesse em continuar esse estudo, avaliando os níveis de outras citocinas, tal como o TNF- α , que por ser uma citocina pró-inflamatória, pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da reação de hipersensibilidade ao níquel, naqueles pacientes, que apresentam manifestações clínicas bucais quando em uso de aparelhos ortodônticos fixos.

Pode-se observar o uso crescente de ligas níquel-titânio na ortodontia atual. Estas ligas, conforme relatos anteriores, contêm altas concentrações de níquel, que liberado no meio bucal, pode causar manifestações clínicas bucais severas. É fundamental que seja incluído na anamnese de rotina, a história alérgica do paciente. E ainda, quando necessário, antes de iniciar um tratamento ortodôntico, indicar os testes de diagnóstico de alergia ao níquel, como o teste de proliferação celular, descrito neste trabalho. É importante considerar, que os processos alérgicos ligados a materiais odontológicos, como o níquel, podem ser observados com muita frequência

em nossas clínicas. Sendo assim, é imperativo que os fabricantes informem em seus produtos, os riscos de uma possível sensibilização e procurem desenvolver produtos para a prática ortodôntica e odontológica em geral que não envolvam altas concentrações de níquel, e criem ainda mais opções de materiais com menor poder sensibilizador.

7 - CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, das análises, interpretações e da discussão estabelecida, em relação ao perfil imunológico de pacientes sensíveis ao níquel proveniente dos aparelhos ortodônticos, pode-se concluir que:

- O extrato contendo níquel proveniente da corrosão dos aparelhos ortodônticos, não foi capaz de induzir a proliferação celular em indivíduos sensíveis ao níquel, nas concentrações utilizadas neste estudo;
- As condições ideais do ensaio de proliferação celular *in vitro*, para diferenciar indivíduos sensíveis e não sensíveis ao níquel, envolveram a utilização de 2×10^5 PBMC, na presença de soro autólogo e $10\mu\text{g/ml}$ de NiSO_4 ;
- Quanto maior o tempo de exposição ao aparelho ortodôntico, menor a sensibilidade ao teste cutâneo, independentemente da idade, em indivíduos do sexo feminino;
- Não houve produção significativa de citocinas $\text{IFN-}\gamma$ e IL-5 nos sobrenadantes coletados após 24 e 48 horas, das culturas de PBMC de pacientes sensíveis ao níquel.

ANEXOS

ANEXO 1

Relação dos pacientes estudados considerando sexo, idade, teste de sensibilidade cutânea ao níquel, tempo de exposição ao aparelho ortodôntico, história de alergia e manifestação clínica avaliada.						
PACIENTES	SEXO	IDADE ANOS	TESTE CONTATO	TEMPO EXP. MESES	H. ALÉRGICA	CLÍNICA
01	M	15,9	ND	33	NR	CONSIDERÁVEL
02	F	16,2	POSITIVO+	20	BRINÇOS	CONSIDERÁVEL
03	F	14,4	NEGATIVO	35	RESPIRAT.	BRANDA
04	F	16,1	POSITIVO+	36	BRINÇOS	BRANDA
05	F	17,5	NEGATIVO	32	NR	MODERADA
06	M	13,8	NEGATIVO	26	NR	BRANDA
07	M	14,4	NEGATIVO	27	RINITE	BRANDA
08	F	12,1	NEGATIVO	48	BRINÇOS	BRANDA
09	F	12,4	POSITIVO+	21	BRINÇOS	MODERADA
10	M	13,6	NEGATIVO	28	NR	BRANDA
11	M	14,5	NEGATIVO	40	NR	BRANDA
12	F	14,2	POSITIVO+	41	BRINÇOS	CONSIDERÁVEL
13	M	15,1	NEGATIVO	15	NR	CONSIDERÁVEL
14	F	17,2	NEGATIVO	31	BRINÇOS	BRANDA
15	F	14,2	POSITIVO+	46	BRINÇOS	MODERADA
16	F	15,1	POSITIVO+	31	BRINÇOS	MODERADA
17	F	16,1	POSITIVO+	38	BRINÇOS	CONSIDERÁVEL
18	F	16,2	NEGATIVO	26	BRINÇOS	MODERADA
19	M	17	NEGATIVO	48	NR	BRANDA
20	F	15,1	NEGATIVO	49	NR	CONSIDERÁVEL
21	F	16,1	ND	33	NR	BRANDA
22	F	16,2	NEGATIVO	19	BRINÇOS	CONSIDERÁVEL
23	F	16,2	POSITIVO+	25	BRINÇOS	BRANDA
GRUPO CONTROLE						
24	F	16,2	NEGATIVO	30	NR	NORMAL
25	M	17,2	NEGATIVO	34	NR	NORMAL
26	M	17,2	NEGATIVO	41	NR	NORMAL
27	F	18,2	NEGATIVO	30	NR	NORMAL
28	F	17	NEGATIVO	16	NR	NORMAL
29	M	17	NEGATIVO	23	NR	NORMAL
30	M	17,2	NEGATIVO	12	NR	NORMAL
31	F	17,2	NEGATIVO	45	NR	NORMAL
32	M	17,2	NEGATIVO	32	NR	NORMAL

