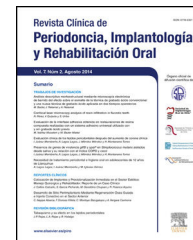


Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral

www.elsevier.es/piro



TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Níquel en cavidad oral de individuos con agrandamiento gingival inducido por tratamiento ortodóncico



Verónica Gómez Arcila^a, Jairo Mercado Camargo^b, Alejandra Herrera Herrera^c,
Luis Fang Mercado^d y Antonio Díaz Caballero^{e,*}

^a Odontóloga, Joven Investigador Colciencias, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia

^b Químico y farmacéutico, MSc en Ciencias Químicas, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia

^c Odontólogo, MSc en Inmunología, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia

^d Odontólogo, MSc en Farmacología, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia

^e Odontólogo, Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia

Recibido el 15 de marzo de 2014; aceptado el 19 de junio de 2014

Disponible en Internet el 4 de diciembre de 2014

PALABRAS CLAVE

Placa dental;
Encía;
Saliva;
Hiperplasia gingival;
Espectrofotometría
atómica (Decs
Bireme)

Resumen El agrandamiento gingival es una de las alteraciones orales generadas por el uso de aparatología ortodóncica fija. Inicialmente fue descrito como producto de la respuesta alérgica del huésped al níquel, y estudios recientes demostraron que este metal induce proliferación fibroblástica. Sin embargo, se desconoce el grado de bioacumulación de este metal en la cavidad oral. El objetivo del presente estudio consistió en cuantificar la concentración de níquel en muestras de saliva, placa dental y encía de individuos con aparatología ortodóncica fija con y sin agrandamiento gingival. El tamaño de la muestra se estableció según tendencia histórica, evaluando un total de 24 individuos con tratamiento ortodóncico activo, los cuales fueron clasificados en 2 grupos: 12 con agrandamiento gingival (grupo A) y 12 sin agrandamiento gingival (grupo B). De cada participante se obtuvieron muestras de: encía, saliva estimulada y placa dental. Una vez procesadas las muestras se midieron las concentraciones de níquel en mg/l, mediante espectrofotometría de absorción atómica (Thermo Scientific. Atomic absorption spectrometer iCE 3000, Reino Unido). El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS v20. Al comparar los niveles de níquel en muestras de saliva estimulada, placa dental y encía entre los individuos con y sin agrandamiento gingival, se observaron niveles significativamente mayores de níquel en las muestras de encía del grupo A (medias = 0,61 mg/l vs 0,36 mg/l; $p = 0,001$). Sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa al comparar las concentraciones de Ni en saliva entre el grupo A y B (medias = 0,502 mg/l vs 0,473 mg/l; $p = 0,178$, respectivamente). A partir de estos resultados se concluye que el uso de aparatología ortodóncica fija conlleva distintos niveles de bioacumulación de iones níquel en la encía al comparar ambos grupos. Es probable que altas concentraciones de este metal estén relacionadas con la

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: adiacz1@unicartagena.edu.co (A. Díaz Caballero).

etiología del agrandamiento gingival, por lo que se requieren nuevos estudios para establecer causalidad.

© 2014 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Dental plaque;
Gingiva;
Saliva;
Gingival overgrowth;
Atomic spectrophotometry (MeSH)

Nickel in oral cavity of individuals with gingival overgrowth induced by orthodontic treatment

Abstract Gingival overgrowth is an oral condition generated by the use of fixed orthodontic appliances. It was initially described as a product of the allergic response of the host to Nickel, and recent studies showed that this metal induces fibroblast proliferation. However, the degree of bioaccumulation of this metal in the oral cavity is unknown. The aim of this study was to quantify the concentrations of nickel in samples of saliva, dental plaque, and gingiva of individuals with fixed orthodontic appliances with and without gingival overgrowth. The sample size was established according to historical trends, evaluating 24 individuals with active orthodontic treatment, which were classified in two groups: 12 with gingival overgrowth (Group A) and 12 without gingival overgrowth (Group B). Samples of gingival, stimulated saliva and dental plaque were obtained from each participant. Once the sample were processed, nickel concentrations were measured in [mg/L] by atomic absorption spectrophotometry (Thermo Scientific. Atomic absorption spectrometer iCE 3000, UK). Statistical analysis was performed using SPSS v20. The levels of Nickel in samples of stimulated saliva, dental plaque and gingiva were compared between individuals in group A and group B. There were significantly higher levels of nickel in gingiva samples in group A (mean = 0.61 mg/L vs. 0.36 mg/L, $P = .001$). However, no statistical difference was observed when comparing the concentrations of nickel in saliva between groups A and B (mean = 0.502 mg/L vs. 0.473 mg/L, $P = .178$, respectively). The use of fixed orthodontic appliances leads to different levels of bioaccumulation of nickel in gingiva when comparing both groups. High concentrations of this metal are probably associated with the origin of gingival overgrowth. Further studies are required to establish causation.

