

CONTRIBUIÇÃO PARA A AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE LIGAS DE CROMO-NÍQUEL PELO ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DAS REAÇÕES TECIDUAIS EM CONJUNTIVO DE RATOS

Maximiliano Piero NEISSER*
Yasmin Rodarte CARVALHO**
Henrique CERVEIRA NETTO*

- **RESUMO:** A finalidade de nosso trabalho experimental foi a avaliação histológica das reações teciduais que 3 ligas metálicas de cromo-níquel pudessem causar no tecido conjuntivo de ratos, bem como sugerir uma região alternativa para a implantação dos corpos-de-prova. A avaliação microscópica mostrou, na grande maioria dos casos, encapsulamento dos implantes e escasso infiltrado inflamatório. Em alguns casos verificamos ora pequena quantidade de pigmento finamente granular, ora a formação de grumos grosseiros, e até algumas estruturas de aspecto cristalino e coloração esverdeada. Em apenas 1 dos casos verificamos um espessamento da cápsula devido à intensa reação inflamatória crônica do tipo granuloma por corpo estranho. Estes fatos nos levaram a concluir que as 3 ligas ensaiadas apresentaram resultados variáveis. Com relação à região escolhida para a localização dos implantes, esta mostrou-se satisfatória, tanto pelo acesso quanto pela facilidade de localização quando da remoção dos corpos-de-prova.
- **UNITERMOS:** Histocompatibilidade; ligas dentárias; ligas metálicas.

Introdução

Ligas metálicas contendo níquel não são novidade na Odontologia. Desde a década de 1930 as ligas de cromo-níquel têm sido utilizadas para base de dentaduras e armações de próteses parciais removíveis. O custo elevado do ouro e outros metais preciosos tem sido parcialmente responsável pelo desenvolvimento de ligas não-nobres em prótese parcial fixa, constituídas principalmente por cromo e níquel, este último variando de 69% a 81%.

* Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese - Faculdade de Odontologia - UNESP - 12245-000 - São José dos Campos - SP.

** Departamento de Patologia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 12245-000 - São José dos Campos - SP.

Segundo Blanco-Dalmau,⁵ muitos dos metais comumente utilizados em Odontologia são reconhecidamente alergênicos. Entre eles, o autor cita o cromo, o cobalto, o mercúrio e o níquel.

Mitchell et al.¹⁴ estudaram a resposta do tecido subcutâneo de ratos em vários materiais, entre os quais ligas contendo níquel. Vários animais desenvolveram sarcomas ao redor dos implantes destas ligas.

Seltzer et al.,²² em estudos longitudinais em cães, detectaram a presença de cromo, cobalto e níquel no tecido ósseo adjacente a implantes com liga Vitallium. Tais achados, evidenciados por espectroscopia de raios X, demonstraram o desprendimento de produtos de corrosão da liga para os tecidos vivos, o que os autores chamaram de "metalose", acreditando ser responsável pelo início da resposta inflamatória.

Garcia et al.,⁸ estudando a mesma liga, avaliaram sua biocompatibilidade pela formação e reabsorção óssea. Embora a liga não tenha acelerado a reabsorção, foi responsável pela inibição da formação óssea da ordem de 12%.

Mitchell¹⁵ relatou que botões e zíperes contendo níquel também podem induzir sensibilidade; a prevalência de hipersensibilidade é de 10% em mulheres contra 1% em homens. Ressaltou que não são recomendados testes de contato, rotineiramente realizáveis em pacientes sensíveis. Sugere que, quando houver suspeita de sintomatologia clínica, o paciente deva ser encaminhado ao alergista ou dermatologista para os testes devidos.

Alle et al.² estudaram a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos frente a implantes de várias ligas metálicas. Afirmaram que o organismo reage a corpos estranhos, expulsando-os ou isolando-os pela formação de cápsula.

Pode-se afirmar que toda liga metálica contendo níquel provoca uma reação tecidual que merece nossa atenção, devendo ser estudada criteriosamente, tanto do ponto de vista clínico quanto sob a luz da microscopia.

Frente à literatura consultada, é proposta deste trabalho de pesquisa analisar a reação do tecido conjuntivo de ratos quando da implantação de 3 diferentes ligas de cromo-níquel, e estudar uma região alternativa para implantação dos corpos-de-prova.