*OBS: F – Feminino; M – Masculino; ND – Não realizado; NR – Não relatado



UNICAMP

ANEXO 2

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CEP – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DO CEP – FOP/UNICAMP

Comunicamos que o protocolo de Pesquisa referente ao Projeto:

Título do Projeto de Pesquisa:

"Avaliação do perfil imunológico de pacientes alérgicos ao níquel existentes em componentes dos aparelhos ortodônticos."

Pesquisador Orientador/Orientado:

Profs. Drs. Darcy Flávio Nouer e Lúcia Alves O. Fraga/ Marcelo Marigo

Apresentado a este Comitê para análise ética, segundo a Resolução CNS 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, de 10/10/96, e de acordo com cópia do projeto arquivada em nossa secretaria, foi considerado:

Aprovado.

Aprovado com pendência, devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas em anexo para complementação da análise do Projeto.

Com pendência.

Reprovado.

Análise e parecer do relator (com resumo do projeto):

Neste trabalho pretende-se analisar comparativamente a resposta imunológica de pacientes, sob tratamento ortodôntico, ao níquel proveniente dos aparelhos metálicos usados nesta terapia. Pretende-se compreender melhor a resposta imune ao níquel e estabelecer parâmetros imunológicos para um diagnóstico diferencial de pacientes portadores ou não de hipersensibilidade ao níquel quando submetidos ao tratamento ortodôntico. O projeto tem uma preocupação com os níveis de intoxicação por metais que já são observados clinicamente em pacientes com aparelhos ortodônticos metálicos, bem como as reações de hipersensibilidade ao níquel, cujas manifestações clínicas comprometem a saúde bucal do paciente. Recomendamos a aprovação por entender que o mesmo atende às exigências da Resolução CNS 196/96.


CEP-FOP/UNICAMP

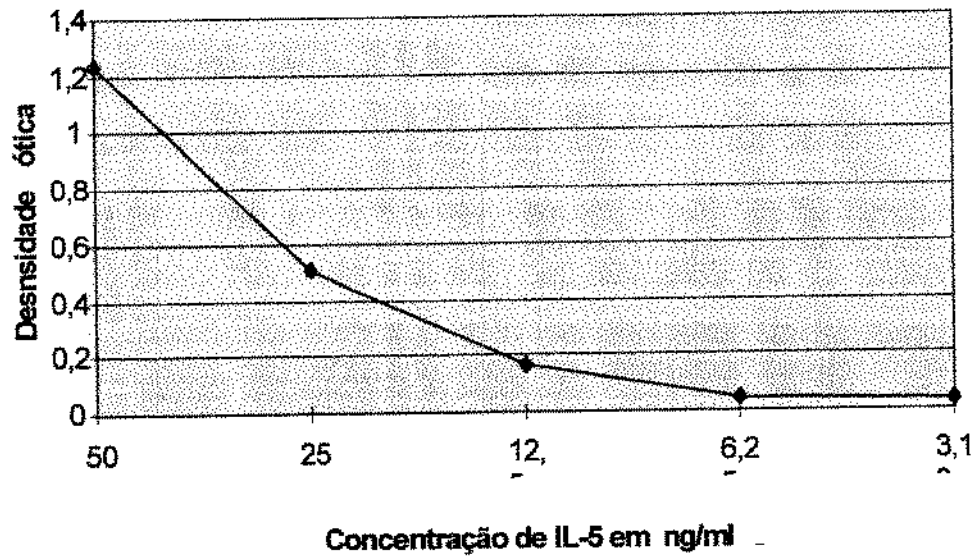
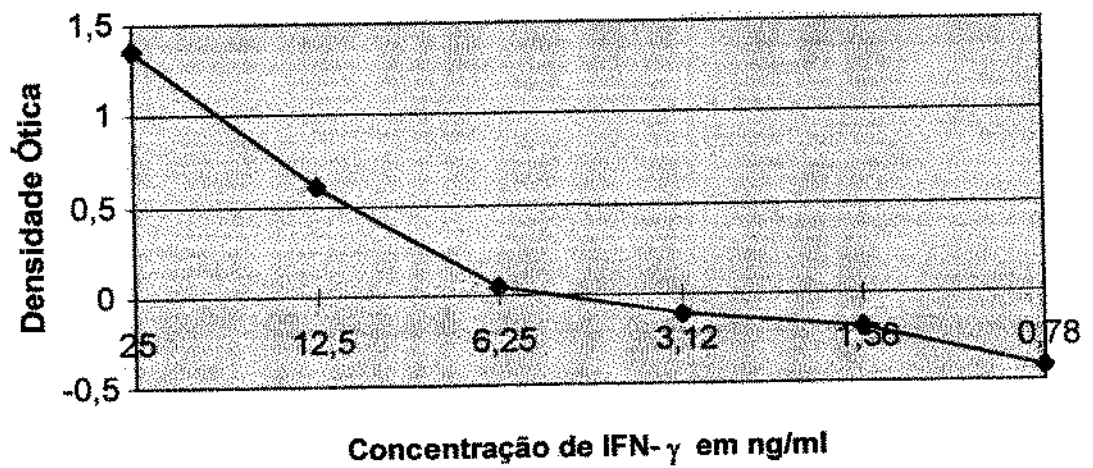
ANEXO 3

