LETÍCIA SGARBI PINTO

**LIGADURAS ORTODÔNTICAS ELASTOMÉRICAS ESTÉTICAS:
QUANTIFICAÇÃO DE ENDOTOXINA BACTERIANA *IN VITRO* E
*IN VIVO***

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pinto, Letícia Sgarbi

Ligaduras ortodônticas elastoméricas estéticas: quantificação de endotoxina bacteriana *in vitro* e *in vivo*. Ribeirão Preto, 2018.

67p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Nelson-Filho, Paulo

1. Ortodontia; 2. Elastômeros; 3. Ligadura; 4. Endotoxinas; 5. Lipopolissacarídeos; 6. Teste do *Limulus*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pinto, LS. **Ligaduras ortodônticas elastoméricas estéticas: quantificação de endotoxina bacteriana *in vitro* e *in vivo*.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Data da defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

LETÍCIA SGARBI PINTO

Nascimento - 10 de fevereiro de 1990 – Tabatinga/SP

Filiação - Benedito Donizete Pinto
Deize Aparecida Sgarbi Pinto

2008-2011- Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

2012-2015 - Especialização em Ortodontia
Fundação Odontológica de Ribeirão Preto (FUNORP)

2014-2016 - Extensão Universitária em “Tratamentos Orto-Cirúrgicos em Pacientes Adultos”

2015-2018 - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
Pós-Graduação – nível Mestrado
Área de concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto -
Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Primeiramente a **Deus**, que sempre me deu forças para continuar seguindo em frente e lutando por meus sonhos. Obrigada por nunca me abandonar e por me ajudar a trilhar meu caminho com muita fé. Foi por meio dessa fé que aprendi que tudo é possível se tivermos amor ao próximo, benevolência e perseverança.

Aos meus pais, **Benedito** e **Deize**, pelo amor incondicional e por toda a confiança e esforço que depositaram em mim nesses anos de muito empenho e realizações. Obrigada por acreditarem em mim com tanta garra e por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Vocês dois são o principal motivo de eu querer ser uma pessoa melhor todos os dias. Sou eternamente grata. Tenho absoluto orgulho de ter vocês como pais. Deus foi extremamente maravilhoso comigo ao me conceder essa dívida. Amo vocês.

Aos meus irmãos, **Natália** e **Rafael**, por sempre me servirem de exemplo e inspiração para continuar em busca de meus sonhos. Por sempre me ajudarem a levantar quando eu caí. Por me ensinarem a ser mais forte, mesmo quando a vida era mais difícil. Pelas conversas e pelos conselhos. Por abdicarem até de vocês mesmos em prol da minha felicidade. Sempre os amarei.

Aos meus amigos, **Marta Mendes de Campos** e **Marco Antonio de Campos**, que são para mim como pais. Acolheram-me com muito amor e carinho para dentro de suas vidas e me ensinaram muito. Exemplos de humildade, de felicidade e de dedicação ao próximo. Os valores que aprendi com vocês jamais serão esquecidos. Vocês foram muito importantes para a consolidação do meu caráter e desenvolvimento de novas habilidades e características que julgo essenciais em um ser humano. Obrigada por estarem ali para mim em momentos tão difíceis. Jamais esquecerei o que fizeram por mim. Amo vocês.

Ao meu namorado, **Marcelo Augusto Gimenes**, pelo total apoio aos meus sonhos e por sempre me ajudar a manter a calma quando eu achava que estava a ponto de surtar (risos). Você, com toda a sua paciência e amor, faz de mim uma pessoa melhor a cada dia. Te admiro pelo ser humano maravilhoso que você é e agradeço a Deus por ter cruzado nossos caminhos. Amo você.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho**.

Obrigada pelo incansável comprometimento, esforço e dedicação. Sempre atento aos mínimos detalhes, me ensinou muito e me mostrou que é sempre possível sermos melhores do que esperávamos ser. Seus ensinamentos e conselhos jamais serão esquecidos. Você é dono de um caráter ímpar e de uma personalidade singular. Sua ética e competência agregam muito valor a esta Instituição e à vida de todas as pessoas que tem a oportunidade de cruzar o seu caminho. Agradeço por poder ser uma dessas pessoas, pois você foi uma fonte de grande inspiração nessa minha caminhada.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Reitor, Prof. Dr. Vahan Agopyan, e do Vice-reitor, Prof. Dr. Antonio Carlos Hernandez.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Diretora, Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, e do Vice-Diretor, Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.

À Coordenação do curso de Pós Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato e da Vice-Coordenadora, Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva.

Ao Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, por ter sido a minha principal inspiração para continuar minha carreira universitária. Sem seus conselhos e motivações eu não estaria aqui hoje escrevendo essa dedicatória na minha dissertação de Mestrado. Obrigada por ser como um pai para mim nesta caminhada de grande aprendizado, sempre me escutando e utilizando de palavras muito sábias para me incentivar a continuar perseguindo meus sonhos. Apontava meus erros, mas nunca sem realçar minhas qualidades. Depositou muitos esforços e paciência me ensinando a ser o melhor de mim mesma. Você acreditou em mim mais do que eu mesma e, com isso, me fez acreditar também. Terei sempre imensa gratidão e admiração pelo ser humano e profissional que você é.

À Profª. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, por sua competência, destreza e incentivo ao longo de todos esses anos. Foi um prazer estar ao seu lado, podendo extrair todos os seus ensinamentos e conselhos. Sem a sua ajuda, o desenvolvimento deste trabalho não teria sido possível. Obrigada por todas as conversas e puxões de orelha (risos), que foram extremamente necessários para que eu pudesse ser uma melhor profissional, mas também uma melhor pessoa. Te admiro muito por todas as suas qualidades.

Ao **Prof. Dr. Adilson Tomasin**, por ser uma pessoa tão iluminada e pacienciosa. Seus ensinamentos moldaram o meu caráter e a minha maneira de enxergar a minha profissão. Com certeza, implantou em mim um orgulho imenso pela Ortodontia e pela Odontologia. Tenho o senhor como um avô, que me deu tantos e tantos conselhos e me ajudou a desenvolver mais paciência em busca da perfeição.

Ao **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, por seus ensinamentos e conselhos desde a época de Especialização. Admiro muito o seu caráter, sua honestidade e seu profissionalismo. Seu exemplo de superação e luta para alcançar seus sonhos me moveram a persistir na minha trajetória. Obrigada por ser, acima de tudo, um amigo. Dividi com você conversas das quais jamais me esquecerei.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, **Profª. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profª. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profª. Dra. Andiana De Rossi Daldegan**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, **Profª. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, **Profª. Dra. Lêa Assed Bezerra da Silva**, **Profª. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní**, **Profª. Dra. Maria Cristina Borsato**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profª. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Profª. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, por toda organização e dedicação de anos e anos de trabalho, gerando docentes hoje inseridos em várias instituições nacionais e internacionais.

Ao **Prof. Dr. Alberto Consolaro** e **Profª. Érika Calvano Kuchler**, docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP/USP, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento da Clínica Infantil, **Dra. Carolina Paes Torres Mantovani**, **Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, **Dra. Marília Pacífico Lucisano**, **Carmo Eurípedes Terra Barreto (in Memoriam)**, **Marco Antônio dos Santos**, **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, **Fátima Aparecida Jacinto Daniel**, **Fátima Rizoli**, **Filomena Leli Placciti**, **Matheus Morelli Zanella** e **Benedita Rodrigues Viana**, por toda a disposição, atenção e suporte por todos esses anos. Muito obrigada!

Aos professores do Curso de Especialização em Ortodontia, **Prof. Dr. Ademar Valente** (in Memoriam), **Profª. Dra. Carla Enoki Itikawa**, **Profª. Dra. Marcela Cristina Damião Andrucioli** e **Marcelo Antônio Mestriner**, que ajudaram não somente profissionalmente, mas também na sedimentação de meu caráter e desenvolvimento pessoal. Serei eternamente grata.

Aos colegas de turma do mestrado em Odontopediatria **Alessandra Parreira Menino**, **Ana Maria Guerra Costa**, **Ana Paula Dias Moreno**, **Guido Marañon Vasquez**, **Arthur Cunha da Silva**, **Mariana Trevizan**, **Mariana Umekita Shirozaki** e **Thaíse Taira**, por todos os momentos vividos e por todo o suporte e diversão. Vocês estarão eternamente em minha memória e em meu coração.

Às alunas da Pós-Graduação em Odontologia, **Carolina Maschietto Pucinelli**, **Francine Lorencetti**, **Juliana Aird**, **Laura Bastos**, **Nicole Lima**, **Raquel Morelli** e **Thaís Xavier**, por todo o suporte e companhia nessa caminhada.