Material e métodos

Foram utilizados 30 ratos albinos da linhagem 2 BAW, adultos, fêmeas e com peso corpóreo médio de 200 gramas, divididos aleatoriamente em 3 grupos de 10 animais, um para cada liga utilizada. Cada grupo foi subdividido em 2 grupos de 5 animais, um para cada data estabelecida para o sacrifício.

Os tempos estudados foram 360 e 720 dias após implantação dos corpos-de-prova.

As ligas ensaiadas foram:

- Nicron G (Metalloy – Indústria e Comércio de Artigos para Prótese Ltda.)
- Resistal P (Degussa S. A.)

- Nicrodent L. A. (Litema – Com. e Ind. de Ligas Técnicas e Materiais Ltda.)

Foram fundidos, usinados e esterilizados 30 corpos-de-prova circulares com 4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura.

Foram feitas a tricotomia da região dorsal do membro posterior esquerdo, incisão, divulsão dos tecidos subcutâneos e implantação dos corpos-de-prova a uma distância mínima de 15 mm da incisão.

Os corpos-de-prova permaneceram durante os tempos determinados, não se constatando nada digno de nota. As observações foram feitas a cada semana, durante os 3 primeiros meses, e mensalmente após este período.

Para cada liga estudada, 5 animais foram sacrificados nos tempos de 360 e 720 dias por inalação de vapores de éter sulfúrico.

Retiraram-se os implantes metálicos, e o material foi fixado em formol a 10% durante 24 horas e processado como de rotina, incluído em parafina e cortado com cerca de 5 micrômetros de espessura e corado com hematoxilina-eosina. O estudo histológico foi realizado utilizando-se microscópio óptico comum.

Resultados

360 dias

Os cortes histológicos, obtidos dos tecidos onde foram implantados os corpos-de-prova das três ligas metálicas em teste, revelaram, decorridos 360 dias do implante, formação de cápsula fibrosa delgada em torno do implante, constituída por fibras colágenas dispostas em arranjo paralelo, com poucas células fusiformes de permeio (Figura 1). Em apenas três exemplares da Liga Nicrodent L. A., verificou-se pequena quantidade de pigmento negro, ora formando grumos grosseiros, ora na forma de grânulos finos. Esse material se localizava algumas vezes no citoplasma de células e outras no interstício. Este achado foi observado em todos os espécimes de Liga Nicron G, sendo que, para esta liga, foram visualizados, ainda, em três casos, fragmentos de material cristalino de coloração esverdeada na cápsula.

O infiltrado inflamatório crônico discreto foi um achado constante em todos os grupos deste período, enquanto em apenas um caso, para a liga Nicron G, foram observados raros eosinófilos em meio às células mononucleares.

720 dias

Os cortes histológicos, obtidos dos tecidos onde foram implantados os corpos-de-prova das três ligas metálicas em teste, revelaram, decorridos 720 dias do implante,

formação de cápsula fibrosa em torno do implante, constituída por fibras colágenas dispostas em arranjos paralelos, com poucas células fusiformes de permeio.

Foi observado pequeno infiltrado inflamatório com raras células mononucleares. Em um dos exemplares da Liga Nicrodent L. A., observou-se pequena quantidade de pigmento negro, finamente granular, localizado ora intracelularmente, ora no interstício (Figura 2).

Para a Liga Nicron G, foram observados, em todos os exemplares, fragmentos de material com aspecto cristalino e coloração esverdeada, circundados por macrófagos, linfócitos e raras células gigantes multinucleadas (Figura 3).

Apenas um exemplar da Liga Resistal P exibiu espessamento da cápsula devido a uma intensa reação inflamatória crônica do tipo granuloma por corpo estranho. Foi observada uma discreta fibrose na parte mais periférica deste infiltrado (Figura 4).