Dosagem espectrofotométrica de metais (Ni, Co, Cr) provenientes da corrosão de aparelhos ortodônticos fixos em solução salina durante 7, 30 e 60 dias.				
Aparelhos ortodônticos (montagens)	Tempo de corrosão em dias	METAL LIBERADO (µg/ml)		
		Ni	Co	Cr
A	7	3,86	-	-
B	7	3,16	-	-
C	7	3,88	-	-
D	7	4,76	-	-
A	30	15,36	-	-
B	30	20,00	-	-
C	30	17,30	-	-
D	30	26,00	-	-
A	60	30,23	0,31	<0,04*
B	60	30,50	0,30	<0,04*
C	60	4,75	0,30	<0,04*
D	60	40,23	0,45	<0,04*

*0,04 é o limite de detecção do aparelho de espectrofotometria de absorção atômica usado.

ANEXO 4

Curva Padrão IL-5

Curva Padrão de IFN- γ 

ANEXO 5

Quadro de análise de variância referente à figura IV.2 e IV.4

CAUSA DE VARIAÇÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR HOMEM	1	3,1211	3,1211	6,1061 *
FATOR SORO	1	2,8224	2,8224	5,5217 *
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	5,7634	2,8817	5,6377 **
FATOR HOMEMxSORO	1	2,0164	2,0164	3,9449 NS
FATOR HOMEMxCONCENTRAÇÃO	2	0,7609	0,3805	0,7443 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	4,1042	2,0521	4,0147 *
FATOR HOMEMxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	1,3411	0,6706	1,3119 NS
(TRATAMENTOS)	11	19,9295	1,8118	
RESÍDUO	24	12,2675	0,5111	

Desvio Padrão = 0,7149 Coeficiente de Variação = 56,8921

Quadro de análise de variância referente à figura IV.3 e IV.5

CAUSA DE VARIAÇÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR MULHER	1	44,8345	44,8345	4,1823 *
FATOR SORO	1	2,7292	2,7292	0,2546 NS
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	16,2336	8,1168	0,7572 NS
FATOR MULHERxSORO	1	3,2102	3,2102	0,2995 NS
FATOR MULHERxCONCENTRAÇÃO	2	3,2385	1,6193	0,1511 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,7240	0,3620	0,0338 NS
FATOR MULHERxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,4581	0,2290	0,0214 NS
(TRATAMENTOS)	11	71,4282	6,4935	
RESÍDUO	84	900,4843	10,7201	