À **Rosemary Alves**, secretária do curso de Especialização em Ortodontia, a quem sou eternamente grata. Sempre estendendo as mãos e também os ouvidos aos nossos maiores conflitos e nos confortando com palavras de carinho e atenção. Muito obrigada pelos conselhos e pelos abraços. Pelas risadas e gargalhadas. Você é uma pessoa maravilhosa. Acolheu-me e fez com que eu me sentisse em casa, mesmo estando longe de meus entes queridos. Nunca poderei agradecer o suficiente.

À **Nilza Letícia Magalhães**, técnica do laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células do Departamento de Clínica Infantil, por toda a determinação e eficiência. Que você possa sempre manter esse sorriso gigante no rosto, iluminando o dia das pessoas ao seu redor. Foi muito gratificante trabalhar ao seu lado. Muito obrigada por todos os ensinamentos e também por todas as risadas, que faziam com que tudo ficasse mais fácil.

Ao **Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos**, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, onde realizei parte dos experimentos.

A todos os **pacientes** que participaram desta pesquisa. Muito obrigada.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A parte experimental dessa dissertação de Mestrado foi desenvolvida nos Laboratórios de "Ortodontia" e "Biologia Molecular e Cultura de Células" do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, no Laboratório de "Pesquisa e Desenvolvimento de Imunobiológicos" da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e nas clínicas odontológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

RESUMO

Pinto LS. **Ligaduras ortodônticas elastoméricas estéticas: quantificação de endotoxina bacteriana *in vitro* e *in vivo***. Ribeirão Preto, 2018. 67p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O objetivo do presente trabalho foi quantificar, *in vitro* e *in vivo*, a endotoxina bacteriana (LPS) aderida a ligaduras ortodônticas elastoméricas estéticas de poliuretano e de silicone, empregando o teste *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). Para o estudo *in vitro* foram utilizadas quatro tipos de ligaduras elastoméricas estéticas: Sani-Ties (poliuretano) e Sili-Ties (silicone), da GAC, e Mini Single Case Ligature Stick (poliuretano) e Synergy® Low-friction ligatures (silicone), da Rock Mountain, sendo 5 contaminadas com solução de endotoxina (controle positivo) e 5 não-contaminadas (controle negativo). Réplicas feitas de fio de amarelo torcido e de aço inox fundido, de mesmo tamanho e formato das ligaduras elastoméricas, contaminadas ou não com endotoxina, foram usadas como controle. A quantificação de endotoxina foi realizada por meio do teste LAL (Kit QCL-1000™), sendo os resultados expressos em unidades de endotoxina (UE/mL). No estudo *in vivo*, 20 pacientes de ambos os gêneros, com faixa etária entre 15 e 30 anos, que iniciaram tratamento com aparelho ortodôntico fixo na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo receberam, randomicamente, em quadrantes alternados, os mesmos quatro tipos de ligaduras elastoméricas utilizadas no estudo *in vitro*, sendo uma ligadura de cada marca inserida nos caninos superiores e inferiores (13, 23, 33 e 43), aleatoriamente. Vinte e um dias após, as ligaduras foram removidas e processadas para quantificação da endotoxina bacteriana, utilizando também o Kit QCL-1000™. Todos os dados obtidos foram submetidos à análise estatística apropriada de acordo com a distribuição dos dados, por meio dos testes de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn (estudo *in vitro*) e ANOVA de medidas repetidas e pós-teste de Tukey (estudo *in vivo*). Todas as análises foram efetuadas por meio do programa Graph Pad Prism 4.0, com nível de significância de 5%. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a endotoxina bacteriana aderiu-se a todos os materiais testados. No estudo *in vitro*, o grupo GAC silicone foi o que apresentou menor mediana de contaminação (1,15 UE/mL), com relação aos outros grupos ($p < 0,0001$), os quais não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados entre si ($p > 0,05$). No estudo *in vivo*, de maneira semelhante ao observado no estudo *in vitro*, o grupo GAC silicone foi o que apresentou menor média de contaminação ($0,577 \pm 0,017$ UE/mL), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em comparação aos demais grupos. Pode-se concluir, que a endotoxina bacteriana apresentou afinidade pelas ligaduras elastoméricas estéticas à base de silicone e poliuretano testadas. As ligaduras de silicone da marca GAC foram as que apresentaram menor quantidade de endotoxina aderida às suas superfícies.

Palavras-chave: Ortodontia; Elastômeros; Ligadura; Endotoxinas; Lipopolissacarídeos; Teste do *Limulus*.

ABSTRACT

Pinto LS. **Orthodontic elastomeric aesthetic ligatures: quantification of bacterial endotoxin *in vitro* and *in vivo***. Ribeirão Preto, 2018. 67p. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

The objective of this study was to quantify, *in vitro* and *in vivo*, bacterial endotoxin (LPS) attached to esthetic elastomeric orthodontic ligatures made of polyurethane and silicone using the *Limulus Amebocyte Lysate* test (LAL). For the *in vitro* study, were used four types of aesthetic elastomeric ligatures: Sani-Ties (polyurethane) and Sili-Ties (silicone) - GAC, and Mini Single Case Ligature Stick (polyurethane) and Synergy® Low-friction ligatures (silicone) - Rock Mountain; 5 of each were contaminated with endotoxin solution (positive control) and 5 non-contaminated (negative control). Replicas made of twisted wire ligatures and of cast stainless steel, of the same size and shape than the elastomeric ligatures, contaminated or not with endotoxin, were used as control. Endotoxin quantification was performed using the LAL test (QCL-1000™ kit), the results being expressed in EU/mL. In the *in vivo* study, 20 patients of both genders, with ages ranging from 15 to 30 years old, who started treatment with a fixed orthodontic appliance at the School of Dentistry of Ribeirão Preto - University of São Paulo, received randomly the same four types of elastomeric ligatures used in the *in vitro* study, being a ligature of each brand inserted in the upper and lower canines (UR3, UL3, LR3, LL3), randomly. Twenty-one days later, ligatures were removed and processed for quantification of bacterial endotoxin, using the same test as the *in vitro* study. All data were submitted to appropriate statistical analysis according to the data distribution, using Kruskal-Wallis tests and Dunn post-test (*in vitro* study) and ANOVA of repeated measurements and Tukey's post-test (*in vivo* study). All analyzes were performed using the Graph Pad Prism 4.0 program, with a significance level of 5%. According to the results obtained, it was observed that the bacterial endotoxin attached to all materials tested. In the *in vitro* study, the GAC silicone group had the lowest median contamination (1.15 EU/mL), in relation to the other groups ($p < 0.0001$), which did not present a statistically significant difference when compared to each other ($p > 0.05$). In the *in vivo* study, similar to that observed in the *in vitro* study, the GAC silicone group had the lowest mean contamination (0.577 ± 0.017 EU/mL), with a statistically significant difference ($p < 0.001$) compared to the others groups. It could be concluded that bacterial endotoxin exhibited affinity for the tested silicone and polyurethane aesthetic elastomeric ligatures. The silicone ligatures of GAC brand were the ones that presented less amount of endotoxin attached to their surfaces.

Key-words: Orthodontics; Elastomers; Ligation; Endotoxins; Lipopolysaccharides; *Limulus* Test.

SUMÁRIO

1. Introdução	23
2. Proposição.....	29
3. Material e Métodos.....	33
3.1 Estudo <i>in vitro</i>	35
3.2 Estudo <i>in vivo</i>	38
Aspectos éticos	38
4. Resultados.....	41
4.1 Estudo <i>in vitro</i>	43
4.2 Estudo <i>in vivo</i>	44
5. Discussão	45
6. Conclusão.....	51
Referências	55
Anexo	65

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os aparelhos ortodônticos fixos são dispositivos compostos por diversos materiais que, quando inseridos na cavidade bucal, funcionam como sítios de retenção de biofilme bacteriano (Diamantl-Kipioti et al., 1987; Leung et al., 2006; Ahn et al., 2007; Haas et al., 2014; Cardoso et al., 2015; Khoroushi e Kachuie, 2017) e dificultam a higienização (Faltermeier et al., 2008; Nassar et al., 2013; Pan et al., 2017a; Bagatin et al., 2017; Bergamo et al., 2018). Assim, durante a terapia ortodôntica há um maior acúmulo de micro-organismos e ocorrem mudanças intrabucais, implicando em aumento do risco a doenças, como a cárie dentária (Heymann e Grauer, 2013; Höchli et al., 2017; Khoroushi e Kachuie, 2017) e a doença periodontal (Guo et al., 2017; Pan et al., 2017b).