© 2014 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

En odontología se emplean una amplia variedad de materiales dentales, entre los cuales se destacan los metales. Estos se usan en la fabricación de prótesis dentales fijas o removibles, implantes de oseointegración, así como también en la aparatología ortodóncica y ortopédica¹. Entre los metales más usados se encuentran: oro, cobalto, cromo, aluminio, titanio, hierro, paladio, platino, plata, osmio, cobre, cinc, indio, berilio, estaño y níquel². El níquel (Ni) permite elaborar excelentes aleaciones con el cromo, el titanio e incluso con el acero inoxidable, siendo de gran utilidad en la fabricación de los alambres, bandas y soportes de la aparatología ortodóncica fija; estos aditamentos presentan diferentes concentraciones de Ni que dependerán de la casa fabricante^{3,4}. Estas aleaciones metálicas, al estar sometidas a los cambios súbitos de temperatura y de pH característicos de la cavidad oral, generan intercambio iónico con los tejidos; esto conlleva a la corrosión de los metales, que posteriormente inducirán reacciones adversas sobre los tejidos locales, tales como: toxicidad, alergia y mutagénesis^{5,6}.

Al parecer la aparatología ortodóncica libera continuamente iones de Ni hacia el microambiente oral⁷⁻⁹, los cuales

pueden acumularse en el epitelio gingival, induciendo la aparición de descamación labial, eritema multiforme, estomatitis de contacto, gingivitis y agrandamiento gingival (AG)¹⁰. Estas lesiones han sido asociadas a hipersensibilidad tipo IV, cuya etiología no se ha definido por completo y que sugiere un origen de tipo alérgico al Ni¹¹. Tampoco se ha logrado dilucidar la acumulación de los iones de Ni en otros tejidos de la cavidad oral.

En cuanto a los problemas de salud oral presentados por pacientes con tratamiento ortodóncico (TO), el AG es uno de los más frecuentes. Esta afección se describe como el aumento en el número y tamaño de las células gingivales¹², y parece estar inducida por bajas concentraciones de Ni, mientras que concentraciones altas producen citotoxicidad¹³, por lo que identificar, cuantificar y comparar las concentraciones de iones de Ni en muestras de saliva, placa dental y encía de individuos con aparatología ortodóncica fija con y sin AG puede contribuir al tratamiento de esta afección.

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Cartagena (n.º 34/2011). Previo a su participación, a cada participante se le explicaron los objetivos, posibles beneficios y complicaciones de los procedimientos a los cuales se someterían y cada uno firmó



Figura 1 Agrandamiento gingival en individuo con aparatología ortodóncica fija.

un consentimiento informado donde aceptan participar en la investigación.

Materiales y métodos

Población de estudio y muestra

La población de estudio consistió de 24 individuos con TO, quienes asisten al posgrado de ortodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena. Los integrantes fueron seleccionados teniendo en cuenta los siguientes criterios: tener aparatología ortodóncica mínimo un año, índice de placa de O'Leary $\leq 15\%$, excelente higiene oral, sin síntomas de enfermedad sistémica y sin prescripción o historial de uso de fármacos anticonvulsivantes. Los participantes se dividieron en 2 grupos según si presentaban o no AG, y el tamaño de la muestra se determinó de acuerdo con un criterio de tendencia histórica¹³, quedando 2 grupos de 12 individuos cada uno. En el grupo A se ubicaron los individuos con aparatología ortodóncica fija que presentaban AG generalizado (fig. 1) ($> 30\%$ en la boca), mientras que en el grupo B fueron sujetos con aparatología ortodóncica fija que no presentaban AG, y que requerían cirugía periodontal con fines estéticos¹⁴.

Para cada sujeto de prueba se realizó una fase de ambientación que consistió en raspado y alisado radicular con cavitron y curetas, además de profilaxis 7 días antes del acto quirúrgico¹⁵. Una vez finalizada la ambientación y previo a la cirugía periodontal se tomaron 2 muestras: una de placa dental y una de saliva; la tercera muestra que corresponde a tejido gingival se obtuvo durante la intervención.