Desvio Padrão = 3,2741 Coeficiente de Variação = 154,7832

Quadro de análise de variância referente à figura IV.6 e IV.8

CAUSA DE VARIAÇÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR Nº CÉLULAS	1	6,0435	6,0435	12,6529 **
FATOR SORO	1	2,2280	2,2280	4,6646 *
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	4,3574	2,1787	4,5614 *
FATOR Nº CÉLULASxSORO	1	3,3174	3,3174	6,9455 *
FATOR Nº CÉLULASxCONCENTRAÇÃO	2	1,9201	0,9600	2,0100 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	2,0484	1,0242	2,1443 NS
FATOR Nº CÉLULASxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	3,9078	1,9539	4,0907 *
(TRATAMENTOS)	11	23,8227	2,1657	
RESÍDUO	30	14,3292	0,4776	

Desvio Padrão = 0,6911 Coeficiente de Variação = 62,0894

Quadro de análise de variância referente à figura IV.7, IV.9, IV.10 e IV.15

CAUSA DE VARIACÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR Nº CÉLULAS	1	8,1135	8,1135	0,6317 NS
FATOR SORO	1	5,5639	5,5639	0,4332 NS
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	41,1212	20,5606	1,6007 NS
FATOR Nº CÉLULASxSORO	1	33,6692	33,6692	2,6213 NS
FATOR Nº CÉLULASxCONCENTRAÇÃO	2	0,5990	0,2995	0,0233 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	10,0712	5,0356	0,3920 NS
FATOR Nº CÉLULASxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	9,7075	4,8537	0,3779 NS
(TRATAMENTOS)	11	108,8456	9,8951	
RESÍDUO	84	1078,9527	12,8447	

Desvio Padrão = 3,5839 Coeficiente de Variação = 148,1289

Quadro de análise de variância referente à figura IV.11, IV.12 e IV.13

CAUSA DE VARIACÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR SEXO	1	22,8463	22,8463	5,7642 *
FATOR SORO	1	9,4252	9,4252	2,3780 NS
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	10,4533	5,2266	1,3187 NS
FATOR SEXOxSORO	1	11,9647	11,9647	3,0187 NS
FATOR SEXOxCONCENTRAÇÃO	2	6,2809	3,1404	0,7923 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	4,6417	2,3208	0,5855 NS
FATOR SEXOxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	8,0134	4,0067	1,0109 NS
(TRATAMENTOS)	11	73,6253	6,6932	
RESÍDUO	48	190,2484	3,6935	

Desvio Padrão = 1,9909 Coeficiente de Variação = 129,2484

Quadro de análise de variância referente à figura IV.14

CAUSA DE VARIACÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR SEXO	1	16,5581	16,5581	1,2102 NS
FATOR SORO	1	0,3270	0,3270	0,0239 NS
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	17,8944	8,9472	0,6539 NS
FATOR SEXOxSORO	1	10,7143	10,7143	0,7831 NS
FATOR SEXOxCONCENTRAÇÃO	2	0,1396	0,0698	0,0051 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	4,3248	2,1624	0,1580 NS
FATOR SEXOxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	3,6963	1,8482	0,1351 NS
(TRATAMENTOS)	11	53,6546	4,8777	
RESÍDUO	66	903,0334	13,6823	

Desvio Padrão = 3,6990 Coeficiente de Variação = 154,6190

Quadro de análise de variância referente à figura IV.16a

CAUSA DE VARIACÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR SEXO	1	0,4734	0,4734	2,0082 NS
FATOR SORO	1	0,0159	0,0159	0,0674 NS
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	0,3963	0,1981	0,8406 NS
FATOR SEXOxSORO	1	0,0077	0,0077	0,0325 NS
FATOR SEXOxCONCENTRAÇÃO	2	0,0521	0,0260	0,1104 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,0120	0,0060	0,0255 NS
FATOR SEXOxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,3512	0,1756	0,7450 NS
(TRATAMENTOS)	11	1,3084	0,1189	
RESÍDUO	66	9,8997	0,2357	

Desvio Padrão = 0,4855 Coeficiente de Variação = 60,4215

Quadro de análise de variância referente à figura IV.16b

CAUSA DE VARIACÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR SEXO	1	0,8802	0,8802	3,8040 NS
FATOR SORO	1	0,0404	0,0404	0,1748 NS
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	3,3624	1,6812	7,2657 **
FATOR SEXOxSORO	1	0,0098	0,0098	0,0425 NS
FATOR SEXOxCONCENTRAÇÃO	2	0,0923	0,0461	0,1994 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,9346	0,4673	2,0196 NS
FATOR SEXOxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,0047	0,0023	0,0101 NS
(TRATAMENTOS)	11	5,3244	0,4840	
RESÍDUO	42	9,7183	0,2314	