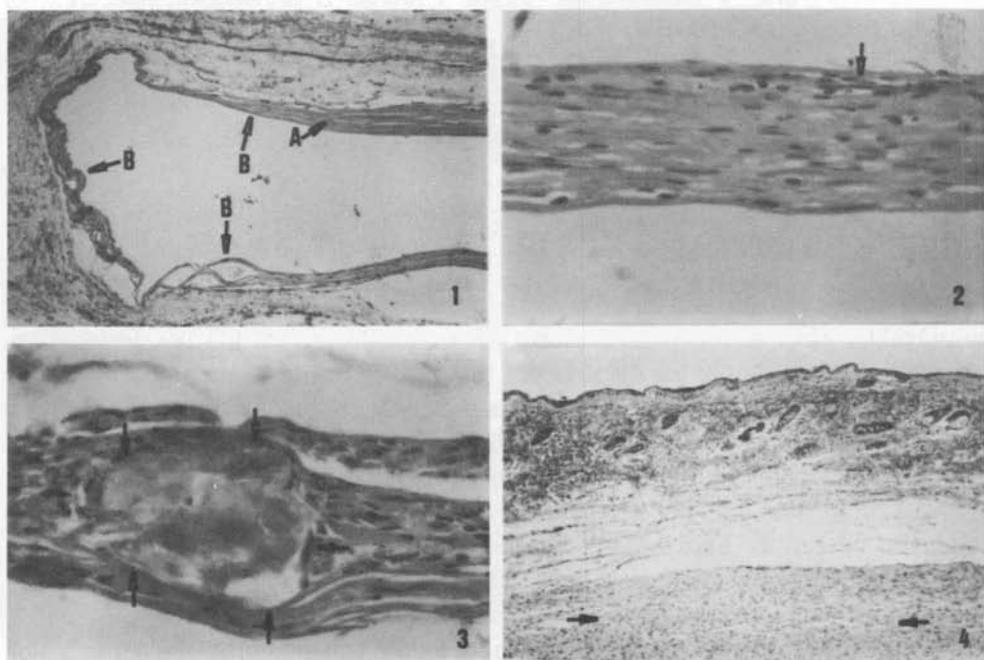


FIGURA 1 – Liga Resistal P – 360 dias. Cápsula fibrosa que envolve o corpo-de-prova (setas B) e presença de fibras colágenas em arranjo paralelo com poucas células de permeio (seta A). HE, 120X.

FIGURA 2 – Liga Nicrodent L. A. – 720 dias. Detalhe da cápsula fibrosa que envolve o corpo-de-prova e presença de pigmento finamente granular (seta). HE, 500X.

FIGURA 3 – Liga Nicron G – 720 dias. Presença de fragmento com aspecto cristalino no interior da cápsula (setas verticais) e células gigantes multinucleadas (seta horizontal). HE, 500X.

FIGURA 4 – Liga Resistal P – 720 dias. Reação inflamatória crônica na região da cápsula (entre setas horizontais). HE, 90X.

Discussão

Novos materiais são constantemente apresentados ao mercado odontológico. Para avaliar sua qualidade, são preconizados testes físicos, químicos e biológicos.

Do ponto de vista biológico, concordamos com Dixon & Rickert⁷ e Mitchell,¹³ que afirmaram ser a tolerância tecidual a mais importante qualidade de um material dentário.

Esta tolerância tecidual tem sido estudada e avaliada por vários autores,^{2,6,7,8,10,11,13,14,19,20,22} realizando testes de biocompatibilidade. A grande maioria desses autores, como ressaltam Lemmons & Natiella,¹² Piliero et al.²⁰ e Wilson,²⁵ acredita que o teste final deva ser realizado no ser humano.

Com a finalidade de reduzir o número de variáveis que poderiam influenciar a resposta tecidual aos implantes, optamos, como Tyas e Browne,²³ por animais de uma mesma linhagem genética.

Como a norma da American Dental Association, por meio de seu Conselho de Materiais Dentários,³ não estipula a espécie de animal a ser implantada, optamos pela facilidade de aquisição, hospedagem e alimentação, por ratos fêmeas. A mesma norma estabelecia a quantidade mínima de 3 animais para cada material estudado; optamos por utilizar 5 animais para cada liga ensaiada, pois o tempo de experimentação, sendo longo, poderia levar à morte prematura alguns animais.

A maioria dos autores consultados, que realizou experimentos semelhantes, aplicou os implantes na região dorsal dos animais. Entretanto, alguns autores relataram que vários implantes não foram recuperados quando do sacrifício dos animais.^{13,19} Para Johnson et al.¹⁰ a não-recuperação deveu-se a diversos fatores, tais como: morte do animal, rejeição do implante pelo organismo e possível deslocamento dos mesmos na região subdérmica.