A contaminação microbiana presente nos aparelhos ortodônticos fixos tem sido avaliada empregando principalmente técnicas de cultura (Brêtas et al., 2005; Papaioannou et al., 2007; Lessa et al., 2007; Brusca et al., 2007; Magno et al., 2008; Maruo et al., 2008; Peixoto et al., 2011; Yitschacky et al., 2016; Shirozaki et al., 2017) e de biologia molecular (Nelson-Filho et al., 2011a; Andrucioli et al., 2012; Dos Santos et al., 2015; Martha et al., 2016; Bergamo et al., 2017). Especificamente com relação à doença periodontal, alguns autores têm relatado que o uso de aparelhos ortodônticos fixos promove o aumento de patógenos periodontais no biofilme supra (Sallum et al., 2004; Van Gastel et al., 2011) e subgingival (Sallum et al., 2004; Lee et al., 2005; Mártha et al., 2016; Guo et al., 2017; Pan et al., 2017a), assim como na saliva (Kim et al., 2016), sendo a inflamação gengival um efeito colateral comum durante o tratamento ortodôntico (Speer et al., 2004; Pinto et al., 2017). Segundo Bérghamo et al. (2018), o design dos bráquetes afeta o nível de citocinas pró-inflamatórias no fluido crevicular, tendo potencial para ocasionar inflamação nos tecidos periodontais.

Essa microbiota periodontopatogênica é composta predominantemente por micro-organismos anaeróbios Gram-negativos (Huser et al., 1990; Albandar e Rams, 2000; Jenkins e Papapanou, 2000; Nelson-Filho et al., 2011b), os quais apresentam muitos fatores de virulência, incluindo a endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo ou LPS). Quando ocorre a multiplicação ou a morte bacteriana, a endotoxina é liberada,

exercendo uma série de efeitos biológicos que conduzem à ocorrência de reação inflamatória e reabsorção óssea (Daly et al., 1980; Ishihara et al., 1991; Rietschel e Brade, 1992; Nelson-Filho et al., 2002; Rogers et al., 2007; Silva et al., 2008; Sosroseno et al., 2009; Cheon et al., 2016), por meio do estímulo à expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (Bozkurt et al., 2017) e quimiocinas que induzem a osteoclastogênese (Ara et al., 2009; Kanno et al., 2016).

Além disso, a presença de elevados níveis de endotoxina pode promover aumento na produção de óxido nítrico e na oxidação de proteínas (Gomes et al., 2017). O óxido nítrico induz a produção de vários mediadores pró-inflamatórios e de citocinas que ativam células do sistema imunológico, provocando alterações patológicas durante o processo inflamatório e resultando em dano tecidual (Hibbs et al., 1988; Stuehr e Griffith, 1992).

A endotoxina bacteriana, também ativa o sistema complemento (Morrison e Kline, 1977; Horiba et al., 1992; Ou et al., 2017), que é um importante componente da resposta imune inata (Carroll e Sim, 2011), atuando em diversos eventos da resposta inflamatória como quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos, aumento da permeabilidade vascular, liberação de lisozima e linfocinas (Morrison e Kline, 1977), ativação do ciclo do metabolismo do ácido aracdônico (Cotran et al., 1991) e degranulação de mastócitos (Hook et al., 1970), entre outros.

Especificamente na Odontologia, muitos estudos demonstraram que a endotoxina bacteriana apresenta alta afinidade por uma diversidade de materiais, incluindo metais (Cho et al., 2002; Lieder et al., 2013), sílica (Cho et al., 2002), zircônia (Harder et al., 2012), resinas acrílicas (Gagnon et al., 1994), cerâmicas (Benahmed et al., 1997; Lieder et al., 2013), titânio (Nelson et al., 1997; Cho et al., 2002; Harder et al., 2012; Lieder et al., 2013; Barão et al., 2013) e mini-implantes ortodônticos (Andrucioli, 2013). Já foi demonstrado, também, que a endotoxina bacteriana se adere aos bráquetes metálicos (Knoerschild et al., 1999; Nelson-Filho et al., 2011b) e a diferentes tipos de adesivos ortodônticos (Romualdo et al., 2017). Essa afinidade pode afetar a concentração de endotoxina no sulco gengival, o que poderia contribuir para a inflamação dos tecidos adjacentes aos bráquetes.

Pelo exposto, pode-se hipotetizar que, por analogia, processo semelhante de afinidade da endotoxina bacteriana ocorreria com a superfície das ligaduras,

comumente utilizadas durante o tratamento ortodôntico fixo. Paralelamente, na procura por acessórios ortodônticos mais práticos e eficientes, ligaduras elastoméricas têm sido propostas como material de escolha para conectar os arcos ortodônticos aos bráquetes, ao invés de ligaduras metálicas (Thurrow, 1975; Forsberg et al., 1991; Garcez et al., 2011), as quais atuam como um fator adicional relevante para o aumento da retenção do biofilme dental (Shirozaki et al., 2017).

Os elásticos ortodônticos podem ser divididos em duas categorias: látex e não-látex. Os elásticos de látex (ou naturais) são compostos de cadeias de cis-1,4 poli-isopreno com conservantes, normalmente amônia, adicionados para obter propriedades como elasticidade, flexibilidade e resiliência (Perrella e Gaspari, 2002). A produção de látex envolve a mistura de borracha natural com estabilizadores como o óxido de zinco e outros agentes químicos, que são aquecidos a temperaturas específicas para promover a homogeneidade final do produto. Não há padronização na composição de elásticos de látex, resultando em produtos com diferentes propriedades (Bishara e Andreasen, 1970).

Sabe-se que os materiais à base de látex são propensos a induzir reações alérgicas (Hanson e Lobner, 2004; Rihs et al., 2015), incluindo o desenvolvimento de dermatites de contato, estomatites, lesões bucais eritematosas, estresse respiratório, reações sistêmicas e choque anafilático nos casos mais severos (Everett e Hice, 1974; Tomazic et al., 1992; Syed et al., 2015; Chaubal et al., 2016). Adicionalmente, qualquer material em contato com a mucosa bucal por várias horas, dias, meses ou anos, pode desencadear respostas biológicas desfavoráveis (Martínez-Colomer et al., 2016). De acordo com resultados de estudos em cultura de células, os elásticos de látex induzem mais lise celular (Hanson e Lobner, 2004). Com relação à compatibilidade tecidual, Martínez-Colomer et al. (2016) avaliaram, comparativamente, elásticos ortodônticos látex e não-látex, concluindo que os elásticos de látex apresentaram maior porosidade e promoveram maior irritação tecidual, em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.

Em função disso, a demanda por produtos alternativos, livres de látex, tem aumentado substancialmente. Os elásticos não-látex são compostos de borracha sintética, que são polímeros artificiais que reproduzem, em maior ou menor grau, as propriedades físicas da borracha natural, denominados silicone (Hwang e Cha, 2003),

plástico poliuretano (Stevenson e Kusy, 1994) e borracha butadieno-estireno (SBR). Paralelamente, a crescente demanda por estética na Ortodontia mostrou uma urgência em incorporar materiais estéticos no tratamento ortodôntico, incluindo bráquetes cerâmicos e ligaduras elastoméricas estéticas, na busca por aparelhos mais discretos e por uma maior aceitabilidade do tratamento pelos pacientes (Kuhlman et al., 2016).

No entanto, até o momento, não há estudos publicados na literatura específica avaliando se a endotoxina bacteriana se adere às ligaduras elastoméricas estéticas e quantificando a endotoxina bacteriana possivelmente aderida à superfície dessas ligaduras, durante o tratamento com aparelhos ortodônticos fixos. Esse conhecimento seria importante do ponto de vista clínico, pois as ligaduras elastoméricas são posicionadas em grande proximidade com os tecidos gengivais e a presença de endotoxina bacteriana aderida a sua superfície poderia ocasionar ou exacerbar processos inflamatórios ou a reabsorção óssea, tornando necessária a implementação de medidas para o seu controle.

2. Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi quantificar, *in vitro* e *in vivo*, a endotoxina bacteriana aderida a ligaduras ortodônticas elastoméricas estéticas de poliuretano e de silicone, empregando o teste *Limulus Amebocyte Lysate*.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os materiais utilizados durante os experimentos, incluindo ponteiras, tubos de vidro, tubos de plástico (tubos Falcon), tubos plásticos para microcentrífuga e placas de cultura de células, foram obtidos, livres de pirogênio, diretamente do fabricante. As pinças para manuseio das ligaduras elastoméricas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo foram submetidas à esterilização em estufa de despirogenização a seco (Lab-Line Imperial V Gravity Convection Ovens – Barnstead International – Massachusetts, EUA), a 200°C, durante 2 horas.

3.1 Estudo *in vitro*

O estudo *in vitro* foi realizado com base na metodologia descrita por Bezerra da Silva et al. (2007) e Romualdo et al. (2017).

Preparo da solução de endotoxina bacteriana

No fluxo laminar, o conteúdo de um frasco com 350mg de endotoxina bacteriana liofilizada de *Escherichia coli* (Lipopolysaccharide B *E.coli* 055:B5 – Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EUA) foi suspenso em 4,7mL de água livre de pirogênio em tubo Falcon, originando uma solução de concentração igual a 25ng/mL.

Ligaduras elastoméricas

Foram utilizados quatro diferentes tipos de ligaduras elastoméricas estéticas (Tabela1).