Toma de muestras

La placa dental visible se tomó con aplicadores Vivas-tick (Microbrush International, Ref # YL-7017, EE. UU.) en regiones subgingivales e interdentes vestibulares de los molares. Para la muestra de saliva se tomó 1 ml de saliva como muestra mediante la secreción estimulada de saliva, a través de la masticación de cera rosada por 2 min¹⁶. La muestra de tejido gingival se realizó mediante la técnica de gingivectomía con bisturí convencional (Bard Parker número

3, hoja número 15)¹⁷. Para el grupo A se tomaron las muestras gingivales de las zonas donde se presentó AG. Para el grupo B se tomaron las muestras de encía del sector anterior del maxilar superior. Para todos los casos se culminó el acto quirúrgico con una gingivoplastia mediante electrobisturí¹⁸ (BONART. ART-E1, Intensidad 5; modo corte/coagulación) para mantener el contorno armonioso de la encía¹⁹.

Todas las muestras fueron colectadas en tubos para microcentrífuga de 2 ml estériles (Eppendorf, Ref# 5362, Brasil) sin ninguna solución, luego fueron codificadas y almacenadas a -20°C , hasta su posterior análisis en el laboratorio de Servicios Ambiental (LSA) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena.

Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente durante 1 h aproximadamente. Seguido a esto se les añadió a cada muestra 1 ml de HNO_3 + 0,25 ml H_2O_2 para descomponer y diluir los especímenes¹³. Posterior a 36 h cada solución (placa dental, saliva y encía) se transfirieron a matraces individuales, completándose con la adición de agua destilada hasta lograr un volumen final de 10 ml.

Análisis espectrofotométrico

Una vez procesadas las muestras se midieron las concentraciones de Ni en mg/l mediante espectrofotómetro de absorción atómica (Thermo Scientific. Atomic Absorption Spectrometer [AAS] iCE 3000. Reino Unido), el cual previamente fue calibrado con 3 soluciones estándar de HNO_3 a concentraciones de 0,5, 1,0 y 2,0 mg/l y a una longitud de onda de 232 nm. Para esto se empleó el software SOLAAR (Thermo Scientific iCE 3000 Series AA Spectrometers, Reino Unido) el cual estableció la concentración de Ni en mg/l a partir de la absorbancia observada en cada muestra, y teniendo en cuenta la curva estándar de calibración. Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos correspondientes a género, edad, tiempo con TO, presencia de enfermedad, promedio de la absorbancia y promedio de la concentración de Ni en mg/ml de saliva, placa dental y encía fueron incluidos en una matriz de datos en el software Excel 2010 (Microsoft Office 2010).

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS Statistics v.20 (IBM, Statistical Package for Social Sciences). Se realizó una estadística descriptiva y luego análisis bivariados mediante el test exacto de Fischer y la prueba U de Mann-Whitney y multivariado mediante la prueba Kruskal Wallis. Para todos los análisis se tuvo en cuenta una significación estadística de $p \leq 0,05$.

Resultados

De la población estudiada las mujeres representaron el 66,7% y los hombres el 33,3%. El grupo de edad más frecuente fue de 18 a 22 años, con el 83,3%. El 70,8% de la población tenía aparatología ortodóncica fija de más de un año, y con respecto a la presencia de afección el 50% presentaba AG y el otro 50% restante no la presentaba.

Tabla 1 Presencia de agrandamiento gingival según género, edad y tiempo con ortodoncia

	Con agrandamiento gingival		Sin agrandamiento gingival		Valor de p
	Frecuencia n= 12	Porcentaje (%)	Frecuencia n= 12	Porcentaje (%)	
Género					
Mujeres	8	33,3	8	33,3	0,66
Hombres	4	16,67	4	16,67	
Edad					
18 a 22 años	11	45,8	9	37,5	0,29
Mayor a 23 años	1	4,17	3	12,5	
Tiempo con ortodoncia					
Un año	6	25	1	4,17	0,03*
> 1 año	6	25	11	45,83	

* Valor de p < 0,05 test exacto de Fisher.

Al análisis bivariado entre género, edad, tiempo con ortodoncia y presencia de afección solo se encontró relación estadísticamente significativa para el caso de tiempo con aparatología ortodóncica fija ($p=0,03$), en comparación con las variables género y edad, en donde no se encontró asociación significativa de estas variables con la presencia de afección (tabla 1).

