

Estudo da proliferação linfocitária em pacientes sensibilizados ao níquel*

*Study on lymphocyte proliferation in nickel sensitive patients**

Ana Paula Galli Sanchez¹Ricardo Luiz Ribeiro⁴Vitor Manoel Silva dos Reis⁷Celina Wakisaka Maruta²Carolina de Almeida Zomignan⁵Maria Notomi Sato³Ricardo Spina Nunes⁶

Resumo: FUNDAMENTO: O diagnóstico da alergia ao níquel é estabelecido com a realização do teste de contato. OBJETIVO: Desenvolver um método diagnóstico mais sensível e específico.

CASUÍSTICAS E MÉTODOS: Dezenove pacientes com teste de contato positivo para o níquel e 25 controles foram submetidos ao teste da proliferação linfocitária. As células mononucleadas foram isoladas do sangue venoso periférico e cultivadas em triplicatas, em placas de cultura (2×10^5 células/orifício) com: meio de cultura apenas; sulfato de níquel (156,25; 78,13; 19,53; 9,77 e $2,44 \mu\text{M}$) e concentrações ideais do antígeno *Candida albicans* e dos mitógenos pokeweed, fito-hemaglutinina A e anticorpo anti-CD3 (OKT3). Timidina tritiada foi adicionada às placas, a radioatividade incorporada pelas células medida e os resultados expressos pelo índice de estimulação (IE).

RESULTADOS: A resposta proliferativa dos linfócitos dos casos foi superior à dos controles em todas as concentrações de níquel testadas. Considerando teste positivo para níquel quando $\text{IE} \geq 3$, nenhum dos controles e 16 (84,21%) dos casos apresentaram teste positivo em pelo menos uma das cinco concentrações usadas. As respostas à *Candida albicans* e aos mitógenos foram semelhantes nos casos e controles, demonstrando a integridade da imunidade celular em ambos os grupos.

CONCLUSÃO: O teste da proliferação linfocitária mostra-se útil no diagnóstico da alergia ao níquel.

Palavras-chave: Ativação linfocítica; Dermatite de contato; Níquel.

Abstract: BACKGROUND: The diagnosis of nickel sensitivity is made by epicutaneous patch testing.

OBJECTIVE: To develop a more sensitive and specific test.

PATIENTS AND METHODS: Nineteen patients with positive patch test reactions to nickel and 25 controls were submitted to lymphocyte proliferation test. Mononuclear cells were isolated from peripheral venous blood and cultivated in triplicate in culture plates (2×10^5 cells/well) with: culture medium only, nickel sulfate (156.25; 78.13; 19.53; 9.77 and $2.44 \mu\text{M}$) and optimal concentrations of *Candida albicans* antigen as well as pokeweed, phytohemagglutinin A and anti-CD3 antibody (OKT3) mitogens. Tritiated thymidine was added to plates, radioactivity incorporated by cells was measured and the results expressed by the stimulation index (SI).

RESULTS: The lymphocyte proliferative response was higher in cases than in controls in all nickel concentrations tested. Considering positive test reactions when $\text{SI} \geq 3$, none of the controls and 16 (84.21%) cases were positive in at least one of five concentrations used. The proliferative responses to *Candida albicans* and mitogens were similar in cases and controls, demonstrating normal cellular immunity in both groups.

CONCLUSION: The lymphocyte proliferation test is useful in diagnosis of nickel sensitivity.

Keywords: Lymphocyte activation; Dermatitis, contact; Nickel.

Recebido em 05.01.2005.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 03.03.2005.

* Trabalho realizado no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (HC-FMUSP) e no Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56) da FMUSP (SP).

¹ Mestra, Médica Assistente do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos (SP).

² Professora Doutora do Departamento de Dermatologia da FMUSP (SP).

³ Professora Doutora do Departamento de Dermatologia da FMUSP e pesquisadora do LIM-56, Biomédica

⁴ Mestre, Pediatra, Professor do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Santo Amaro (SP).

⁵ Técnica do Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM 56) da FMUSP (SP).

⁶ Biólogo do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP (SP).

⁷ Professor Doutor do Departamento de Dermatologia do HC-FMUSP (SP).

INTRODUÇÃO

O níquel é o principal causador de dermatite alérgica de contato (DAC) no Brasil e no mundo industrializado.^{1,2} Segundo estudo multicêntrico, 25,1% da população brasileira estudada apresentava sensibilização ao níquel.¹ A DAC por níquel predomina no gênero feminino, em pacientes jovens e não atópicos.^{3,4}

O diagnóstico da DAC por níquel é baseado na história e quadro clínico do doente, sendo corroborado pela realização do teste de contato (TC) com sulfato de níquel a 5% em vaselina sólida.¹

Apesar de a técnica de execução do TC estar bem definida, o resultado depende da montagem, aplicação e leituras corretas do teste. O paciente não pode molhar o local da aplicação e deve comparecer três vezes ao hospital para sua execução. O TC exige controle clínico prévio da dermatose para sua realização, pode produzir exacerbação da dermatite e não deve ser empregado em pacientes em uso de corticóide sistêmico. O uso de corticóide tópico no local do teste nos últimos 15 dias e a exposição recente do dorso ao sol também contra-indicam sua realização.¹

Além disso, a aplicação do níquel em vaselina na pele pode produzir lesões foliculares e pustulosas como reações irritativas, bem como resultados duvidosos e falso-negativos.^{4,5}

Outro método diagnóstico citado na literatura, porém com resultados variados e controversos, é o teste da proliferação linfocitária - TPL.⁶⁻²⁴ No TPL, os linfócitos do sangue periférico do paciente são colocados em contato com o níquel. Se o paciente for sensibilizado ao metal, seus linfócitos de memória circulantes são ativados, sintetizam DNA e se dividem. A proliferação celular é medida pela incorporação de timidina radiomarcada pelas células ativadas.