Tabela 1- Ligaduras elastoméricas estéticas utilizadas

Sigla	Nome comercial	Código	Fabricante	Origem	Material	Lote	Data de validade
GAC poliuretano	Sani-Ties	59-200-35	Dentsply GAC	Islândia-EUA	Poliuretano	60759	2018/06
GAC silicone	Sili-Ties	59-950-00	Dentsply GAC	Islândia-EUA	Silicone	48993	2018/03
RMO poliuretano	Mini Single Case Ligature Stick	J-00345	Rock Mountain (RMO)	Denver, Colorado- EUA	Poliuretano	55399	2019/04/27
RMO silicone	Synergy® Low-friction ligatures	J-00151	Rock Mountain (RMO)	Denver, Colorado- EUA	Silicone	44764	2018/12/17

Todas as ligaduras utilizadas foram obtidas do mesmo lote, diretamente do fabricante e, até o início do experimento, foram estocadas em suas embalagens originais, sob refrigeração.

Cinco unidades de cada tipo de ligadura, retiradas de suas embalagens originais, foram contaminadas com a solução de endotoxina (Grupos I a IV) e outras cinco serviram como controle, ou seja, não foram submetidas à contaminação com endotoxina (grupos V a VIII).

Réplicas de mesmo tamanho e formato das ligaduras elastoméricas foram confeccionadas com fio de amarelo em aço inox 0.010" torcido (Dentsply, GAC, Nova Iorque, EUA) e com aço inox fundido, sendo estas últimas confeccionadas na oficina de Precisão da Universidade de São Paulo - Campus Ribeirão Preto- SP – Brasil. Após esterilização em estufa de despirogenização a seco (Lab-Line Imperial V Gravity Convection Ovens – Barnstead International – Massachusetts, EUA), a 200°C, durante 2 horas, as réplicas em aço inox foram utilizadas como controle adicional. Cinco unidades de cada réplica foram utilizadas como controle positivo, contaminadas com endotoxina – Grupo IX (réplicas de fio de amarelo torcido) e X (réplicas de aço inox fundido); e cinco como controle negativo, não contaminadas com endotoxina - Grupo XI (réplicas de fio de amarelo torcido) e XII (réplicas de aço inox fundido). A tabela 2 apresenta a caracterização dos grupos utilizados para o estudo *in vitro* e a figura 1 ilustra os materiais utilizados.

Tabela 2- Grupos do estudo *in vitro*

Grupo	Material	Contaminação com endotoxina bacteriana
Grupo I	GAC silicone	Sim
Grupo II	GAC poliuretano	Sim
Grupo III	RMO silicone	Sim
Grupo IV	RMO poliuretano	Sim
Grupo V	GAC silicone	Não
Grupo VI	GAC poliuretano	Não
Grupo VII	RMO silicone	Não
Grupo VIII	RMO poliuretano	Não
Grupo IX	Réplicas de Fio de amarelo torcido	Sim
Grupo X	Réplicas de Aço inox fundido	Sim
Grupo XI	Réplicas de Fio de amarelo torcido	Não
Grupo XII	Réplicas de Aço inox fundido	Não

Figura 1- Materiais utilizados no estudo *in vitro*. **A-** GAC silicone; **B-** GAC poliuretano; **C-** RMO silicone; **D-** RMO poliuretano; **E-** Réplica de fio de amarrilho torcido; **F-** Réplica de aço inox fundido; **G-** Kit QCL-1000™

A contaminação foi efetuada por meio de imersão das ligaduras em 1mL da solução de endotoxina, em tubos plásticos para microcentrífuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 – Hamburg, Alemanha), livres de pirogênio (Pyrogen-free tubes, BioWhittaker, Cambrex Corporate, NJ, EUA), colocados em incubadora (Incubadora 430/RDB, Nova Ética, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) a 37°C, por 1 hora, sob agitação (126rpm).

Quantificação de endotoxina bacteriana por meio do *Limulus Amebocyte Lysate*

Após o período de contaminação ou não, as ligaduras elastoméricas e as réplicas de aço inox fundido e de fio de amarrilho torcido foram colocadas individualmente em novos tubos, contendo 1mL de água livre de pirogênio (solução de recuperação), em cuba ultrassônica (Ultracleaner USC 1600A, Unique, Indaiatuba, SP, Brasil), por 15 minutos e, em seguida, agitados em aparelho Mixtron (Toptronix - São Paulo - SP - Brasil), em velocidade máxima, durante 30 segundos, para a liberação da endotoxina presente nos materiais.

A quantificação da endotoxina bacteriana liberada na solução de recuperação, expressa em UE/mL (Unidades de endotoxina por mililitro), foi efetuada por meio do teste QCL-1000™ (*Limulus Amebocyte Lysate* QCL-1000™, Lonza Walkersville, MD, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Uma curva padrão com quantidades conhecidas de endotoxina foi utilizada para determinar a concentração de endotoxina nas amostras. Em uma placa de poliestireno de 96 poços apirogênica (96 Wells Cell Culture Cluster – non pyrogenic-

Corning Incorporated – Tewksbury, MA, EUA), foram pipetados 50µL da solução preparada de cada concentração padrão conhecida (1UE/mL; 0,5 UE/mL; 0,25 UE/mL; 0,1 UE/mL; 0 UE/mL). Nos demais poços da placa foram pipetados 50µL de cada amostra obtida das ligaduras elastoméricas, diluídas em água apirogênica em uma proporção de 1:1, baseando-se em padronização obtida em estudo piloto prévio.

Posteriormente, em cada um dos poços de cada amostra foram acrescentados 50µL do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL), seguido de agitação por 15 segundos e incubação por 10 minutos a 37°C. A seguir, foram adicionados nos poços 100µL do substrato cromogênico, em ausência de luz e mantendo uma taxa de pipetagem constante, seguido de agitação e incubação por mais 6 minutos. Então, foram acrescentados 100µL de reagente de parada (25% volume de ácido acético glacial em água), a fim de interromper a reação.

Um leitor de ELISA (Ultramark, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) foi utilizado para a leitura das absorbâncias de cada amostra a 410nm, sabendo-se que a absorbância é diretamente proporcional à quantidade de endotoxina presente nos poços e sua correlação com a concentração de endotoxina é linear, na faixa de 0,1 - 1,0 UE/mL. A concentração de endotoxina em cada amostra, em UE/mL, foi calculada a partir dos valores de absorbância das soluções contendo quantidades conhecidas de endotoxina (padrão), multiplicados pelo fator de diluição.

3.2 Estudo *in vivo*

Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CAAE: 64421417.0.0000.5419 - Anexo A). A participação dos pacientes no estudo ocorreu de forma voluntária, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e do Termo de Assentimento, por parte do participante ou responsável pelo paciente.

Seleção dos pacientes

O cálculo amostral foi realizado pelo programa *SPSS Sample Power* (IBM software - Statistical Package for the Social Sciences, Inc. Chicago Illinois, EUA),

indicando que em uma amostra de 20 pacientes por grupo haveria 80% de probabilidade de ser evidenciado um efeito estatisticamente significativo. O cálculo foi baseado em cinco fatores: diferença das médias, dispersão dos escores, perda amostral, valor de alfa em 0,05 e considerando-se que os dados seriam avaliados segundo uma análise bicaudal (Weyne, 2004) e com base nos resultados do trabalho de Bergamo et al. (2017).

Foram incluídos no estudo pacientes de 15 a 30 anos de idade, sem distinção de etnia ou gênero, com bom estado geral de saúde, com dentição permanente completa e em tratamento ortodôntico na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Foram excluídos do estudo pacientes fumantes, com histórico de uso de antibióticos e/ou bochechos com soluções antimicrobianas, no período de 3 meses previamente ao início do estudo.

Procedimentos clínicos

Os pacientes receberam bráquetes metálicos convencionais (Morelli™ - Sorocaba - São Paulo - Brasil) nos dentes permanentes superiores e inferiores, de 2º pré-molar direito a 2º pré-molar esquerdo, colados com adesivo ortodôntico fotopolimerizável (Sistema Transbond XT; 3M Unitek, Monrovia, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após a colagem dos bráquetes, foi inserido um arco ortodôntico 0.014" de secção redonda de aço inoxidável (Dentsply, GAC, Nova Iorque, EUA) que foi fixado com os quatro diferentes tipos de ligaduras elastoméricas estéticas utilizadas no estudo *in vitro* (Tabela 1), denominados de grupos I, II, III e IV, no estudo *in vivo*.

Cada paciente recebeu uma escova dental Profissional (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo, SP), dentifrício fluoretado Colgate Máxima Proteção Anticáries (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo, SP) e instruções de higiene bucal individualmente, sendo orientados a escovar os dentes 3 vezes ao dia, durante o período do experimento.

Os 20 pacientes receberam uma ligadura estética de cada tipo nos caninos (13, 23, 33 e 43), que foram colocadas de forma aleatória em sistema de rodízio, seguindo o protocolo conduzido de forma cruzada para eliminar fatores de confusão, com o auxílio do programa SAS (Statistical Analysis System) para Windows versão

9.1.3 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EUA). Nos outros dentes, foram inseridas ligaduras elastoméricas convencionais da cor cinza da marca Morelli™ (Sorocaba - São Paulo – Brasil).