Desvio Padrão = 0,4810 Coeficiente de Variação = 42,0929

Quadro de análise de variância referente à figura IV.17

CAUSA DE VARIACÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR HOMEM	1	0,2162	0,2162	2,1678 NS
FATOR SORO	1	0,0034	0,0034	0,0341 NS
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	0,0267	0,0133	0,1338 NS
FATOR HOMEMxSORO	1	0,0084	0,0084	0,0842 NS
FATOR HOMEMxCONCENTRAÇÃO	2	0,2234	0,1117	1,1199 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,0916	0,0458	0,4593 NS
FATOR HOMEMxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,1028	0,0514	0,5154 NS
(TRATAMENTOS)	11	0,6726	0,0611	
RESÍDUO	24	2,3939	0,0997	

Desvio Padrão = 0,3158 Coeficiente de Variação = 42,1879

Quadro de análise de variância referente à figura IV.18

CAUSA DE VARIACÃO	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
FATOR MULHER	1	0,7191	0,7191	1,5028 NS
FATOR SORO	1	0,0360	0,0360	0,0752 NS
FATOR CONCENTRAÇÃO	2	0,1642	0,0821	0,1716 NS
FATOR MULHERxSORO	1	0,0106	0,0106	0,0221 NS
FATOR MULHERxCONCENTRAÇÃO	2	0,7802	0,3901	0,8152 NS
FATOR SOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,2161	0,1080	0,2258 NS
FATOR MULHERxSOROxCONCENTRAÇÃO	2	0,1404	0,0702	0,1467 NS
(TRATAMENTOS)	11	2,0666	0,1879	
RESÍDUO	84	40,1954	0,4785	

Desvio Padrão = 0,6917 Coeficiente de Variação = 70,4817

SUMMARY

SUMMARY

Allergies related to dentistry generally are delayed hypersensitivity reactions to specific dental materials particularly to nickel. Clinical reactions to this metal from orthodontic appliances include gingival edema, hypertrophy, bleeding, swollen, fissure lips and chronic eczema of the cheeks. The main diagnostic test for nickel allergy is the Patch test, which can give false negative results. The purpose of this study was established immunological parameters for differential diagnosis using patients in extensive orthodontic treatment and with clinical history to nickel hypersensitivity. We use lymphocyte proliferation test using nickel leached from orthodontic metal appliances and $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and ELISA for cytokines on the supernatant of cultured cells to detect the involvement of Th1 and Th2 subset. The results showed that $10\mu\text{g/ml}$ of NiSO_4 solution was more effective to stimulate PBMC from patients with oral clinical manifestation when compared with 5 and $2.5\mu\text{g/ml}$ of NiSO_4 solutions. On the other hand, nickel solutions obtained from orthodontic metal appliances inhibited the proliferative PBMC response to the same patients in a dose-dependent manner. Statistical analysis showed a positive correlation between persons with clinical manifestation and the PBMC proliferation test. Finally, results showed no IL-5 and $\text{IFN-}\gamma$ production on the supernatant of PBMC cells stimulated with either nickel solutions in those specific conditions used in our assays.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1- AL-TAWIL, N.G.; MARCUSSON, J. A.; MOLLER, E. Lymphocyte Transformation test in patients with nickel sensitivity: An aid to diagnosis. *Acta Dermatovenex*, Stockholm, v.61, p. 511-515,1981.
- 2- ANGELINI , G.; et. al. Allergia da contatato al nickel. *Giorn. It. Derm. Vener.*, v.121, n.2, p. 121-125, Mar./Apr.1986.
- 3- ASPEGREN, N. ; RORSMAN, H. Short-term culture of leucocytes in nickel hypersensitivity. *Acta Dermato-Venereologica*, v.42, p. 412-417,1962.
- 4- BACH, F.; HIRSCHHORN, K. Lymphocyte interation: A potential histocompatibility test in vitro. *Science*, v.143, p.813-814, Jan. 1964.
- 5- BARRET, R. D.; BISHARA, S.E.; QUINN, J.K. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, v.103, p. 8-14, Jan. 1993.
- 6- BASS, J. K.; FINE, H.; CISNEROS, G.J. Nickel hypersensitivity the orthodontic patient. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, v.103, n. 3, p.280-285, Mar. 1993.
- 7- BENCKO, V. Nickel: A review of its occupational and environmental toxicology. *J. Hygiene Epidemiology, Microbiology and Immunology*, v.27, n.2,p. 237-247,1983.
- 8- BENNETT, B. G. Exposure of man to environmental nickel - An exposure commitment assessment. *The Science of the total Environment*, Amsterdam, v.22, n.3, p.203-212, 1982.
- 9- BISHARA, S. E. Oral lesions caused by an orthodontic retainer: A case report. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*,V.108,n. 2, p.115-117, Aug.1995.