Nos primeiros relatos sobre o TPL em indivíduos sensibilizados ao níquel, os autores utilizaram cloreto e acetato de níquel.^{6,7,9} Resposta proliferativa linfocitária inespecífica nos casos e nos controles foi comum, ou seja, o níquel funcionava como mitógeno, estimulando tanto os linfócitos dos pacientes sensibilizados quanto os dos controles não sensibilizados.^{6,9}

Posteriormente, a maioria dos trabalhos foi feita com o sulfato de níquel,^{8,10,11,13-23} porém não há padronização na literatura das concentrações de células e de níquel empregadas, sendo também comum a ocorrência de resultados falso-positivos.^{10,14,15,17-23}

Para melhor interpretar os resultados já publicados, os autores realizaram o TPL com sulfato de níquel em cinco concentrações, utilizando amostras do sangue venoso periférico heparinizado de 44 indivíduos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casos - 19 pacientes do gênero feminino, com idade variando entre 15 e 71 anos (média 38,42 anos;

mediana 37 anos), com história de sensibilização ao níquel e/ou lesões sugestivas de eczema de contato ou disidrose por níquel. Após controle clínico da dermatose, o diagnóstico da DAC por níquel foi confirmado pela realização do TC.¹ Observando-se leitura positiva para o sulfato de níquel após 96 horas, foi agendada data oportuna para a coleta de 15ml de sangue venoso periférico do paciente para a realização do TPL.

Controles - 25 indivíduos (sete do gênero masculino e 18 do feminino), com idade variando entre 18 e 50 anos (média 30,84 anos; mediana 26 anos), sem história de sensibilização ao níquel e com TC negativo para sulfato de níquel. Após realização do TC, foi agendada coleta do sangue para execução do TPL.

Na primeira consulta, os pacientes de ambos os grupos foram informados sobre a finalidade do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Considerou-se critério de exclusão o uso de corticóide sistêmico até três semanas antes da realização do TC.

TC - Feito com a bateria padrão brasileira composta por 30 substâncias, que foram aplicadas em câmaras de alumínio do tipo Finn Chamber® (Epitest Ltd, Finland) nas concentrações e quantidades padronizadas e fixadas na pele sã do dorso do paciente. O paciente foi orientado a não molhar o local e retornar ao hospital 48 horas após a colocação do teste, quando o material foi retirado, sendo feita a primeira leitura. Passadas mais 48 horas, o paciente retornava para a segunda leitura. A montagem, a aplicação e as duas leituras dos testes de todos os pacientes foram feitas por um único examinador. Os critérios de leitura adotados foram os estabelecidos pelo International Contact Dermatitis Research Group:²⁵ negativo (-): sem reação; duvidoso (+?): eritema leve mal definido; positivo fraco (+): eritema definido e pápula; positivo forte (++) : eritema, pápula e vesícula; positivo muito forte (+++) : eritema, pápula, vesículas coalescentes formando bolha. Foram consideradas positivas para sensibilização as reações positivas em 48 e 96 horas, bem como as negativas em 48 horas e positivas em 96 horas. Foram consideradas negativas para sensibilização tanto as reações negativas em 48 e 96 horas quanto as positivas em 48 horas e negativas em 96 horas.

TPL - Realizado no LIM 56 da FMUSP. Trabalhando em fluxo laminar, as células mononucleadas eram isoladas do sangue do paciente por gradiente de densidade, utilizando-se a solução de Ficoll-Hypaque.²⁶ Após lavagem das células (centrifugação em soro fisiológico), as mesmas eram colocadas em tubo de ensaio com o meio de cultura (RPMI 1640). Em seguida, uma amostra era levada para contagem automática das células no aparelho Cell Dyn 1400. As culturas foram realizadas com 2×10^6 células mononu-