Al comparar los niveles de Ni en muestras de saliva, placa dental y encía de individuos con AG y sin AG se observaron niveles significativamente mayores de Ni en encía de individuos con AG (media ABS = 0,154 vs 0,102; $p=0,001$) (media mg/l = 0,619 vs 0,36; $p=0,001$). Para las demás variables no se encontró relación significativa (tabla 2).

Al comparar las absorbancias y concentraciones de Ni entre las muestras de saliva, placa dental y encía de los 24 participantes se observó que en la saliva y en la encía los niveles de Ni son significativamente superiores en comparación con los de la placa dental ($p=0,00$ y $p=0,00$, respectivamente; tabla 3). Sin embargo, al comparar entre saliva y encía no se observó diferencia alguna ($p=0,902$; fig. 2). Resultados similares se observaron al comparar las absorbancias y concentraciones de Ni entre las muestras de saliva, de placa dental y de encía de los individuos con AG ($p=0,00$ y $p=0,00$, respectivamente), a diferencia de los individuos sin AG, quienes no mostraron diferencia significativa en los niveles de Ni de estos 3 tipos de muestra ($p=3,16$ y $p=3,19$, respectivamente; tabla 3).

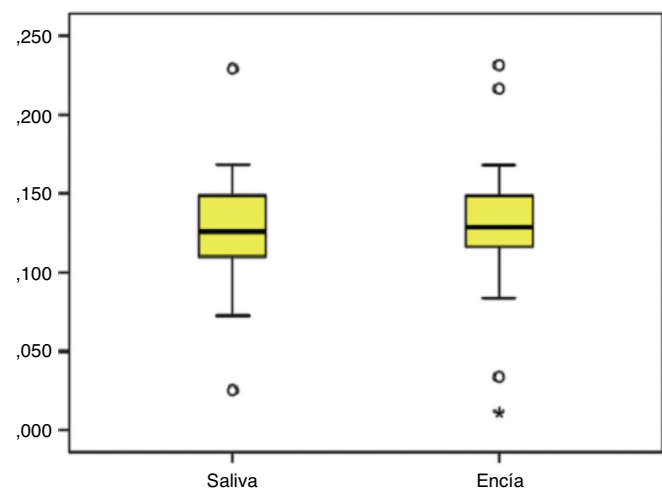


Figura 2 Concentración de níquel en saliva y encía. Se describe a través de la gráfica de cajas y bigotes la media e intervalos de confianza del 95%. Los círculos y asteriscos representan valores fuera del intervalo de confianza.

Discusión

Evaluar la utilización de metales en ortodoncia es fundamental, ya que la liberación de Ni influye en los procesos biológicos y fisiológicos normales; estudios reportan que los

Tabla 2 Niveles de níquel en saliva, placa dental y encía de pacientes con AG y sin AG

	Con agrandamiento gingival			Sin agrandamiento gingival			Valor de p
	Media	DE	IC 95%	Media	DE	IC 95%	
Saliva (ABS)	0,13	0,038	0,106-0,154	0,124	0,04	0,098-0,150	0,178
Saliva (mg/l)	0,502	0,187	0,382-0,621	0,473	0,198	0,347-0,599	0,178
Placa (ABS)	0,029	0,036	0,006-0,052	0,082	0,055	0,047-0,118	0,114
Placa (mg/l)	0,007	0,177	-0,105 a -0,119	0,261	0,261	0,090-0,431	0,114
Encía (ABS)	0,154	0,038	0,129-0,179	0,102	0,039	0,077-0,128	0,001*
Encía (mg/l)	0,619	0,19	0,498-0,740	0,36	0,191	0,239-0,482	0,001*

ABS: absorbancia; DE: desviación estándar; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

* Valor de p < 0,01. Prueba U de Mann-Whitney.

Tabla 3 Niveles de níquel en saliva, placa dental y encía según la presencia de enfermedad

	Saliva			Placa			Encía			Valor de p
	Media	DE	IC 95%	Media	DE	IC 95%	Media	DE	IC 95%	
ABS	0,127	0,04	0,11-0,14	0,056	0,05	0,033-0,078	0,128	0,046	0,108-0,148	0,00*
mg/l	0,487	0,19	0,40-0,56	0,134	0,25	0,025-0,242	0,49	0,228	0,393-0,586	0,00*
<i>Con agrandamiento gingival</i>										
ABS	0,13	0,04	0,10-0,15	0,029	0,04	0,006-0,05	0,154	0,038	0,129-0,17	0,00*
mg/l	0,502	0,19	0,38-0,621	0,007	0,18	-0,10 a -0,11	0,619	0,19	0,498-0,740	0,00*
<i>Sin agrandamiento gingival</i>										
ABS	0,124	0,04	0,09-0,15	0,082	0,06	0,047-0,118	0,102	0,039	0,07-0,128	0,316
mg/l	0,473	0,2	0,34-0,59	0,261	0,27	0,090-0,431	0,36	0,191	0,239-0,482	0,319