*

De acordo com a N.B.R 6023 da Associação Brasileira de Normas técnicas (ABNT) de Agosto de 1989.

- 10- _____; BARRETT, R. D.; SELIM, M. I. Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood of nickel. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v.103, n.2, p. 115-119, Feb.1993.
- 11-BLANCO-DALMAU, L.; CARRASQUILLO-ALBERTTY, H.; SILVA-PARRA, J. A study of nickel allergy. **J. Prosthet. Dent.**, v.52, n.1, p.116-119, Jul.1984.
- 12-BONNEVIE, P. Aetiologie und Pathogenese der Eczemkrankheiten. Busch, Kopenhagen und Barth, Leipzig. 1939. *Apud* MARCUSSEN, P. V. *Op.cit.* **Ref. 43.**
- 13-BURDEN, D. J.; EEDY, D. J. Orthodontic headgear related to allergic contact dermatitis: a case report. **Br. Dent. J.**, v.170, n. 2, p. 447-448, Jun. 1991.
- 14-CARVALHO, L. P. Eczemas por contato. In: NEGREIROS, B; UNGIER, C. **Alergologia Clínica.** Rio de Janeiro: Atheneu, 1995. Cap. 7, p.350-361.
- 15-COOMBS, R. R.; GELL, P. G. H. Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease, In : Clinical Aspects of Immunology (Eds P.G.H. Gell, R. R. Coombs and P. J. Lachmann) Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1975, p. 761. *Apud* HILDEBRAND, H. F.; *et al.* *Op cit.* **Ref. 31.**
- 16-DIÓGENES, M. J. N.; *et al.* Nickel contact dermatitis in Fortaleza, Ceará, Brazil (1993-1994). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 39, n. 5, p. 291-292, 1997.
- 17-DUNLAP, C. L.; VICENTE, S. K.; BARKER, B. F. Allergic reaction to orthodontic wire: report of case. **J. Am.Dent. Assoc.**, v.118, n.4, p. 449-450, Apr. 1989.
- 18-EGGLESTON, D. W. Effect of dental amalgam and nickel alloys on T-lymphocytes: Preliminary report. **J. Prosthet. Dent.**, v. 51, n.5, p.617-623, May, 1984.
- 19-EVERNESS, K. M.; *et al.* The discrimination between nickel-sensitive and non-nickel-sensitive subjects by an in vitro lymphocyte transformation test. **Br. J. Dermatol.**, v.122, n.3, p. 293-298, Mar., 1990.
- 20-FEASBY, W. H.; ECCLESTONE, E. R.; GRAINGER, R. M. Nickel sensitivity in dental patients. **Pediatr. Dentistry**, v.10, n. 2, p. 127-129, Jun. 1988.