cleadas/ml, em triplicatas, em placas de 96 orifícios com fundo chato (Costar® 3596, New York, USA). Cada orifício apresentava em seu interior volume total de 200µl: 100µl de células em RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro humano AB (2×10^5 células/orifício) e 100µl do antígeno ou mitógeno a ser testado diluído em RPMI 1640. Para cada paciente montou-se uma triplicata apenas com 100µl de células em RPMI 1640 com soro AB e 100µl de RPMI 1640. Essa triplicata, sem a presença de mitógeno ou antígeno, foi denominada "basal". Com relação ao níquel, utilizou-se solução padrão de sulfato de níquel em água destilada a 1M. Essa solução foi diluída em RPMI 1640, e várias diluições desta última solução foram realizadas, sendo 156,25; 78,13; 19,53; 9,77 e 2,44µM as concentrações finais do níquel usadas. As células foram, portanto, cultivadas (2×10^5 /orifício) por seis dias, em triplicatas, a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, na presença de: 100µl de meio de cultura apenas (basal), 100 µl de cada uma das cinco concentrações do sulfato de níquel e 100 µl de concentrações ideais do antígeno *Candida albicans* (CMA-5µg/ml) e do mitógeno *poke-weed* (PWM-5µg/ml). Também foram avaliadas, separadamente, as respostas proliferativas das células na presença dos mitógenos fito-hemaglutinina A (PHA-2,5µg/ml) e anticorpo anti-CD3 (OKT3-1/400) em culturas de três dias, sendo também montada uma triplicata basal para cada paciente nessas placas de cultura. As culturas com a CMA e com os mitógenos citados foram realizadas para avaliar a integridade da imunidade celular em ambos os grupos. Um antígeno, como a CMA ou o níquel, induz a proliferação de linfócitos periféricos de indivíduos previamente sensibilizados a ele, enquanto um mitógeno estimula a proliferação linfocitária sem reconhecimento específico. Assim, PHA estimula a ativação policlonal de linfócitos T (LT); PWM estimula tanto os LT quanto os linfócitos B; e OKT3 estimula a proliferação de LT.²⁶ Dezoito horas antes do término dos cultivos, timidina tritiada (3H-thymidine, Amershan Pharmacia Biotech, UK; specific activity 25Ci/mmol) diluída em RPMI 1640 (1:100) foi adicionada em cada orifício das placas de cultura. Completado o período de incubação, as culturas foram aspiradas com auxílio de coletor de células automático (Cell-Harvester, Skatron Instruments, UK), sendo o material radioativo incorporado às células em proliferação transferido para membranas de fibra de vidro. As membranas foram envolvidas por envelopes plásticos, onde se adicionou líquido de cintilação. Após secas em estufa, foram colocadas no contador de cintilação beta (Betaplate, Wallac, Finland). De acordo com os resultados fornecidos pelo aparelho em contagens por minuto (cpm) da radioatividade incorporada pelas células, foi possível definir se houve ou não ativação e proliferação linfocitária. A média das cpm de

cada triplicata foi calculada, e os resultados, expressos pelo índice de estimulação (IE). O IE é calculado dividindo-se a média das cpm das triplicatas estimuladas (com um antígeno ou mitógeno) pela média das cpm das triplicatas basais correspondentes.

Métodos estatísticos - Por meio do teste de Mann-Whitney²⁷ compararam-se os grupos de casos e de controles nas seguintes variáveis: valores das médias das cpm das triplicatas basais, valores do IE nas cinco concentrações do sulfato de níquel testadas, valores do IE na presença da CMA e dos mitógenos (PHA, OKT3 e PWM). Como nível de significância convencionou-se a probabilidade 0,05 ou 5% (risco $\alpha \leq 0,05$). O coeficiente de correlação de Spearman (r_s)²⁷ foi utilizado no grupo de casos para correlacionar a intensidade da resposta do TC com a intensidade da resposta do TPL e para verificar se o tempo (em dias) entre a realização do TC e a realização do TPL influenciou o resultado deste último. Quando o coeficiente de explicação (r_s^2) foi superior a 0,80, considerou-se boa a correlação entre os dados. Os valores estatisticamente significantes estão assinalados nas tabelas com um asterisco (*).

RESULTADOS

Com relação ao TC, no grupo de casos, um paciente apresentou teste positivo fraco (+), 11 apresentaram testes positivos fortes (++) e sete positivos muito fortes (+++) para o níquel. Nove dos 19 pacientes sensibilizados ao metal apresentaram TC positivo para mais um alérgeno: timerosal, etilenodiamina, cloreto de cobalto ou bicromato de potássio (Quadro 1). No grupo controle, três pacientes apresentaram TC positivo para timerosal, tiuram-mix e carba-mix, respectivamente (Quadro 2).

As tabelas 1 e 2 reúnem os resultados do TPL com níquel no grupo de casos e controles. Nas cinco concentrações do níquel utilizadas, a diferença entre os resultados do TPL nos casos e controles foi estatisticamente significativa (Tabela 3). O TPL foi considerado positivo para o sulfato de níquel quando o IE ≥ 3 . Esse valor foi estabelecido considerando-se os valores da média (1,25) mais três desvios padrões (1,77) dos valores dos IE dos controles na presença do níquel a 78,13µM, em que se observaram os valores mais elevados do IE nos controles.

Dezesseis dos casos (84,21%) apresentaram TPL positivo em pelo menos uma das concentrações de níquel testadas. Em 15 desses 16 pacientes o IE foi superior a três quando utilizado o sulfato de níquel a 78,13µM. Apenas os linfócitos do caso número 14 não responderam nessa concentração, proliferando na presença do níquel a 156,25µM (Tabela 1). O pico da resposta proliferativa linfocitária dos casos ocorreu na presença do níquel a 78,13µM, atingindo o IE o valor 49,87 (Tabela 1).