ABS: absorbancia; DE: desviación estándar; IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

* Valor de p < 0,05 prueba de Kruskal Wallis.

iones de Ni influyen sobre el ciclo celular, la viabilidad y proliferación de las células⁶, además algunos reportes indican que los iones metálicos tienen potencial genotóxico, citotóxico y carcinogénico^{20,21}, además de inducir daños en el ADN aun a concentraciones muy bajas^{5,8,21}.

De Paiva en 2005²² evaluó la relación del AG con hipersensibilidad al Ni en pacientes bajo TO, y si existía una asociación entre esta afección con el proceso alérgico. Concluyó que no había una asociación significativa entre la prueba del parche, el control de la placa bacteriana y la AG²². De la misma manera, el presente estudio asume que a pesar de ser el AG un indicador de reacción de hipersensibilidad al Ni, no es un signo específico, puesto que puede ocurrir debido a otros eventos etiológicos: endocrinos, hormonales, por medicamentos, enfermedades y sobrecarga bacteriana²³.

Gursoy et al. en 2007 estudiaron el papel de la acumulación de Ni y proliferación de células epiteliales en pacientes sometidos a TO, uno de sus objetivos fue determinar la acumulación de Ni en los tejidos de pacientes con y sin AG con una meticulosa higiene oral¹³. Sus resultados no mostraron diferencia significativa en la acumulación del Ni en muestras con y sin AG, mientras que en el presente estudio hubo significativa concentración de Ni en las muestras de encía y la presencia de AG.

En cuanto a la presencia de Ni en saliva, Ousehal y Lazrak en 2012 evaluaron niveles de Ni en saliva mediante espectrofotometría de absorción atómica antes de la colocación de aparatología ortodóncica fija, justo después de la colocación y 8 semanas después de la colocación²⁴; los resultados mostraron un aumento significativo en los niveles de Ni justo después de la inserción del arco de alambre de Ni-titanio, pero no fue significativa 8 semanas después. Este hallazgo coincide, incluso bajo la misma técnica analítica empleada, con los resultados obtenidos en el presente estudio, pues la concentración de Ni en saliva sí es afectada por la aparatología ortodóncica y varía en función del tiempo.

En cuanto a la acumulación de Ni en placa dental Fors y Persson en 2006 encontraron que la acumulación de Ni era más alta en muestras de placa dental tomadas de superficies cercanas a bandas y soportes, en comparación con sujetos no tratados ortodóncicamente⁹; este estudio difiere del presente en que la mayoría de las muestras de placa

dental evidenciaron una concentración de Ni por debajo del límite de detección, dando resultados irrelevantes para discutir. Esto se justifica quizás porque la población estudiada presentaba un riguroso control de la placa dental (< 15%), y probablemente se necesitó un mayor volumen de placa dental madura, o quizás se debió estandarizar mejor la recolección de la muestra.

Los resultados del presente estudio sugieren que el uso de aparatología ortodóncica fija conlleva a acumulación de Ni en la encía y la saliva, y la exposición continua de Ni propio de la aparatología ortodóncica fija conlleva a la acumulación de este en el tejido gingival, y concentraciones significativamente mayores de este están relacionadas con la presencia de la afección.

Este estudio motiva a los profesionales en ciencias biomédicas, básicas y clínicas a realizar nuevas investigaciones con el fin de esclarecer el dilema del papel biológico del Ni en el AG, y además, cuestionar la biocompatibilidad de los actuales materiales en ortodoncia que ofrecen a sus pacientes. Para estas nuevas investigaciones se recomienda incrementar el número de muestras y realizar estudio de casos y controles de exposición al Ni, así como también estudios clínicos aleatorizados para establecer la aparente participación etiológica del Ni en el AG asociado a aparatología ortodóncica fija.

Para nuestro conocimiento, y ante ausencia de material bibliográfico disponible, este es el primer estudio que examina directamente *in vivo* en sujetos la concentración de Ni en tejido gingival, demostrando una marcada acumulación en pacientes con AG.