- 21-FISHER, A. A. Allergic Contact Dermatitis in Early Infancy. *Cutis*, v. 35, n. 4, p. 315-316, 1985.
- 22- _____; SHAPIRO, A. Allergic eczematous contact dermatitis due to metallic nickel. *J.A.M.A.*, v. 161, n.8, p. 717-721, Jun. 1956.
- 23-FRANZ, G. The frequency of allergy to dental materials. *J. Dent. Assoc. S. Afr.*, v.37, p. 805-810, Dec. 1982.
- 24-GAZZINELLI, G.; et al. Immune responses during human shistosomiasis mansoni.VIII. Diferential in Vitro Cellular Responsiveness to Adult Worm and Schistosomular Tegumental Preparations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 32, n. 2, p. 326-333, 1983.
- 25-GIMENEZ-CAMARASA, J. M.; et al. Lymphocyte transformation test in allergic contact nickel dermatitis. *Br. J. Dermatol.*, v.92, n. 9, p.9-15,1975.
- 26-GJERDET, N. R.; HERO, H. Metal release from heat-treated orthodontic archwires. *Acta Odontol. Scand.*, v.45, n. 6, p. 409-414, Dec. 1987.
- 27-GREIG, D. G. M. Contact dermatitis reaction to a metal buckle on cervical headgear. *Br. Dent. J.*, v. 155, n. 4, p. 61-62, Aug. 1983.
- 28-GREPPI, A. L.; SMITH, D. C.; WOODSIDE, D. G. Nickel hypersensitivity reations in orthodontic patients: A literature review. *Univ. Tor. Dent. J.*, v.3, n.1, p. 11-14, 1981.
- 29-GRIMSDOTTIR, M. R.; GJERDET, N. R.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Composition and in vitro corrosion of orthodontic appliances. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.*, v.101, n. 6, p. 525-532, Jun. 1992.
- 30- _____; HENSTEN-PETTERSEN, A; KULLMANN, A. Proliferation of nickel-sensitive human lymphocytes by corrosion products of orthodontic appliances. *Biomaterial*, v. 15, n. 14, p. 1157-1160, 1994.
- 31-HILDEBRAND, H. F.; VERON, C.; MARTIN, P. Nickel, Chromium, Cobalt dental alloys and allergic reactions: An overview. *Biomaterials*, v. 10, n. 8, p. 545-548, Oct. 1989.

- 32-HUTCHINSON, F.; RAFFLE, J.; MACLEOD, T. M. The specificity of lymphocyte transformation in vitro by n salts in nickel sensitive subjects. **J. Invest. Dermatology**, v. 58, n.6, p. 362-365, 1972.
- 33-JACOBSEN, N.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Occupational health problems and adverse patient reactions in orthodontics. **European J. Orthod**, v. 11, p. 254-264, 1989.
- 34-JANSON, G.; et al. Nickel hypersensitivity reaction study before, during and after orthodontic therapy. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v.113, n. 6, p. 655-660, Jun. 1998.
- 35-JONES, T. K.; et al. Dental implications of nickel hypersensitivity. **J. Prosthet. Dent.**, v. 56, n. 4, p. 507-509, Oct. 1986.
- 36-KALKWARF, K. L. Allergic gingival Reaction to Esthetic Crowns. **Quintessence Int.**, v. 15, n. 7, p.741-745, Jul. 1984.
- 37-KEROSUO, H.; et al. Nickel allergy in adolescents in relation to orthodontic treatment and piercing of ears. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 109, n.2, p.148-154, Feb. 1996.
- 38-_____; MOE, G.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Salivary nickel and chromium in subjects with different types of fixed orthodontic appliances. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 111, n.6, p. 595-598, Jun.1997.
- 39-LENZA, M. A.; et al. Prevalência de Hipersensibilidade ao níquel em pacientes sob tratamento ortodôntico. **Rev. Fac. Odontol. Univ. Fed. Goiás**, v. 1, n. 1, p.13-17, jul/dez.1997.
- 40-LUNDE, M, N.; et al. Serological differences between acute and chonic schistosomiasis mansoni detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), **Am. J. Tropical Medicine & Hygiene**, v. 28, n. 1, p. 87-91, Jan., 1979.
- 41-MAIJER, R.; SMITH, D. C. Biodegradation of the orthodontic bracket system. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 90, n. 3, Sep. 1986.
- 42-MALVISH A.E.; STRONG M. Lymphocyte Proliferation. In: Rose N. R.; Friedman H.; Fahey J. L. **Manual of Clinical**