Vinte e um dias após, as diferentes ligaduras elastoméricas estéticas foram removidas com instrumento próprio e processadas para quantificação da endotoxina bacteriana, expressa em UE/mL, por meio do teste *Limulus Amebocyte Lysate* (QCL-1000™ – Lonza Walkersville, MD, EUA), seguindo as instruções do fabricante, conforme metodologia descrita anteriormente no estudo *in vitro*.

Todos os procedimentos clínicos foram realizados por um único operador especialista em Ortodontia.

Processamento das amostras

Após sua remoção da cavidade bucal, as ligaduras elastoméricas foram individualmente armazenadas em tubos plásticos para microcentrífuga (Eppendorf AG Barkhausenweg 1 22339 – Hamburg, Alemanha) de 1,5mL, apirogênicos, contendo 1mL de água livre de pirogênio. Em seguida, cada tubo foi codificado e colocado em cuba ultrassônica (Ultracleaner USC 1600A, Unique, Indaiatuba, SP, Brasil), por 15 minutos e, logo em seguida, agitados vigorosamente em aparelho Mixtron (Toptronix – São Paulo, SP, Brasil), em velocidade máxima, durante 30 segundos, para dessorção do material aderido a sua superfície. As ligaduras foram, então, removidas com uma pinça clínica esterilizada e os tubos contendo a suspensão foram estocados a -20°C, até o momento da quantificação da endotoxina (UE/mL), que foi realizada da mesma forma descrita no estudo *in vitro*.

3.3 Análise Estatística

No estudo *in vitro*, os dados obtidos da quantificação da endotoxina bacteriana das ligaduras foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e ao pós-teste de Dunn. No estudo *in vivo*, os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA de medidas repetidas e ao pós-teste de Tukey. Todas as análises foram efetuadas empregando o programa Graph Pad Prism 4.0 (Graph Pad Software Inc, San Diego, CA, EUA), com nível de significância de 5%.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Estudo *in vitro*

Não foi observada presença de endotoxina bacteriana nas ligaduras que não foram submetidas à contaminação prévia, ou seja, as mesmas não apresentaram contaminação por endotoxina oriunda do processo de fabricação (Grupos V a VIII). Também não foi encontrada contaminação nas réplicas metálicas pertencentes aos grupos XI e XII.

Nos grupos submetidos à contaminação, observou-se que a endotoxina bacteriana aderiu-se a todos os materiais testados (Grupos I a IV, IX e X). O grupo GAC silicone foi o que apresentou menor mediana de contaminação por endotoxina (1,15 UE/mL; Q1=1,13; Q3=1,16), em comparação aos grupos GAC poliuretano (1,17 UE/mL; Q1=1,15; Q3=1,19), RMO silicone (1,19 UE/mL; Q1=1,18; Q3=1,19), RMO poliuretano (1,22 UE/mL; Q1=1,20; Q3=1,22), aço inox fundido (1,19 UE/mL; Q1=1,18; Q3=1,20) e fio de amarelo torcido (1,20 UE/mL; Q1=1,19; Q3=1,21) ($p < 0,0001$). Não foi possível encontrar diferença estatisticamente significativa entre os demais grupos ($p > 0,05$). A Figura 2 ilustra os resultados obtidos.

Figura 2- Concentração de endotoxina bacteriana, em UE/mL, nos diferentes grupos

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre o grupo GAC silicone e os demais grupos.

4.2 Estudo *in vivo*

Nenhuma ligadura elastomérica estética foi rompida ou perdida durante o período de vinte e um dias, em nenhum paciente, ou seja, foi analisado um total de 80 ligaduras.

De maneira semelhante ao observado no estudo *in vitro*, o grupo GAC silicone foi o que apresentou menor média de contaminação por endotoxina bacteriana ($0,577 \pm 0,017$ UE/mL), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em comparação aos demais grupos. Os grupos GAC poliuretano, RMO silicone e RMO poliuretano apresentaram média de contaminação de $0,608 \pm 0,009$, $0,618 \pm 0,011$ e $0,610 \pm 0,007$ UE/mL, respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$). A Figura 3 ilustra os resultados obtidos.

Figura 3- Concentração de endotoxina bacteriana, em UE/mL, nos diferentes grupos

*Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre o grupo GAC silicone e os demais grupos.

5. Discussão

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi efetuada a quantificação da endotoxina bacteriana aderida a diferentes ligaduras elastoméricas estéticas, *in vitro* e *in vivo*. Para a avaliação da presença da endotoxina em materiais e soluções, é recomendado o emprego de testes formulados a partir do extrato de células do sangue do caranguejo *Limulus polyphemus*, denominados de testes *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL). De acordo com o fabricante, o teste LAL é um teste cromogênico, ou seja, determina a quantidade de endotoxina por meio da alteração de cor da amostra testada. Na presença de endotoxina, os componentes do LAL são ativados por uma cascata protéica, que resulta na clivagem de um substrato incolor presente no reagente do teste, com a liberação de p-nitroanilina, a qual apresenta coloração amarelada, e sua liberação é medida espectrofotometricamente a 405-410nm. Além disso, segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos (United States Pharmacopeia, 2017) e a Farmacopéia Brasileira (2010), a recuperação da endotoxina aderida a qualquer dispositivo deve ser realizada pela combinação de métodos mecânicos (agitação e utilização de ultrassom) e químicos (água livre de pirogênio), que foram os métodos empregados no presente estudo.

O teste LAL vem sendo amplamente utilizado para a detecção de endotoxina bacteriana em diversas áreas da Odontologia (Ide et al., 2004; Bezerra da Silva et al., 2007; Xavier et al., 2013; Herrera et al., 2017), inclusive na Ortodontia (Knoernschild et al., 1999; Nelson-Filho et al., 2011b; Andruciolli, 2013; Romualdo et al., 2017). Estudos prévios avaliaram a presença da endotoxina em bráquetes metálicos (Knoernschild et al., 1999; Nelson-Filho et al., 2011b), confirmando a afinidade desta substância por materiais metálicos e atribuindo à endotoxina uma provável causa adicional para a inflamação gengival comumente relatada em pacientes durante o tratamento ortodôntico, uma vez que os bráquetes são colocados próximos ao sulco gengival, predispondo os tecidos periodontais à inflamação (Nelson-Filho et al., 2011b). Os resultados do presente estudo *in vitro* também confirmaram a grande afinidade da endotoxina por materiais metálicos, uma vez que as réplicas confeccionadas em aço inox fundido e fio de amarrilho torcido foram altamente contaminadas (quantidades maiores que 1 UE/mL), sem diferença estatisticamente

significante entre estes dois grupos.

No presente estudo *in vitro*, foram detectados altos níveis de contaminação com endotoxina bacteriana nas réplicas de fio de amarelo torcido (1,20 UE/mL) e nas de aço inox fundido (1,19 UE/mL), se comparados aos resultados do estudo *in vivo* de Nelson-Filho et al. (2011b), onde observou-se valor de mediana de 0,6673 UE/mL de contaminação por endotoxina de bráquetes metálicos, 30 dias após sua instalação na cavidade bucal.

Com relação ao presente estudo *in vivo*, este foi delineado para ser do tipo crossover randomizado, cujo tipo de amostragem tem como objetivo minimizar a incorporação de vieses, os quais poderiam atuar como fatores de confusão, interferindo nos resultados obtidos. Optou-se por um estudo clínico randomizado, pois esse representa o “padrão-ouro” (delineamento ideal) das pesquisas que avaliam a eficácia clínica de materiais e técnicas de tratamento (Fletcher et al., 2002). A fim de minimizar ainda mais os possíveis fatores de confusão que pudessem interferir nos resultados, após a inserção das ligaduras elastoméricas, o material para higiene (escova e dentífrico padronizados) foi entregue aos indivíduos participantes do estudo, que receberam de um mesmo profissional as orientações com relação à maneira e frequência da escovação.

Existem disponíveis no mercado odontológico inúmeros tipos de ligaduras elastoméricas utilizadas na clínica ortodôntica para a fixação dos arcos metálicos ortodônticos. No presente estudo foram utilizadas as ligaduras elastoméricas estéticas devido à crescente busca dos pacientes por materiais estéticos (Kuhlman et al., 2016). Rosvall et al. (2009) investigaram a percepção dos pacientes com relação à estética dos aparelhos ortodônticos e observaram que os adultos valorizam mais os materiais estéticos, em detrimento dos materiais metálicos, e que os materiais estéticos aumentaram a aderência dos pacientes ao tratamento. O tratamento ortodôntico convencional, com dispositivos metálicos visíveis na face vestibular, atualmente, não é amplamente aceito pelos adultos e por pacientes com grande necessidade estética (Sfondrini et al., 2017). Além disso, ambas as marcas comerciais escolhidas para uso no presente estudo são amplamente utilizadas por Ortodontistas na prática clínica e, também, por pesquisadores na área da Ortodontia (Kawabata et al., 2016; Collier et al., 2017; Sfondrini et al., 2017).