Financiación

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación —Colciencias— a través del programa «Jóvenes investigadores», convenio especial de cooperación n.º 0722-2013.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Verónica Gómez, Alejandra Herrera y Luis Fang agradecen a Patricia Cabarcas y Adonilson Renals la amabilidad en sus servicios. A los pacientes y estudiantes del posgrado de ortodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Cartagena, que hicieron parte de la muestra y en la recolección del estudio; y a toda la Universidad de Cartagena en general por el apoyo logístico.

Bibliografía

- Baumann B, Pai WH, Bennani V, Waddell JN. Dental alloys used for crown and bridge restorations by dental technicians in New Zealand. *N Z Dent J*. 2010;106:43-9.
- Raap U, Stiesch M, Kapp A. Contact allergy to dental materials. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2012;10:391-6.
- Kolokitha OE, Chatzistavrou E. Allergic reactions to nickel-containing orthodontic appliances: Clinical signs and treatment alternatives. *World J Orthod*. 2008;9:399-406.
- Chaturvedi TP, Upadhyay SN. An overview of orthodontic material degradation in oral cavity. *Indian J Dent Res*. 2010;21:275-84.
- Fernandez-Minano E, Ortiz C, Vicente A, Calvo JL, Ortiz AJ. Metallic ion content and damage to the DNA in oral mucosa cells of children with fixed orthodontic appliances. *Biometals*. 2011;24:935-41.
- D'Anto V, Valletta R, Amato M, Schweikl H, Simeone M, Paduano S, et al. Effect of nickel chloride on cell proliferation. *Open Dent J*. 2012;6:177-81.
- Eliades T, Trapalis C, Eliades G, Katsavrias E. Salivary metal levels of orthodontic patients: A novel methodological and analytical approach. *Eur J Orthod*. 2003;25:103-6.
- Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003;124:687-93.
- Fors R, Persson M. Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliances. *Eur J Orthod*. 2006;28:292-7.
- Ize-Iyamu IN, Ogbogu P. Nickel chromium brackets and its effect on the oral microflora. *Afr J Med Med Sci*. 2011;40:367-71.
- Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol*. 1999;4:7-19.
- Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's clinical periodontology, 11th ed. St. Louis: Elsevier/Saunders; 2012.
- Gursoy UK, Sokucu O, Uitto VJ, Aydin A, Demirer S, Toker H, et al. The role of nickel accumulation and epithelial cell proliferation in orthodontic treatment-induced gingival overgrowth. *Eur J Orthod*. 2007;29:555-8.
- Dym H, Tagliareni JM. Surgical management of cosmetic mucogingival defects. *Dent Clin North Am*. 2012;56:267-79.
- Arabaci T, Cicek Y, Canakci CF. Sonic and ultrasonic scalers in periodontal treatment: A review. *Int J Dent Hyg*. 2007;5:2-12.
- Ono K, Inoue H, Masuda W, Morimoto Y, Tanaka T, Yokota M, et al. Relationship of chewing-stimulated whole saliva flow rate and salivary gland size. *Arch Oral Biol*. 2007;52:427-31.
- Burgos T, Palomino D, Diaz A. External bevel gingivectomy [Gingivectomia a bisel externo]. *Duazary*. 2008;5(2):125-8.
- Santosham K, Suresh R, Malathi N. A case report of idiopathic gingival fibromatosis: Diagnosis and treatment. *J Int Acad Periodontol*. 2009;11(4):258-63.
- Clocheret K, Dekeyser C, Carels C, Willems G. Idiopathic gingival hyperplasia and orthodontic treatment: A case report. *J Orthod*. 2003;30:13-9.
- Hafez HS, Selim EM, Kamel Eid FH, Tawfik WA, Al-Ashkar EA, Mostafa YA. Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: A longitudinal in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140:298-308.
- Amini F, Borzabadi Farahani A, Jafari A, Rabbani M. In vivo study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res*. 2008;11:51-6.
- De Paiva VCX. Hipersensibilidade ao Ni presente no aparelho ortodôntico fixo metálico. Avaliação Clínica, Periodontal, Histopatológica E Imunoistoquímica. [Dissertação. Mestrado em Ortodontia]. Minas Gerais: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais; 2005.
- Gong Y, Lu J, Ding X. Clinical, microbiologic, and immunologic factors of orthodontic treatment-induced gingival enlargement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140:58-64.
- Ousehal L, Lazrak L. Change in nickel levels in the saliva of patients with fixed orthodontic appliances. *Int Orthod*. 2012;10:190-7.