- Laboratory Immunology.** Washington, D.C.: Ass. Society Microb., 1986. Chapter 38, p. 274-281.
- 43-MARCUSSEN, P. V. Specificity of patch tests with 5% nickel sulphate. **Acta Derm.Venereol.**, v. 39, p. 187-195, 1959.
- 44-MENEZES, L. M.; et al. Reação alérgica em paciente ortodôntico: um caso clínico. **Ortodontia Gaúcha**, v. 1, n. 1, p. 51-56, abr. 1997.
- 45-MENNÉ, T.; et al. Patch test reactivity to nickel alloys. **Contact Dermatitis**, v. 16, p. 255-259, 1987.
- 46-MILLIKAN, L. E.; CONWAY, B. A.; FOOTE, J. E. In vitro studies of contact hypersensitivity: Lymphocyte transformation in nickel sensitivity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 60, n. 2, p. 88-90, 1973.
- 47-MIRANDA, F. J.; DUNCANSON, M. G. The allergenic potential of metals in dental alloys. **Natl. Dental Assoc. J.**, v. 42, p. 25-38, 1985.
- 48-MOFFA, J. P. Biocompatibility of nickel based dental alloys. **CDA Journal**, v. 12, n. 10, p. 45-51, oct. 1984.
- 49-_____ ; ELLISON, J. E.; HAMILTON, J. C. Incidence of nickel sensitivity in dental patients. **J. Dent. Res.**, v. 62, p. 199, 1983. (Abstract , 271)
- 50-MORGAM, J.G. Some observations on the incidence of respiratory cancer in nickel workers. **Br. J. Industr. Med.**, v.15, p.224-234, 1958. Apud MOFFA, J. P., *Op. Cit.* Ref. 48.
- 51-MORTEN, B.; GJERDET, N. R.; ERICHSEN, E. S. Corrosion of silver soldered orthodontic wires. **Acta odontol. Scand.**, v.40, p. 75-79, 1982.
- 52-PAPPAS, A.; ORFANOS, C. E.; BERTRAN, R. Non-specific lymphocyte transformation in vitro by nickel acetate. **J. Invest. Dermat.**, v. 55, n. 3, p. 198-200, 1970.
- 53-PARK, H. Y.; SHEIARER, T. R. In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. **Am. J. Orthod.**, v. 84, n. 2, p. 156-159, Aug. 1983.
- 54-PELTONEN, L. Nickel sensitivity in the general population. **Contact Dermatitis**, v.5, n. 1, p. 27-32, Jan. 1979.

- 55-PLATT, J. A .; et al. Corrosion behavior of 2205 duplex stainless steel. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 112, n. 1, p. 69-79, July 1997.
- 56-PRYSTOWSKY, S. D.; et al. Allergic Contact Hypersensitivity to Nickel, Neomycin, Ethylenediamine, and Benzocaine. **Arch Dermatol.**, v. 115, n. 8, p. 959-962, Aug. 1979.
- 57-SHELLEY, B. W. Gengival Hyperplasia from Dental Braces. **Cutis**, v. 28, p. 149-150, Aug.1981.
- 58-SILVENNOINEN-KASSINEN, S. Lymphocyte Transformation in Nickel Allergy: Amplification of T-lymphocyte Responses to Nickel Sulphate by Macrophages in Vitro. **Scand. J. Immunol.**, v. 12, p. 61-65, 1980.
- 59-SILVENNOINEN-KASSINEN, S. The Specificity of a Nickel Sulphate Reaction in Vitro: a Family Study of Chromium-allergic Subjects. **Scand. J. Immunol.**, v. 13, p. 231-235, 1981.
- 60-STARKJAER L. & MENNÉ T. Nickel allergy and orthodontic treatment. **Europ. J. Orthod.**,v.12, p. 284-289,1990.
- 61-SVEJGAARD, E.; et al. Transformation induced by nickel sulphate: An in vitro study of subjects with and without a positive nickel patch test. **Acta Dermatovener (Stockholm)**, v. 58, p. 245-250, 1978 .
- 62-VAN LOON, L.; et al. T-lymphocyte and Langerhans cell distribution in normal and allergically induced oral mucosa in contact with nickel-containing dental alloys. **J. Oral Pathol.**, v. 17, n. 3, p. 129-137, 1988.
- 63-VEIEN, N. K.; et al. Contact dermatitis in children. **Contact Dermatitis**, v. 8, n. 6 , p. 373-375, 1982.
- 64-_____ ; et al. Dietary Treatment of Nickel Dermatitis. **Acta Dermatovener (Stockholm)**, v. 65, n. 2, p. 138-142, 1985.
- 65-VIANA I.R.C.; et al. Interferon Gamma Production by peripheral Blood Mononuclear Cells From Residents of Area Endemic for Schistosoma Mansoni. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, V. 88, p. 466-470, 1994.

- 66-VREEBUR, K. J. J.; *et al.* Induction of Immunological Tolerance by Oral Administration of Nickel and Chromium. **J. Dent. Res.**, v. 62, n. 2, p. 124-128, Feb. 1984.
- 67-WICHELHAUS, A; CULUM, T.; SANDER, F. G. Investigaciones relacionadas con la composición de la superficie de las aleaciones que se utilizan en ortodoncia, con una consideración especial para el porcentaje que contienen de níquel. **Ver. Esp. Ortod.**, v. 27, p. 45-60, 1997.