QUADRO 1: Datas dos exames e resultados dos testes de contato (TC) dos casos

Nº	Nome	Idade	Gênero	TC	Resultado do TC	TPL	Lesão ¹
1	AS	46	F	10/09/01	Sulfato de níquel ++++	11/10/01	-
2	RARS	45	F	10/09/01	Sulfato de níquel +++ / +++ Timerosal +++ / +++	18/10/01	-
3	ACCS	15	F	16/07/01	Sulfato de níquel +++ / +++	18/10/01	Eczema região cervical esquerda
4	LAP	37	F	01/10/01	Sulfato de níquel ++++ Etilenodiamina + / +	25/10/01	-
5	SMR	33	F	30/07/01	Sulfato de níquel ++++	25/10/01	-
6	IOF	24	F	30/07/01	Sulfato de níquel +++ / +++	25/10/01	-
7	MTTS	53	F	22/10/01	Sulfato de níquel ++++ Timerosal + / +	01/11/01	Eczema dorso nasal
8	ECM	21	F	07/02/01	Sulfato de níquel ++++ Cloreto de cobalto +++ / +++	29/11/01	-
9	MCM	30	F	30/07/01	Sulfato de níquel ++++	29/11/01	-
10	DMCV	36	F	26/06/00	Sulfato de níquel +++ / +++ Cloreto de cobalto +++ / +	04/04/02	Eczema punho esquerdo
11	VA	38	F	02/10/00	Sulfato de níquel +++ / +++	04/04/02	-
12	SFB	30	F	22/04/02	Sulfato de níquel +++ / +++ Timerosal +++ / +++	16/05/02	Lesões eczematosas disseminadas
13	MLF	52	F	06/05/02	Sulfato de níquel +++ / +++	16/05/02	-
14	MSO	50	F	03/12/01	Sulfato de níquel +++ / +++	06/06/02	Disidrose na mão esquerda
15	FMSCR	22	F	15/04/02	Sulfato de níquel + / + Cloreto de cobalto + / +	20/06/02	-
16	AFS	41	F	06/05/02	Sulfato de níquel ++++	20/06/02	-
17	IQA	53	F	22/04/02	Sulfato de níquel + / + Bicromato de potássio +++ / +++	02/10/02	-
18	MLT	71	F	10/06/02	Sulfato de níquel +++ / +++ Cloreto de cobalto +++ / +++	20/06/02	-
19	SMLN	33	F	05/10/98	Sulfato de níquel +++ / +++	11/09/02	-

Fonte: Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP.

(1) Lesão na data do TPL

QUADRO 2: Datas dos exames e resultados dos TC dos controles

Nº	Nome	Idade	Gênero	Resultado do TC	TPL	Lesão ¹
1	MA	27	M	Timerosal +/+	11/10/01	-
2	NTV	47	F	-	06/12/01	-
3	RMA	42	F	-	18/10/01	-
4	MM	18	F	Tiuram "mix" +/+	25/10/01	Eczema nas mãos
5	MHAF	56	F	-	01/11/01	-
6	LFSF	27	M	-	29/01/01	-
7	FAC	47	M	-	04/04/02	-
8	MRV	36	M	Carba "mix" +/+	04/04/02	-
9	ERAN	36	F	-	16/05/02	Eczema nos antebraços
10	MCCL	50	F	-	16/05/02	-
11	VK	24	F	-	06/06/02	-
12	BMG	30	M	-	20/06/02	-
13	MACGS	24	M	-	20/06/02	-
14	HM	25	F	-	20/06/02	-
15	AAS	26	M	-	11/09/02	-
16	PAVC	26	F	-	11/09/02	-
17	FCP	25	F	-	11/09/02	-
18	CAZ	24	F	-	11/09/02	-
19	VGA	29	F	-	11/09/02	-
20	ESK	26	F	-	11/09/02	-
21	CFC	22	F	-	26/09/02	-
22	SAVF	26	F	-	02/10/02	-
23	LK	26	F	-	02/10/02	-
24	MLM	25	F	-	02/10/02	-
25	PO	27	F	-	02/10/02	-

Fonte: Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP

(1) Lesão na data do TPL

TABELA 1: Resultados do TPL expressos em IE nas cinco concentrações de sulfato de níquel testadas nos casos

Nº	Casos				
	156,25 µM	78,13 µM	19,53 µM	9,77 µM	2,44 µM
1	8.70	22.10	11.34	2.82	1.70
2	4.40	13.59	4.41	6.54	1.05
3	1.55	1.97	1.56	2.30	0.94
4	9.02	31.81	8.11	3.90	1.45
5	2.52	5.88	2.63	1.88	0.99
6	8.42	11.46	3.73	3.46	1.06
7	23.75	19.66	3.27	1.25	1.25
8	19.65	49.87	32.82	23.03	2.29
9	6.12	7.08	3.44	0.74	9.82
10	3.43	3.63	0.77	0.73	0.88
11	0.76	4.56	1.14	1.03	0.74
12	3.69	5.58	2.90	2.43	1.23
13	4.93	7.08	6.26	2.29	1.89
14	4.94	2.36	1.38	1.07	0.93
15	3.64	4.54	0.91	0.76	0.84
16	2.49	1.36	1.14	0.77	0.82
17	0.61	1.10	1.08	0.86	0.84
18	23.71	34.02	10.81	3.28	1.00
19	7.22	23.21	2.62	1.23	0.96
Média	7.35	13.20	5.28	3.18	1.62
Mediana	4.93	7.08	2.90	1.88	1.00

O gráfico 1 ilustra a distribuição dos valores dos IE dos TPL com o níquel nos dois grupos, demonstrando, claramente, que as respostas proliferativas dos linfócitos dos casos foram muito superiores às dos controles nas cinco concentrações testadas.

Três dos casos (números 3, 16 e 17) não apresentaram TPL positivo nas cinco concentrações de sulfato de níquel testadas (Tabela 1).

Nenhum dos controles apresentou TPL positivo para o níquel (Tabela 2). O pico da resposta proliferativa nos controles também ocorreu na presença do sulfato de níquel a 78,13 μ M, onde o IE atingiu o valor 2,75 (Gráfico 1 e Tabela 2).

As respostas aos mitógenos PHA, OKT3 e PWM e ao antígeno CMA em ambos os grupos foram semelhantes, demonstrando a integridade da imunidade celular nos casos e controles (Tabelas 4 e 5). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das médias das cpm das triplicatas basais das culturas dos casos e controles de seis e de três dias.