De acordo com a literatura específica, a endotoxina bacteriana liberada pela lise dos micro-organismos Gram-negativos se adere a diversos materiais utilizados na Odontologia, como bráquetes metálicos, cerâmicas, mini-implantes ortodônticos, resinas acrílicas e titânio (Robinson et al., 1996; Knoernschild et al., 1996; Knoernschild et al., 1997; Nelson et al., 1997; Knoernschild et al., 1999; Cho et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2011b; Harder et al., 2012; Lieder et al., 2013). Entretanto, o presente estudo foi o primeiro a demonstrar que a endotoxina se liga, também, a ligaduras elastoméricas estéticas, tanto de silicone como de poliuretano, *in vitro* e *in vivo*.

Como a ligadura elastomérica é colocada em contato com os bráquetes, os quais são colocados em proximidade com o esmalte dental e com os tecidos gengivais (região crevicular), a endotoxina aderida às ligaduras poderia ser liberada continuamente, contribuindo com a inflamação gengival. Segundo Knoernschild et al. (1999), os possíveis efeitos da endotoxina presente na região crevicular sugerem que esse seja um importante fator envolvido na inflamação dos tecidos periodontais. Além disso, Romualdo et al. (2017) demonstraram que a endotoxina também se adere *in vitro* aos sistemas adesivos ortodônticos, apresentando alta afinidade por esses materiais utilizados na colagem dos bráquetes, o que seria mais um fator contribuinte para a inflamação gengival. No entanto, a relação específica entre a endotoxina bacteriana aderida aos bráquetes, aos adesivos ortodônticos e às ligaduras elastoméricas e a resposta biológica dos tecidos frente à liberação contínua de endotoxina desses sítios, ainda é desconhecida. Esse fato poderia explicar, em parte, porque mesmo pacientes com higiene bucal satisfatória apresentam, algumas vezes, inflamação persistente nos tecidos gengivais.

No que diz respeito à quantificação de endotoxina bacteriana nas ligaduras elastoméricas retiradas de suas embalagens originais, observou-se que as mesmas encontravam-se livres de endotoxina. Paralelamente, foi possível observar, tanto no presente estudo *in vitro* quanto no *in vivo*, que as ligaduras elastoméricas de ambos os materiais (silicone e poliuretano) e de ambas as marcas comerciais (GAC e Rock Mountain) apresentaram afinidade pela endotoxina bacteriana. O material que apresentou o melhor desempenho, ou seja, menor quantidade de endotoxina aderida, em ambos os estudos, foi o silicone da marca GAC, em comparação aos

demais materiais. Tal fato poderia ser explicado, em parte, pelas diferenças na composição dos materiais utilizados. Como os materiais elásticos e poliméricos são também utilizados na área médica (Haugen et al., 2006; Braun et al., 2016), Braun et al. (2016) compararam as propriedades de cateteres à base de poliuretano e de silicone, observando diferenças entre estes dois tipos de materiais. Segundo esses autores, a morfologia da superfície e a composição química dos materiais de poliuretano resultaram em maior susceptibilidade a infecções sanguíneas e complicações trombóticas. Já os cateteres de silicone apresentaram mais falhas mecânicas, em comparação ao poliuretano. Tendo em vista que, no presente trabalho, a endotoxina bacteriana mostrou alta afinidade pelo silicone e pelo poliuretano, estudos adicionais estruturais, microestruturais e físico-químicos são necessários, a fim de elucidar as razões pelas quais as ligaduras GAC silicone apresentaram contaminação inferior aos demais materiais avaliados.

Na área da Odontologia, as ligaduras elastoméricas utilizadas no presente estudo já foram avaliadas com relação a alterações de cor (Kawabata et al., 2016), a propriedades relacionadas à resistência ao deslizamento (Bortoly et al., 2008) e com relação à força e a alterações dimensionais (Masoud et al., 2016). Entretanto, não há estudos na literatura específica quantificando a endotoxina bacteriana aderida a ligaduras elastoméricas, o que impossibilita uma comparação direta dos resultados do presente estudo com resultados de estudos prévios.

Portanto, estudos clínicos adicionais são necessários a fim de avaliar métodos de inativação da endotoxina bacteriana, tendo em vista sua afinidade por diversos componentes dos aparelhos ortodônticos fixos, inclusive pelas ligaduras elastoméricas estéticas de silicone e de poliuretano. A implementação de medidas para o controle clínico dos micro-organismos periodontopatogênicos e da endotoxina bacteriana seria de grande importância clínica para a manutenção da saúde periodontal dos pacientes sob tratamento ortodôntico.

6. Conclusão

6. CONCLUSÃO

Com base nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos nos estudos *in vitro* e *in vivo*, pôde-se concluir que a endotoxina bacteriana apresentou afinidade pelas ligaduras elastoméricas estéticas à base de poliuretano e de silicone testadas. As ligaduras elastoméricas de silicone da marca GAC foram as que apresentaram menor quantidade de endotoxina aderida à sua superfície.

Referências

REFERÊNCIAS

- Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Prevalence of cariogenic streptococci on incisor brackets detected by polymerase chain reaction. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007;131:736- 41.
- Albandar JM, Rams TE. Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontol* 2000. 2002;29:207-22.
- Andrucioli MC, Nelson-Filho P, Matsumoto MA, Saraiva MC, Feres M, de Figueiredo LC, Martins LP. Molecular detection of in-vivo microbial contamination of metallic orthodontic brackets by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012 Jan;141(1):24-9.
- Andrucioli MCD. Mini-implantes ortodônticos: avaliação microbiológica e quantificação de endotoxina bacteriana, citocinas pró-inflamatórias e marcadores da osteoclastogênese [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia USP;2013.
- Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, Furusawa K, Kurihara S, Wang PL. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2009 Feb;44(1):21-7.
- Bagatin CR, Andrucioli MCD, Ferreira JTL, Matsumoto MAN, da Silva RAB, da Silva LAB, Romano FL, Nelson-Filho P. Biofilm formation in Haas palatal expanders with and without use of an antimicrobial agent: an in situ study. *Microsc Res Tech*. 2017 May;80(5):471-477
- Barão VA, Mathew MT, Yuan JC, Knoernschild KL, Assunção WG, Wimmer MA, Sukotjo C. Influence of corrosion on lipopolysaccharide affinity for two different titanium materials. *J Prosthet Dent*. 2013 Dec;110(6):462-70.
- Benahmed M, Heymann D, Pilet P, Bienvenu J, Daculsi G. LPS increases biomaterial degradation by human monocytes in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1997 Jan;34(1):115-9.
- Bergamo AZN, Nelson-Filho P, Andrucioli MCD, do Nascimento C, Pedrazzi V, Matsumoto MAN. Microbial complexes levels in conventional and self-ligating brackets. *Clin Oral Investig*. 2017 May;21(4):1037-1046.
- Bergamo AZN, Nelson-Filho P, do Nascimento C, Casarin RCV, Casati MZ, Andrucioli MCD, Kuchler EC, Longo DL, da Silva LAB, Matsumoto MAN. Cytokine profile changes in gingival crevicular fluid after placement different brackets types. *Arch Oral Biol*. 2018 Jan;85:79-83
- Bezerra da Silva RA, Leonardo MR, Faccioli LH, Medeiros AI, Nelson-Filho P. Effect of different methods of sterilization on the inactivation of bacterial endotoxin (LPS) in endodontic files. *Braz J Microbiol*. 2007, 38(2): 270-272.
- Bishara SE, Andreasen GF. A comparison of time related forces between plastic elastics and latex elastics. *Angle Orthod*. 1970;40:319–328.
- Bortoly TG, Guerrero AP, Rached RN, Tanaka O, Guariza-Filho O, Rosa EA. Sliding resistance with esthetic ligatures: an in-vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008 Mar;133(3):340.e1-7.

Bozkurt SB, Hakki SS, Hakki EE, Durak Y, Kantarci A. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces a pro-inflammatory human gingival fibroblast phenotype. *Inflammation*. 2017 Feb;40(1):144-153.

Braun U, Lorenz E, Weimann C, Sturm H, Karimov I, Ettl J, Meier R, Wohlgemuth WA, Berger H, Wildgruber M. Mechanic and surface properties of central-venous port catheters after removal: A comparison of polyurethane and silicon rubber materials. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016 Dec;64:281-91.

Brêtas SM, Macari S, Elias AM, Ito IY, Matsumoto MAN. Effect of 0,4% stannous fluoride gel on mutans streptococci in relation to elastomeric rings and steel ligatures in orthodontic patients. *J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005;127:428-33.

Brusca M, Chara O, Sterin-Borda L, Rosa A. Influence of different orthodontic brackets on adherence of microorganism in vitro. *Angle Orthodontis* 2007;77:331-336.