No sentido de evitar este último fator, havemos por bem situar os implantes na região dorsal do membro posterior. Com isto pretendemos circunscrever a área, facilitando a busca pelo método táctil. Acreditamos que a escolha do membro posterior, em relação ao anterior, dificultaria ao animal atingir a área cirúrgica com seus dentes, o que poderia prejudicar o pós-operatório, pondo em risco o experimento.

Da mesma forma que Wennberg, Hasselgren & Tronstad,²⁴ preocupamo-nos com a possível influência da intervenção cirúrgica na resposta inflamatória. Procuramos, por meio da divulsão dos tecidos subcutâneos, posicionar os implantes a distância da ferida cirúrgica. Esta conduta já havia se mostrado eficiente, como demonstra o trabalho de Neisser & Carvalho.¹⁸

Os tempos de implantação seguiram a determinação do Conselho de Materiais Dentários da American Dental Association³ e a sugestão de Autian,⁴ em testes de longa duração, para produção de tumores e reação inflamatória crônica.

Os resultados macroscópicos foram corroborados pelos microscópicos, concordantes com alguns autores e discordantes de outros. Assim sendo, com relação aos resultados histológicos referentes à implantação dos corpos-de-prova por 360 dias,

obtivemos resultados que indicaram resposta favorável do tecido conjuntivo, com formação de cápsula fibrosa, escasso infiltrado inflamatório constituído por linfócitos e macrófagos, da mesma forma que Seltzer et al.²²

Encontramos o que De Deus et al.⁶ chamaram de "resíduos", tanto no interstício do tecido conjuntivo subjacente aos implantes quanto contido no citoplasma celular. Esses achados também foram observados, respectivamente, por Dixon & Rickert⁷ e Gjerdet, Kallus & Hensten-Pettersen.⁹

Estes últimos demonstraram, por espectroscopia por raios X, que as partículas eram metálicas. Estas partículas, para Seltzer et al.,²² seriam produtos de corrosão das ligas, permanecendo circunjacentes aos implantes e recebendo o nome de "metalose".

Os produtos de corrosão seriam os responsáveis pela maior ou menor resposta tecidual.

O encapsulamento, verificado para todas as ligas ensaiadas e em todos os tempos aplicados, foi concorde com os resultados obtidos por Akagawa et al.¹, após 42 e 84 dias.

Para a liga Nicron G, ensaiada por 720 dias, os achados histológicos são semelhantes aos de Keller e Marshall,¹¹ que encontraram células gigantes.

Mitchell et al.¹⁴ obtiveram resultados discordantes dos nossos, pois nos implantes de ligas que continham níquel, metade dos animais desenvolveram sarcomas que muitas vezes levaram à morte.

Rode,²¹ apesar de não ter utilizado ligas metálicas e sim resinas acrílicas, também pôde observar resposta favorável do tecido conjuntivo, com formação de cápsula fibrosa, sem inflamação e com pouca população celular.

Todos os implantes com liga Nicron G apresentaram, ao exame macroscópico e microscópico, grânulos e pontos escuros localizados ora no citoplasma celular, ora no interstício, além de grânulos esverdeados.

Para os implantes com liga Nicrodent L. A., três apresentaram pequena quantidade de pigmento negro no tempo de 360 dias. Para o tempo de 720 dias, apenas um apresentou pigmento negro, finamente granular.

A liga Resistal P mostrou o melhor comportamento. Em apenas um caso, aos 720 dias, houve espessamento da cápsula devido à intensa reação inflamatória crônica do tipo granuloma por corpo estranho. Esse achado confirma os testes de carcinogenicidade preconizados por Autian,⁴ que utilizou ratos por um período de 2 anos, podendo ser classificado, segundo Dixon & Rickert,⁷ de grau V (inflamação crônica ativa). Entretanto, devido ao fato de que nos demais quatro implantes não tenha ocorrido nada digno de nota, e somado ao fato de que o implante removido após o sacrifício do animal apresentava-se, ao exame macroscópico, liso e brilhante, podemos afastar a hipótese de reação tecidual frente liga ensaiada. Também pode ser afastada a hipótese de contaminação por dentada do próprio animal ou de seus companheiros, pois o achado histológico se encontrava distante da incisão e respectiva sutura. Dessa forma, parece-nos razoável concluir que tal reação possa ter sido devida à contaminação durante a manobra cirúrgica de colocação do implante.