Utilizando o valor da diferença em dias entre a realização dos dois testes e a intensidade das respostas do TC e do TPL, estudou-se a correlação entre a intensidade da resposta do teste *in vivo* e *in vitro*, e se o tempo entre a realização do TC e do TPL influenciou a intensidade da resposta do TPL. De acordo com o estudo estatístico, não houve correlação entre a intensidade dos resultados da segunda leitura do TC (+, ++ ou ++++) e a intensidade das respostas do TPL (expressas em IE) nas cinco concentrações de níquel usadas. Além disso, o tempo (em dias) entre a realização do TC e do TPL também não influenciou o resultado (valor do IE) do TPL (Tabela 6).

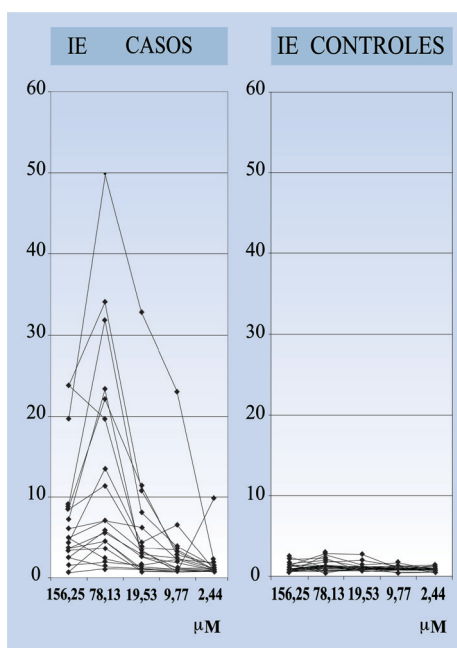


GRÁFICO 1: Comparação dos valores dos IE nos casos e controles nas cinco concentrações de sulfato de níquel testadas

DISCUSSÃO

Na tentativa de desenvolver um teste laboratorial mais sensível e específico para o diagnóstico da DAC por níquel, desde a década de 1960, vários trabalhos foram publicados sobre o TPL com acetato,^{9,11,14} cloreto^{6,7,12,24} e sulfato de níquel.^{8,10,11,13-23,28}

A comparação dos resultados desses trabalhos é de difícil realização, uma vez que os pesquisadores utilizaram células mononucleadas em diversas concentrações e níquel em soluções e concentrações variadas (Quadro 3). No entanto, esses trabalhos permitiram o isolamento de clones de LT específicos no reconhecimento do níquel e a realização de estudos sobre a imunopatogênese da DAC por níquel. Vale ressaltar que, mesmo sendo o níquel o principal causador de DAC no mundo, ainda não se tem conhecimento exato de como ocorre a apresentação antigênica.²⁹

Segundo Gimenez-Camarasa et al.,¹³ quando diluições seriadas de sulfato de níquel são utilizadas para a execução do TPL, a sensibilidade do teste aumenta. Considerando esse dado, os autores realizaram o TPL com cinco diluições da solução padrão de sulfato de níquel.

Neste trabalho, 16 (84,21%) dos 19 pacientes sensibilizados ao níquel apresentaram TPL positivo (IE \geq 3) em pelo menos uma das cinco concentrações testadas. No entanto, nos casos números 3, 16 e 17, o teste foi negativo. Para os linfócitos desses pacientes, talvez as concentrações do níquel empregadas não tenham sido ideais para induzir resposta proliferativa. Pequeno número de LT circulantes de memória ou número insuficiente de células apresentadoras de antígeno isoladas do sangue podem também justificar os resultados falso-negativos. Outra possibilidade é que nesses pacientes os linfócitos de memória se concentrem mais na pele.

Dos 16 casos com TPL positivos, 15 apresentaram IE \geq 3 quando seus linfócitos foram cultivados na presença do sulfato de níquel a 78,13 μ M (Tabela 1). Apenas os linfócitos do caso número 14 não responderam nessa concentração, proliferando na presença do níquel a 156,25 μ M. No futuro, realizando o TPL em um número maior de casos e controles os resultados poderão ser confirmados, e a padronização da técnica com estas duas concentrações poderá ser feita, facilitando sua execução.

Não se observaram no grupo controle resultados falso-positivos, ao contrário da maioria dos trabalhos publicados (Quadro 3). Esses resultados considerados falso-positivos, na verdade, podem ter ocorrido, talvez, em indivíduos já sensibilizados, ou seja, o TPL teria identificado a presença de sensibilização em limiar ainda insuficiente para produzir lesões cutâneas e TC positivo.

De acordo com os resultados do TPL nos dois grupos e utilizando o TC como método diagnóstico de refe-

TABELA 2: Resultados do TPL expressos em IE nas cinco concentrações de sulfato de níquel testadas nos controles

Nº	Controles				
	156,25 µM	78,13 µM	19,53 µM	9,77 µM	2,44 µM
1	1.37	1.21	1.02	1.33	0.97
2	0.53	0.59	0.93	0.76	1.31
3	0.80	1.17	0.70	0.71	0.82
4	0.69	0.74	0.71	0.75	0.90
5	1.40	0.39	1.09	0.44	0.51
6	2.09	2.20	0.58	0.76	0.68
7	0.89	1.01	0.86	0.90	0.84
8	0.94	0.86	0.82	0.93	1.00
9	2.37	1.04	1.07	1.09	1.13
10	0.92	1.07	1.01	1.00	0.95
11	0.72	0.68	0.67	0.51	0.51
12	0.87	1.23	1.12	0.86	1.32
13	1.54	1.96	1.13	1.19	1.02
14	0.80	1.16	1.24	0.97	1.01
15	0.68	0.87	0.85	1.04	0.56
16	1.15	1.70	1.95	1.19	1.41
17	0.73	1.21	0.96	0.82	0.85
18	0.47	1.13	1.00	0.93	0.71
19	0.94	1.30	0.94	0.84	0.79
20	0.71	0.89	0.95	0.87	0.83
21	0.58	1.41	1.05	0.97	0.90
22	0.90	1.35	1.08	0.77	0.67
23	0.41	2.61	1.36	1.60	0.80
24	1.32	2.75	2.71	0.96	0.83
25	1.36	0.67	0.70	1.25	0.39
Média	1.01	1.25	1.06	0.94	0.87
Mediana	0.89	1.16	1.00	0.93	0.84