Cardoso Mde A, Saraiva PP, Maltagliati LA, Rhoden FK, Costa CC, Normando D, Capelozza Filho L. Alterations in plaque accumulation and gingival inflammation promoted by treatment with self-ligating and conventional orthodontic brackets. *Dental Press J Orthod*. 2015 Mar-Apr;20(2):35-41.

Carroll MV, Sim RB. Complement in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Sep 16;63(12):965-75.

Chaubal TV, Bapat RA, Patil PG, Shetty A. Allergic contact dermatitis caused by latex gloves in a dental undergraduate student. *Contact Dermatitis*. 2016 Oct;75(4):256-7.

Cheon YH, Kim JY, Baek JM, Ahn SJ, So HS, Oh J. Niclosamide suppresses RANKL- induced osteoclastogenesis and prevents LPS-induced bone loss. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Feb 5;470(2):343-9.

Cho DR, Shanbhag AS, Hong CY, Baran GR, Goldring SR. The role of adsorbed endotoxin in particle-induced stimulation of cytokine release. *J Orthop Res*. 2002 Jul;20(4):704-13.

Collier S, Pandis N, Johal A, Qureshi U, Sharma PK, Fleming PS. A prospective cohort study assessing the appearance of retrieved aesthetic orthodontic archwires. *Orthod Craniofac Res*. 2017 Dec 4.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patologia estrutural e funcional*. 1991. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p1231.

Daly CG, Seymour GJ, Kieser JB. Bacterial endotoxin: a role in chronic inflammatory periodontal disease? *J Oral Pathol*. 1980 Jan; 9 (1):1-15.

Diamanti-Kipioti A, Gusberti FA, Lang NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. *J Clin Periodontol*. 1987 Jul;14(6):326-33. Erratum in: *J Clin Periodontol* 1990 Jan;17(1):66.

Dos Santos Gerzson DR, Simon D, Dos Anjos AL, Freitas MP. In vitro evaluation of microbial contamination of orthodontic brackets as received from the manufacturer using microbiological and molecular tests. *Angle Orthod*. 2015 Nov;85(6):992-6.

Everett FG, Hice TL. Contact stomatitis resulting from the use of orthodontic rubber elastics: report of case. *J Am Dent Assoc*. 1974;88:1030-1031.

- Faltermeier A, Burgüers R, Rosentritt M. Bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* to esthetic bracket materials. Am J Orthop 2008; 133:S99-103.
- Fletcher AE, Bulpitt CJ, Thijs L, Tuomilehto J, Antikainen R, Bossini A, Browne J, Duggan J, Kawecka-Jaszcz K, Kivinen P, Sarti C, Terzoli L, Staessen JA; Syst-Eur Trial Investigators. Quality of life on randomized treatment for isolated systolic hypertension: results from the Syst-Eur Trial. J Hypertens. 2002 Oct;20(10):2069-79.
- Forberg CM, Brattstrom V, Malmberg E, Nord CE. Ligature wires and elastomeric rings: two methods of ligation, and their association with microbial colonization of *Streptococcus mutans* and lactobacili. Eur J Orthod 1991;13:416-20.
- Gagnon F, Knoernschild KL, Payant L, Tompkins GR, Litaker MS, Schuster GS. Endotoxin affinity for provisional restorative resins. J Prosthodont. 1994 Dec;3(4):228-36.
- Garcez AS, Suzuki SS, Ribeiro MS, Mada EY, Freitas AZ, Suzuki H. Biofilm retention by 3 methods of ligation on orthodontic brackets: a microbiologic and optical coherence tomography analysis. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2011 Oct;140(4):e193-8.
- Gomes C, Martinho FC, Barbosa DS, Antunes LS, Póvoa HCC, Baltus THL, Morelli NR, Vargas HO, Nunes SOV, Anderson G, Maes M. Increased root canal endotoxin levels are associated with chronic apical Periodontitis, increased oxidative and nitrosative stress, major depression, severity of depression, and a lowered quality of life. Mol Neurobiol. 2017 Apr 28.
- Guo R, Lin Y, Zheng Y, Li W. The microbial changes in subgingival plaques of orthodontic patients: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. BMC Oral Health. 2017 Jun 2;17(1):90.
- Haas AN, Pannuti CM, Andrade AK, Escobar EC, Almeida ER, Costa FO, Cortelli JR, Cortelli SC, Rode SD, Pedrazzi V, Oppermann RV. Mouthwashes for the control of supragingival biofilm and gingivitis in orthodontic patients: evidence-based recommendations for clinicians. Braz Oral Res. 2014 Jul 11;28(spe):1-8.
- Hanson M, Lobner D. In vitro neuronal cytotoxicity of latex and non-latex orthodontic elastics. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2004;126:65–70.
- Harder S, Quabius ES, Ossenkop L, Mehl C, Kern M. Surface contamination of dental implants assessed by gene expression analysis in a whole-blood in vitro assay: a preliminary study. J Clin Periodontol. 2012 Oct;39(10):987-94.
- Haugen H, Aigner J, Brunner M, Wintermantel E. A novel processing method for injection-molded polyether-urethane scaffolds. Part 2: cellular interactions. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2006 Apr;77(1):73-8.
- Herrera DR, Martinho FC, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. Int Endod J. 2017 Oct;50(10):933-940.
- Heymann GC, Grauer D. A contemporary review of white spot lesions in orthodontics. J Esthet Restor Dent. 2013;25(2):85-95.
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. Biochem Biophys Res Commun. 1988 Nov 30;157(1):87-94.

Höchli D, Hersberger-Zurfluh M, Papageorgiou SN, Eliades T. Interventions for orthodontically induced white spot lesions: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Orthod*. 2017 Apr 1;39(2):122-133.

Hook WA, Snyderman R, Mergenhagen SE. Histamine releasing factor generated by the interaction of endotoxin with hamster serum. *Infect Immun*. 1970.v2,p462-7.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from gram-negative bacteria isolated from infected root canals. *Oral Surg*. 1992.v74,p648-51.

Huser MC, Baehni PC, Lang R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1990 Mar;97(3):213-8.

Hwang CJ, Cha JY. Mechanical and biological comparison of latex and silicone rubber bands. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003;124:379–386.

Ide M, Jagdev D, Coward PY, Crook M, Barclay GR, Wilson RF. The short-term effects of treatment of chronic periodontitis on circulating levels of endotoxin, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6. *J Periodontol*. 2004 Mar;75(3):420-8.

Ishihara Y, Nishihara T, Maki E, Noguchi T, Koga T. Role of interleukin-1 and prostaglandine in in vitro bone resorption induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *J Periodontal Res*. 1991 May;26 (3 Pt1):155-60.

Jenkins WM, Papapanou PN. Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents. *Periodontol 2000*. 2001;26:16-32.

Kanno Y, Ishisaki A, Kawashita E, Kuretake H, Ikeda K, Matsuo O. uPA attenuated LPS-induced inflammatory osteoclastogenesis through the Plasmin/PAR- 1/Ca(2+)/CaMKK/AMPK axis. *Int J Biol Sci*. 2016 Jan 1;12(1):63-71.

Kawabata E, Dantas VL, Kato CB, Normando D. Color changes of esthetic orthodontic ligatures evaluated by orthodontists and patients: a clinical study. *Dental Press J Orthod*. 2016 Sep-Oct;21(5):53-57.

Khoroushi M, Kachuie M. Prevention and treatment of white spot lesions in orthodontic patients. *Contemp Clin Dent*. 2017 Jan-Mar;8(1):11-19.

Kim K, Jung WS, Cho S, Ahn SJ. Changes in salivary periodontal pathogens after orthodontic treatment: An in vivo prospective study. *Angle Orthod*. 2016 Nov;86(6):998-1003.

Knoernschild KL, Tompkins GR, Lefebvre CA, Griffiths LL, Schuster GS. Effect of pH on *Porphyromonas gingivalis* endotoxin affinity for resins. *Int J Prosthodont*. 1996 May-Jun;9(3):239-47.

Knoernschild KL, Tompkins GR, Schuster GS, Lefebvre CA, Russell CM. Effect of treatment concentration on lipopolysaccharide affinity for two alloys. *Dent Mater*. 1997 Mar;13(2):111-7.

Knoernschild KL, Rogers HM, Lefebvre CS, Fortson WM, Schuster GS. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;115:634-9.

Kuhlman DC, Lima TA, Duplat CB, Capelli J Junior. Esthetic perception of orthodontic appliances by Brazilian children and adolescents. *Dental Press J Orthod*. 2016 Sep-Oct;21(5):58-66.

Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol* 2005; 43:260-5.

Lessa FC, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. *In-vivo* evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2007 Jun;131(6):705.e11-7.

Leung NM, Chen R, Rudney JD. Oral bacteria in plaque and invading buccal cells in young orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006; 130:698.e18.