Keller et al.¹¹ levantaram a possibilidade de alguns metais possuírem propriedade angiogênica, provavelmente modulada por macrófagos, os quais também produziram fator estimulador de fibroblastos que induziriam a produção do tecido fibroso da cápsula.

Este fato poderia ser uma explicação para a discreta fibrose, observada na parte mais periférica do infiltrado inflamatório em torno dos corpos-de-prova.

Embora Natiella e Fischman,¹⁷ à luz da microscopia eletrônica, pusessem em dúvida a formação da cápsula fibrosa como resposta favorável a um material implantado, não observamos, em nossa pesquisa, nenhuma anormalidade digna de nota.

Nossos resultados foram concordes com Oda,¹⁹ que demonstrou que o aumento do tempo de implantação resultou em tecidos fibrosos mais espessos e menos celulares.

Estamos de acordo com Mjor¹⁶ ao afirmar que, apesar da diversidade de métodos de teste e a uma falta de padronização de normas, é necessária a pesquisa da biocompatibilidade dos materiais odontológicos, além do estudo acurado de suas propriedades físicas e químicas.

Conclusão

De acordo com a metodologia por nós estudada, parece-nos lícito concluir que:

- Considerando a presença de irregularidade na superfície dos corpos-de-prova e de resíduos no tecido peri-implantar nos tempos estudados de 360 e 720 dias, como fatores desfavoráveis na biocompatibilidade de uma liga, julgamos que a liga Resistal P se comportou melhor, seguida pela liga Nicrodent L. A. Os resultados mais desfavoráveis foram observados na liga Nicron G.
- A região por nós escolhida para a implantação dos corpos-de-prova mostrou-se satisfatória, tanto pelo acesso no momento da inserção quanto pela facilidade de localização à palpação, quando do sacrifício dos animais para remoção dos implantes.

NEISSER, M. P., CARVALHO, Y. R., CERVEIRA NETTO, H. Contribution to the evaluation of chromium-nickel containing dental alloys by histomorphological study of reaction in connective tissues of rats. *Rev. Odontol. UNESP*, São Paulo, v. 22, n. 2 p.187-195, 1993.

- **ABSTRACT:** *The purpose of this in vivo experimental research was to evaluate histological tissue reactions as a result to inclusions of metal alloys in connective tissue of rats, as well as to suggest an alternative site for implantation of the samples. Most of samples showed implant incapsulation and paucity of inflammatory infiltrated. In a few cases we observed either thin granular pigments or lump formations and even in some of them, structures resembling greenish crystal formations. One of the cases presented extreme thickness of the capsule due to intense chronic inflammatory reaction of the type foreign body granuloma. This findings lead to the conclusion that the three tested alloys presented results that varied from favorable to unfavorable. The site of implantation was considered satisfactory. It permitted a thorough approach to surgical procedures of insertion and remotion of the implants.*
- **KEYWORDS:** *Biocompatible materials; dental alloys.*