rência, a sensibilidade do TPL com sulfato de níquel nas cinco concentrações testadas foi 84,21%, e a especificidade, 100%. A especificidade do TPL com o sulfato de níquel foi corroborada pela realização do teste com as células mononucleadas de três controles com TC negativo para o sulfato de níquel, porém positivos para time-rosoal, tiuram-mix e carba-mix (Quadro 2 e Tabela 2).

No grupo de casos, os quatro valores mais elevados do IE (49,87; 34,02; 31,81 e 23,21) foram observados nos pacientes números 8, 18, 4 e 19, respectivamente, sensibilizados ao níquel e a mais um alérgeno (Quadro 1 e Tabela 1). Talvez a polissensibilização influencie a intensidade da resposta proliferativa linfocitária, sendo necessária a realização de estudo em maior número de pacientes sensibilizados ao níquel e a outros alérgenos para melhor interpretação dessa observação.

O TPL é ensaio que depende de treinamento rigoroso para o isolamento das células mononucleadas, bem como para a preparação e utilização correta dos mitógenos, antígenos, meio de cultura e materiais radioativos. É essencial também a manutenção e manuseio correto dos aparelhos. Dessa maneira, para

a realização do TPL é necessária uma infra-estrutura de material e pessoal bastante elaborada.

Por outro lado, a execução do TPL em local que já possua toda a infra-estrutura necessária não é cara. Além disso, o paciente deve comparecer ao hospital apenas uma vez para a coleta do sangue. Considerando o desconforto que o TC gera no paciente, com restrições quanto ao banho e atividade física, bem como o tempo que o paciente gasta para a realização do TC, abandonando suas atividades de rotina três vezes em uma semana para concluir o exame, pode-se avaliar como vantajoso o custo do TPL.

Enquanto o TC exige controle clínico da DAC para sua realização, o TPL pode ser feito em pacientes com lesão. É consenso na literatura que essa seria a principal vantagem do TPL em relação ao TC. A amostra do sangue pode ser colhida, e o tratamento em seguida instituído, sem que o paciente corra o risco de apresentar exacerbação do quadro cutâneo durante a execução do exame. Além disso, enquanto os resultados do TC são expressos em cruces, o TPL fornece os resultados em índices numéricos, o que favo-

TABELA 3: Comparação, por meio do teste de Mann-Whitney, dos valores do IE do TPL com sulfato de níquel nas cinco concentrações testadas nos casos e controles

Cálculos	Concentrações				
	156,25 µM	78,13 µM	19,53 µM	9,77 µM	2,44 µM
R1	626	640	607	547.5	542
R2	364	350	383	442.5	448
U	39	25	58	117.5	123
U'	436	450	417	357.5	352
µU	237.5	237.5	237.5	237.5	237.5
σU	42.2	42.2	42.2	42.2	42.2
Z crítico (unicaudal)	-1,645	-1,645	-1,645	-1,645	-1,645
Z calculado	-4,704*	-5,036*	-4,254*	-2,844*	-2,713*
valor de p	< 10 ⁻⁵ *	~0*	< 10 ⁻⁵ *	0,0022*	0,0033*

(*) Valor estatisticamente significante

TABELA 4: Comparação, por meio do teste de Mann-Whitney, dos valores do IE do TPL com os mitógenos pokeweed (PWM), fito-hemaglutinina A (PHA) e anti-CD3 (OKT3) nos casos e controles

Cálculos	IE		
	PMW	PHA	OKT3
R1	453	481	457
R2	537	509	533
U	212	184	208
U'	263	291	267
µU	237.5	237.5	237.5
σU	42.2	42.2	42.2
Z crítico (unicaudal)	-1.645	-1.645	-1.645
Z calculado	-0.604	-1.268	-0.699
valor de p	0.273	0.102	0.242

TABELA 5: Comparação, por meio do teste de Mann-Whitney, dos valores do IE do TPL com o antígeno *Candida albicans* (CMA) nos casos e controles

Cálculos	IE
	CMA
R1	150
R2	228
U	75
U'	95
U crítico unicaudal	51
valor de p	> 0,05

rece uma interpretação mais objetiva dos dados.

São poucos os trabalhos que correlacionam a intensidade do resultado do TC com a intensidade da resposta do TPL. Segundo Al-Tawil et al.²⁸ e Everness et al.,²² não há correlação entre os resultados do TC e os do TPL nos pacientes sensibilizados ao níquel. No entanto, Von Blomberg-van der Flier et al.,²¹ estudando um número menor de pacientes sensibilizados,

verificaram correlação entre as respostas dos testes, ou seja, os pacientes com TC fortemente positivos apresentaram IE mais elevados.