Lieder R, Petersen PH, Sigurjónsson ÓE. Endotoxins-the invisible companion in biomaterials research. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013 Oct;19(5):391-402.

Magno AF, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MA, Faria G, Nelson-Filho P. *In-vivo* evaluation of the contamination of Super Slick elastomeric rings by *Streptococcus mutans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008 Apr;133(4 Suppl):S104-9.

Mártha K, Lőrinczi L, Bică C, Gyergyay R, Petcu B, Lazăr L. Assessment of periodontopathogens in subgingival biofilm of banded and bonded molars in early phase of fixed orthodontic treatment. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2016 Mar;63(1):103-13.

Martínez-Colomer S, Gatón-Hernández P, Romano FL, De Rossi A, Fukada SY, Nelson-Filho P, Consolaro A, Silva RA, Silva LA. Latex and nonlatex orthodontic elastics: *In vitro* and *in vivo* evaluations of tissue compatibility and surface structure. *Angle Orthod*. 2016 Mar;86(2):278-84.

Maruo IT, Rosa EAR, Maruo H, Tanaka O, Guariza F, Ignácio AS, Camargo ES. Effects of chlorhexidine mouth rinse on Streptococci counts of tooth-tissue-borne-palatal expander biofilm. *Orthop Craniofac Res* 2008;11:136-142.

Masoud AI, Bulic M, Viana G, Bedran-Russo AK. Force decay and dimensional changes of thermoplastic and novel thermoset elastomeric ligatures. *Angle Orthod*. 2016 Sep;86(5):818-25.

Morrison B, Kline L. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol*. 1977.v118,p362-8.

Nassar PO, Bombardelli CG, Walker CS, Neves KV, Tonet K, Nishi RN, Bombonatti R, Nassar CA. Periodontal evaluation of different toothbrushing techniques in patients with fixed orthodontic appliances. *Dental Press J Orthod*. 2013 Jan-Feb;18(1):76-80.

Nelson SK, Knoernschild KL, Robinson FG, Schuster GS. Lipopolysaccharide affinity for titanium implant biomaterials. *J Prosthet Dent*. 1997 Jan;77(1):76-82.

Nelson-Filho P, Leonardo ML, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod* 2002;28:694-6.

Nelson Filho P, Olmedo LY, Andrucioli MCD, Saraiva MCP, Matsumoto MAN, de Queiroz AM, da Silva RA, da Silva LA. Use of the checkerboard DNA-DNA hybridisation technique for in vivo detection of cariogenic microorganisms on metallic brackets, with or without use of an antimicrobial agent. J Dent 2011a;39:513-7.

Nelson-Filho P, Valdez RMA, Andrucioli MCD, Saraiva MCP, Feres M, Sorgi CA, Faccioli LH. Gram-negative periodontal pathogens and bacterial endotoxin in metallic orthodontic brackets with or without use of an antimicrobial agent: an in vivo study. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2001b;140:e281-e287.

Ou YY, Jiang Y, Li H, Zhang YY, Lu Y, Chen DF. Polysaccharides from *Arnebia euchroma* ameliorated endotoxic fever and acute lung injury in rats through inhibiting complement system. Inflammation. 2017 Feb;40(1):275-284.

Pan S, Liu Y, Zhang L, Li S, Zhang Y, Liu J, Wang C, Xiao S. Profiling of subgingival plaque biofilm microbiota in adolescents after completion of orthodontic therapy. PLoS One. 2017a Feb 3;12(2):e0171550.

Pan S, Liu Y, Si Y, Zhang Q, Wang L, Liu J, Wang C, Xiao S. Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in adolescent orthodontic patients. PLoS One. 2017b Nov 27;12(11):e0188420.

Papaioannou W, Gizani S, Haffajee AD, Quirynen M, Mamai-Homata E, Papagiannoulis L. The microbiota on different types of brackets. Angle Orthodontist 2007;77:1090- 1095.

Peixoto IT, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. Evaluation of home disinfection protocols for acrylic baseplates of removable orthodontic appliances: A randomized clinical investigation. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2011 Jul;140(1):51- 7.

Perrella FW, Gaspari AA. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. Methods. 2002;4:77-86.

Pinto AS, Alves LS, Zenkner JEDA, Zanatta FB, Maltz M. Gingival enlargement in orthodontic patients: effect of treatment duration. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2017 Oct;152(4):477-482.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. Sci Am. 1992 Aug;267(2):54-61.

Rihs HP, Sander I, Heimann H, Meurer U, Brüning T, Raulf M. The new latex allergen Hev b 15: IgE-binding properties of a recombinant serine protease inhibitor. J Investig Allergol Clin Immunol. 2015;25(2):160-2.

Robinson FG, Knoernschild KL, Sterrett JD, Tompkins GR. *Porphyromonas gingivalis* endotoxin affinity for dental ceramics. J Prosthet Dent. 1996 Feb;75(2):217-27.

Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, Kirkwood KL. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. J Periodontol. 2007 Mar;78(3):550-8.

Romualdo PC, Guerra TR, Romano FL, Silva RABD, Brandão IT, Silva CL, Silva LABD, Nelson-Filho P. Bacterial endotoxin adhesion to different types of orthodontic adhesives. J Appl Oral Sci. 2017 Jul-Aug;25(4):436-441.

- Rosvall MD, Fields HW, Ziuchkovski J, Rosenstiel SF, Johnston WM. Attractiveness, acceptability, and value of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009;135(3):276.e1–276.12.
- Sallum EJ, Nouer DF, Klein MI, Gonçalves RB, Machion L, Sallum AW, Sallum EA. Clinical and microbiologic changes after removal of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:363-6.
- Sfondrini MF, Gandini P, Gioiella A, Zhou FX, Scribante A. Orthodontic metallic lingual brackets: the dark side of the moon of bond failures? *J Funct Biomater*. 2017 Jul 7;8(3).
- Shirozaki MU, Ferreira JTL, Küchler EC, Matsumoto MAN, Aires CP, Nelson-Filho P, Romano FL. Quantification of *Streptococcus mutans* in different types of ligature wires and elastomeric chains. *Braz Dent J*. 2017 Jul-Aug;28(4):498-503.
- Silva LA, Silva RAB, Branco LG, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 2008;19(4):296- 300.
- Sosroseno W, Bird OS, Seymour GJ. Nitric oxide production by a human osteoblast cell line stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Feb;24(1):50-5.
- Speer C, Pelz K, Hopfenmuller W, Holtgrave EA. Investigations on the influencing of the subgingival microflora in chronic periodontitis: a study in adult patients during fixed appliance therapy. *J Orofac Orthop*. 2004;65:34–47.
- Stevenson JS, Kusy RP. Force application and decay characteristic of untreated and treated polyurethane elastomeric chains. *Angle Orthod*. 1994;64:455–467.
- Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1992;65:287-346.
- Syed M, Chopra R, Sachdev V. Allergic reactions to dental materials - a systematic review. *J Clin Diagn Res*. 2015 Oct;9(10):ZE04-9.
- Thurrow RC. Letter: Elastic ligatures, binding forces, and anchorage taxation. *Am J Orthod*. 1975 Jun;67(6):694.
- Tomazic VJ, Withrow TJ, Fisher BR, Dillard SF. Latex associated allergies and anaphylactic reactions. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992;64:89–97.
- Van Gastel J, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C. Longitudinal changes in microbiology and clinical periodontal parameters after removal of fixed orthodontic appliances. *Eur J Orthod*. 2011 Feb;33(1):15-21.
- Weyne CA. Determinação do tamanho da amostra em pesquisas experimentais na área de saúde. *Arq. Med*. 2004, 29(2): 87-90.

Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, Carvalho CA. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. J Endod. 2013 Aug;39(8):959-64.

Yitschaky O, Katorza A, Zini A, Yitschaky M, Zadik Y. Acrylic orthodontic retainer is not a risk factor for focal Candida colonization in young healthy patients: a pilot study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2016 Jan;121(1):39-42.

Anexo

ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comitê de Ética em Pesquisa

Atest.CEP 001/2018

ATESTADO

Atestamos, de acordo com os registros desta Secretaria, que o Protocolo CAAE nº 64421417.0.0000.5419 sobre a pesquisa intitulada **"Ligaduras ortodônticas elastoméricas estéticas: quantificação de endotoxina bacteriana in vivo, com e sem uso de agente antimicrobiano"**, sob a responsabilidade de Letícia Sgarbi Pinto, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, em 22/02/2017.

We hereby certify, in accordance with the existing settlements of this Office, that the Protocolo CAAE nº 64421417.0.0000.5419 about the research entitled **"Orthodontic elastomeric aesthetic ligatures: quantification of bacterial endotoxin in vivo, with and without use of antimicrobial agent"**, under responsibility of Letícia Sgarbi Pinto, was approved by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, in 22/02/2017.

Ribeirão Preto, 31 de janeiro de 2018.

Mara Elisa Ferreira Oliva
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa
FORP/USP