Referências bibliográficas

1. AKAGAWA, Y. et al. Tissue reaction to implanted biomaterials. *J. Prosthet. Dent.*, v. 53, n. 5, p. 681, May 1985.
2. ALLE, N., MONDELLI, J., PEREIRA, J. C. Histocompatibilidade de ligas experimentais à base de cobre. *Rev. Bras. Odontol.*, v. 4, n. 3, p. 10-6, maio/jun. 1988.
3. AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. COUNCIL ON DENTAL MATERIALS AND DEVICES. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 84, n. 2, p. 382-7, Feb. 1972.
4. AUTIAN, J. General toxicity and screening tests for dental materials. *Int. Dent. J.*, v. 24, n. 2, p. 235-50, June 1974.
5. BLANCO-DALMAU, L. The nickel problem. *J. Prosthet. Dent.*, v. 48, n. 1, p. 99-101, July 1982.
6. DE DEUS, Q. D. et al. Resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de rato após implantes de ligas restauradoras odontológicas "duracast, idealoy, cromo-cobalto e ouro". *Arq. do Cent. Estud. do Curso Odontol. Univ. Fed. Minas Gerais*, v. 21/22, n. 211, p. 75-85, jul./dez. 1984, jan./jun. 1985.
7. DIXON, C. M., RICKERT, U. G. Tissue tolerance to foreign materials. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 20, n. 8, p. 1458-72, Aug. 1933.
8. GARCIA, D. A., SULLIVAN, T. M., O'NEILL, D. M. The biocompatibility of dental implant materials measured in an animal model. *J. Dent. Res.*, v. 60, n. 1, p. 44-9, Jan. 1981.
9. GJERDET, N. R., KALLUS, T., HENSTEN-PETTERSEN, A. Tissue reactions to implanted orthodontic wires in rabbits. *Acta Odontol. Scand.*, v. 54, n. 3, p. 163-9, June 1987.
10. JOHNSON, H. J. et al. Biocompatibility test procedures for materials evaluation *in vitro*. 2. Objective methods of toxicity assessment. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 19, p. 489-508, 1985.
11. KELLER, J. C. MARSHALL, G. W., KAMINSKI, E. J. An *in vivo* method for the biological evaluation of metal implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 18, p. 829-44, 1984.

12. LEMMONS, J., NATIELLA, J. Biomaterials, biocompatibility and peri-implant considerations. *Dent. Clin. North Am.*, v. 30, n. 1, p. 3-23, Jan. 1986.
13. MITCHELL, D. F. The irritational qualities of dental materials. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 59, n. 5, p. 954-66, Nov. 1959.
14. MITCHELL, D. F. SHANKWALKER, G. B., SHAZER, S. Determining the tumorigenicity of dental material. *J. Dent. Res.*, v. 39, n. 5, p. 1023-28, Sept./Oct. 1960.
15. MITCHELL, E. W. The biocompatibility of metals in dentistry. *J. Calif. Dent. Assoc.*, v. 12, n. 10, p. 17-9, Oct. 1984.
16. MJOR, I. A. Current views on biological testing of restorative materials. *J. Oral Rehabil.*, v. 17, n. 6, p. 503-7, Nov. 1990.
17. NATIELLA, J., FISCHMAN, S. L. Resins as dental implants. *Dent. Clin. North Am.*, v. 19, n. 2, p. 419-24, Apr. 1975.
18. NEISSER, M. P., CARVALHO, Y. R. Biocompatibilidade de algumas ligas de Cr-Ni: estudo experimental em ratos. *Rev. Assoc. Paul. Cirurg. Dent.*, v. 43, n. 5, p. 261-4, set./out. 1989.
19. ODA, M. *Contribuição ao estudo histomorfológico das reações teciduais em conjuntivo de dorso de ratos (Rattus norvegicus, albinus - Rodentia mammalia), frente ligas não-nobres de cobre-alumínio e níquel-cromo; e associadas ao amálgama de prata.* São Paulo, 1990. 81p. Dissertação (Mestrado em Dentística) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
20. PILIERO, S. J. et al. Biocompatibility evaluation of casting alloys in hamsters. *J. Prosthet. Dent.*, v. 41, n. 2, p. 220-3, Feb. 1979.
21. RODE, S. M. *Contribuição para o estudo da biocompatibilidade de resinas acrílicas, termicamente ativada (rosa e incolor) e fotopolimerizável: teste biológico em tecido conjuntivo de ratos (Rattus norvegicus, albinus).* São Paulo, 1988. 91p. Dissertação (Mestrado em Clínicas Odontológicas) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
22. SELTZER, S. G. et al. Vitallium endodontic implants: a scanning electron microscope, electron microprobe, and histologic study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 35, n. 6, p. 828-60, June 1973.
23. TYAS, M. J., BROWNE, R. M. Biological testing of dental restorative materials. *J. Oral Rehabil.*, v. 4, n. 3, p. 275-90, July 1977.
24. WENNERBERG, A., HASSELGREN, G., TRONSTAD, L. A method for evaluation of initial tissue response to biomaterials. *Acta Odontol. Scand.*, v. 36, n. 2, p. 67-73, 1978.
25. WILSON, J. Skin and mucosal testing of dental biomaterials. *Int. Endod. J.*, v. 13, n. 2, p. 112-5, May, 1980.

Recebido em 17.3.1993.