É complicado comparar as respostas de dois testes cujos resultados são dependentes de mecanismos distintos. Enquanto no TC a aplicação do níquel na pele gera um processo inflamatório com recrutamento para o local de linfócitos capazes de reconhecer o metal, no TPL os linfócitos de memória são extraídos do sangue. De qualquer maneira, também foi avaliado se havia correlação entre os resultados do teste *in vivo* e os do teste *in vitro* nos pacientes sensibilizados, sem que se constatasse correlação entre as respostas dos dois testes (Tabela 6).

Na literatura apenas dois trabalhos discutem a influência da realização do TC no resultado do TPL, ou melhor, se o TC pode funcionar como *booster* e intensificar a resposta proliferativa linfocitária.^{16,22} Seus autores demonstraram que a realização do TC antes do TPL não influenciou a resposta proliferativa dos linfócitos dos pacientes de ambos os grupos. Neste estudo, analisou-se a possibilidade de o tempo

QUADRO 3: Resumo dos trabalhos sobre teste de proliferação linfocitária com níquel

Autor	Ano	Ni ¹	Concentração		Tempo (dias)	RFP ²
			Níquel (µM)	Células		
Aspegren et al.	1962	³ Cl	1; 10; 100; 300 e 1000	1 a 2x10 ⁶ /ml	3	+
Grosfeld et al.	1966	Cl	0,5 e 0,05	⁴ NE	4	-
Pappas et al.	1970	⁵ Ac	NE	4x10 ⁵ /ml	5	+
MacLeod	1970	⁶ S	0,5 e 50	NE	6	-
Forman et al.	1972	S	NE	1x10 ⁶ /ml	4	+
Hutchinson et al.	1972	S	50	1 a 2x10 ⁶ /ml	6	-
		Ac	50	1 a 2x10 ⁶ /ml	6	-
Millikan et al.	1973	Cl	2,5; 10; 20 e 30	2,5x10 ⁶ /ml	6	-
Gimenez-Camarasa et al.	1975	S	65; 130; 650; 1300 e 6500	5x10 ⁶ /ml	6	-
		S	3,23; 64,64; 258,57 e 517,13	1,2 a 1,5x10 ⁷ /ml	5	+
Kim et al.	1976	Ac	2,83; 56,59; 226,37 e 452,75	1,2 a 1,5x10 ⁷ /ml	5	+
Svejgaard et al.	1978	S	3,6; 9; 18; 36 e 72	2x10 ⁵ /ml	5	+
Veien et al.	1979	S	36 e 72	1x10 ⁵ /orifício	6	NE
Silvennoinen-Kassinen	1980	S	8,08 e 40,40	1x10 ⁶ /ml	7	+
Al-Tawil et al.	1981	S	40,40; 80,80; 161,60; 323,21; 646,41 e 1292,82	1x10 ⁵ /orifício	1 a 10	+
MacLeod et al.	1982	S	90,5	2x10 ⁶ /ml	6	+
Nordlind	1984	S	7,6; 19; 38 e 76	NE	3 e 6	+
Al-Tawil et al.	1985	S	40,40; 80,80 e 161,60	1x10 ⁵ /orifício	5 e 6	⁷ NA
von Blomberg et al.	1987	S	7; 14; 40 e 80	1x10 ⁵ /orifício	6	+
Everness et al.	1990	S	32,32; 64,64; 96,96 e 129,28	1x10 ⁶ /ml	6 e 7	+
Räsänen et al.	1992	S	10,34; 20,04; 40,72; 80,80 e 161,60	1x10 ⁵ /orifício	6	+
Cederbrant et al.	1997	Cl	19,29; 77,15 e 385,77	1x10 ⁶ /ml	5	+

1) Níquel; 2) Resultados falso-positivos; 3) Cloreto de níquel; 4) Não especificada; 5) Acetato de níquel; 6) Sulfato de níquel; 7) Não se aplica

TABELA 6: Coeficiente de correlação de Spearman (r_s) e coeficiente de explicação de Spearman (r²_s) calculados para correlacionar o tempo (em dias) entre a realização do TC e do TPL com o resultado do TPL (valores do IE) nas cinco concentrações de sulfato de níquel testadas e para correlacionar a intensidade da resposta do TC (em cruces) com a intensidade da resposta do TPL (valores do IE) nas cinco concentrações do sulfato de níquel testadas

	156,25 µM	78,13 µM	19,53 µM	9,77 µM	2,44 µM
r_s					
Dias	-0.10744	0.10114	-0.06582	-0.02766	-0.09120
Cruzes	0.08251	0.09249	-0.00393	0.03236	-0.11322
r²_s					
Dias	0.01154	0.01023	0.00433	0.00077	0.00832
Cruzes	0.00681	0.00855	0.00002	0.00105	0.01282

entre a realização do TC e do TPL ter influenciado o resultado do TPL no grupo de casos. Não houve correlação do intervalo de tempo (em dias) entre os exames com os resultados dos TPL (em IE). Portanto, intervalos mais curtos entre os dois testes não induzi-

ram respostas mais intensas nos testes *in vitro* (Tabela 6), corroborando os achados anteriores.

CONCLUSÃO

Considerando os dados apresentados, pode-

se concluir que o TPL mostra-se útil para o diagnóstico da DAC por níquel, especialmente em pacientes com lesões ativas. Além disso, pode ser utilizado para o isolamento de clones de LT sensibilizados ao níquel, bem como para a realização de estudos

sobre as citocinas produzidas pelas células ativas. Portanto, o TPL pode ser útil não apenas como método diagnóstico, mas também para a melhor compreensão da imunopatogênese da DAC por níquel. □

REFERÊNCIAS

- Grupo Brasileiro de Estudo em Dermatite de Contato (GBEDC). Estudo multicêntrico para elaboração de uma bateria-padrão brasileira de teste de contato. *An Bras Dermatol*. 2000;75:147-56.
- Host"nek JJ. Nickel-induced hypersensitivity: etiology, immune reaction, prevention and therapy. *Arch Dermatol Res*. 2002;294:249-67.
- Gawkrodger DJ, Vestey JP, Wong WK, Buxton PK. Contact clinic survey of nickel-sensitive subjects. *Contact Dermatitis*. 1986;14:165-9.
- Rietschel RL, Fowler JF. *Fisher's contact dermatitis*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- Fisher T, Rystedt I. False-positive, follicular and irritant patch test reactions to metal salts. *Contact Dermatitis*. 1985;12:93-8.
- Aspegren N, Rorsman H. Short-term culture of leucocytes in nickel hypersensitivity. *Acta Derm Venereol*. 1962;42:412-7.
- Grosfeld JCM, Penders AJM, Grood R, Verwilghen L. In vitro investigations of chromium and nickel-hypersensitivity with culture of skin and peripheral lymphocytes. *Dermatologica*. 1966;132:189-98.
- Macleod TM, Hutchinson F, Raffle EJ. The uptake of labeled thymidine by leucocytes of nickel sensitive patients. *Br J Dermatol*. 1970;82:487-92.
- Pappas A, Orfanos CE, Bertram R. Non-specific lymphocyte transformation in vitro by nickel acetate. *J Invest Dermatol*. 1970;55:198-200.
- Forman L, Alexander S. Nickel antibodies. *Br J Dermatol*. 1972;87:320-6.
- Hutchinson F, Raffle EJ, Macleod TM. The specificity of lymphocyte transformation in vitro by nickel salts in nickel sensitive subjects. *J Invest Dermatol*. 1972;58:362-5.
- Millikan LR, Conway F, Foote JE. In vitro studies of contact hypersensitivity: lymphocyte transformation in nickel sensitivity. *J Invest Dermatol*. 1973;60:88-90.
- Gimenez-Camamasa JM, Garcia-Calderon P, Asensio J, Moragas JM. Lymphocyte transformation test in allergic contact nickel dermatitis. *Br J Dermatol*. 1975;92:9-15.
- Kim CW, Schöpf E. A comparative study of nickel hypersensitivity by lymphocyte transformation test in atopic and non-atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*. 1976;257:57-65.
- Svejgaard E, Morling N, Svejgaard A, Veien NK. Lymphocyte transformation induced by nickel sulphate: an in vitro study of subjects with and without a positive nickel patch test. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1978;58:245-50.
- Veien NK, Svejgaard E, Menné T. In vitro lymphocyte transformation to nickel: a study of nickel-sensitive patients before and after epicutaneous and oral challenge with nickel. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1979;59:447-51.
- Silvennoinen-Kassinen S. Lymphocyte transformation in nickel allergy: amplification of T-lymphocyte responses to nickel sulphate by macrophages. *Scand J Immunol*. 1980;12:61-5.
- Al-Tawil NG, Marcusson JA, Möller E. Lymphocyte transformation test in patients with nickel sensitivity: an aid to diagnosis. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1981;8:511-5.
- MacLeod TM, Hutchinson F, Raffle EJ. In vitro studies on blastogenic lymphokine activity in nickel allergy. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1982;62:249-50.
- Nordlind, K. Lymphocyte transformation test in diagnosis of nickel allergy. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1984;73:151-4.
- Von Blomberg-van der Flier M, Van der Burg CKH, Pos O, Van de Plassche-Boers EM, Bruynzeel DP, Garotta G et al. In vitro studies in nickel allergy: diagnostic value of dual parameter analysis. *J Invest Dermatol*. 1987;88:362-8.
- Everness KM, Gawkrodger DJ, Botham PA, Hunter JAA. The discrimination between nickel-sensitive and non-nickel-sensitive subjects by an in vitro lymphocyte transformation test. *Br J Dermatol*. 1990;122: 293-8.
- Räsänen L, Tuomi M. Diagnostic value of lymphocyte proliferation test in nickel contact allergy and provocation in occupation coin dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1992;27:250-4.
- Cederbrant K, Hultman P, Marcusson JA, Tibbling L. In vitro lymphocyte proliferation as compared to patch test using gold, palladium and nickel. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;112:212-7.
- Wilkinson DS, Fregert S, Magnusson B, Bandmann HJ, Calnan CD, Cronin E, et al. Terminology of contact dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1970;50:287-92.
- Kurnick JT. Cellular assays. In: Colvi RB, Bhan AK, McCluskey RT, editors. *Diagnostic Immunopathology*. New York: Raven; 1995. p.751-6.
- Siegel S, Castellan N J. *Non parametric statistics*. 2th ed. New York: McGraw-Hill; 1988.
- Al-Tawil NG, Berggren G, Emtestam L, Fransson J, Jernselius R, Marcusson JA. Correlation between quantitative in vivo and in vitro responses in nickel-allergic patients. *Acta Derm Venereol*. 1985;65:385-9.
- Sinigaglia F. The molecular basis of metal recognition by T cells. *J Invest Dermatol*. 1994;102:398-401.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Ana Paula Galli Sanchez
Rua Cônego Antônio Lessa, 159
03122-060 São Paulo-SP
Tel./Fax: (11) 6606-2800
E-mail: anapgsanchez@ig.com.br