

# GENOTOXICIDADE DOS ELASTÔMEROS ORTODÔNTICOS: ESTUDO *IN VITRO*

Márcia E. C. Corrêa: Doutorando do Programa de Pós-Graduação Odontologia da Ulbra- Canoas, RS - Brasil

Maria P. M. F. Azevedo: Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação Odontologia da Ulbra- Canoas, RS - Brasil

Rafael Dihl: Professor Doutor do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada da Ulbra Canoas, RS – Brasil

Ivana Grivicich: Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada da Ulbra Canoas, RS – Brasil

**Introdução:** A biocompatibilidade dos materiais utilizados na Ortodontia ainda é motivo de preocupação, especialmente em relação aos elastômeros intra orais. **Objetivos:** Testar “in vitro” a genotoxicidade destes materiais para fibroblastos de ratos (linhagem L929), considerando a presença ou não de látex em diferentes marcas comerciais. **Material e Método:** Para tanto, foram utilizados 36 corpos de prova divididos em 9 grupos experimentais das seguintes marcas: 3M Unitek®, American Orthodontics®, GAC®, Morelli®, RMO® e TP Orthodontics®. A genotoxicidade foi avaliada através do Ensaio cometa. Como controle negativo foi utilizado o crescimento celular e controle positivo, o hipoclorito de sódio a 1%. Os dados foram submetidos aos testes estatísticos *One-way* ANOVA e teste *post-hoc* de Dunnett, com nível de significância de 5%. **Resultados:** Os resultados mostraram que todos os grupos de elastômeros com ou sem látex das diferentes marcas comerciais apresentaram altos percentuais de danos ao DNA das células, sendo significativamente diferentes do controle negativo ( $p < 0,05$ ); as médias para os grupos de elastômeros com látex foram maiores em relação aos sem látex, mas sem diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** Concluiu-se que todos elastômeros avaliados foram genotóxicos para as células avaliadas, independente da presença do látex ou da marca comercial, assim como não houve diferença entre os elásticos com e sem látex de cada marca, sugerindo que a genotoxicidade não está somente associada à presença desse componente.

**Palavras-Chave:** Ortodontia. Elastômeros. Genotoxicidade.

## INTRODUÇÃO

A biocompatibilidade dos materiais dentários tem sido tema de grande especulação, seja pelo aumento das manifestações clínicas das reações alérgicas causadas por estes nos pacientes ou pela conscientização e conhecimento dos possíveis efeitos adversos decorrentes do uso desses materiais (Menezes et al. 2004). Em especial na Ortodontia, vários materiais mantêm contato direto com tecidos orgânicos por longos períodos de tempo, a exemplo dos elastômeros (Santos et al. 2009; Angilieri et al. 2011).

A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade dos tecidos entrarem em contato com um determinado material e não manifestar qualquer tipo de reação tóxica, irritante, inflamatória, alérgica ou de fundo mutagênico ou carcinogênico, sendo a ocorrência de qualquer reação adversa chamada de toxicidade (Santos et al. 2009; Menezes et al. 2009; Santos et al. 2010).

A genotoxicidade engloba os processos mutagênicos ou carcinogênicos, sendo, portanto, de suma importância na seleção dos materiais de forma segura para os pacientes ( Westphalen et al. 2008).

O uso de elastômeros em Ortodontia iniciou-se no final do século XIX e tem sido incrementado com a melhora de suas propriedades. Muito utilizados como substitutos às ligaduras metálicas na movimentação dentária, seja para retração de dentes, fechamento de espaços, correção de relações interarcos e como auxiliares na utilização de aparelhos extra bucais, estes apresentam-se como importantes instrumentos na obtenção de resultados favoráveis durante o tratamento (Hanson e Lobner, 2004; Lariato et al., 2006; Pithon et al., 2008(b)).

Em relação à sua composição, os elastômeros ortodônticos podem ser de látex ou materiais sintéticos (Wong,1976).<sup>1</sup>Em geral, aqueles à base de látex são obtidos a partir da borracha natural, proveniente da árvore chamada seringueira (*Hevea brasiliensis*), cuja fórmula química é cis 1,4 poliisopreno e apresenta maior utilização devido às melhores propriedades como flexibilidade, menor custo e maior capacidade de retornar às dimensões originais após sofrerem deformações (Leão Filho et al., 2013). Já os materiais sintéticos, produzidos à base de poliuretano, também chamados de plásticos, são obtidos por meio de

transformações químicas do carvão, petróleo e alguns álcoois vegetais (Henriques et al., 2003).

Apesar da ampla utilização clínica, os materiais obtidos do látex têm um grande potencial de causar alergias. As reações alérgicas relatadas pelos pacientes vão desde o inchaço e estomatites até lesões eritematosas, respiratórias e choque anafilático (Hain et al., 2007; Santos et al., 2010).

Tendo como base os referidos efeitos provocados pelo uso dos elastômeros, os fabricantes têm proposto alternativas sem látex na sua composição. Entretanto, apesar de existirem trabalhos sobre a citotoxicidade desses materiais, a literatura é escassa em relação a sua genotoxicidade, bem como sobre a real relação dos efeitos com o látex.

Baseado nestes achados e buscando elucidar questões acerca da biocompatibilidade dos elastômeros intraorais utilizados na terapêutica ortodôntica, os autores deste estudo propuseram-se a avaliar a genotoxicidade desses materiais, considerando a presença/ ausência do látex, bem como comparando diferentes marcas comerciais.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **Amostra**

A amostra foi composta por 36 elastômeros intraorais (3/16”), divididos em nove grupos experimentais, com n=4, conforme Tabela 1 (Figura 1), das seguintes marcas comerciais: American Orthodontic® (St. Louis-Illinois, USA), RMO® (Denver-Colorado, USA), Morelli® (Sorocaba-São Paulo, Brasil), TP Orthodontic® (La Porte-Indiana, USA), GAC® (Islandia-New York, USA), e 3M Unitek® (Saint Paul-Minnesota, USA).

Como Controle Negativo C(-) foi utilizado o crescimento celular e, como Controle Positivo C(+), o hipoclorito de sódio a 1%.

## Cultura de Células

Fibroblastos de ratos da linhagem L929 foram cultivados em monocamadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (TPP), contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos (combinado de estreptomicina, penicilina a 1% e gentamicina a 0,1%, obtidos da Gibco) a 37°C em uma incubadora (ThermoScientific) com 5% de CO<sub>2</sub>.

Tabela 1: Grupos experimentais com características dos elastômeros.

	<b>TIPO</b>	<b>MARCA COMERCIAL</b>	<b>n</b>	<b>Látex</b>	<b>Cor</b>
<b>Controle (-)</b>	Crescimento celular	-	4	-	
<b>GRUPO 1 (G1)</b>	Elástico intra-oral (3/16)	<b>American Orthodontics®</b>	4	Sim	Natural
<b>GRUPO 2 (G2)</b>	Elástico intra-oral (3/16)	<b>American Orthodontics®</b>	4	Não	Transparente
<b>GRUPO 3 (G3)</b>	Elástico intra-oral (3/16)	<b>RMO®</b>	4	Sim	Natural
<b>GRUPO 4(G4)</b>	Elástico intra-oral (3/16)	<b>RMO®</b>	4	Não	Colorida
<b>GRUPO 5 (G5)</b>	Elástico intra-oral (3/16)	<b>Morelli®</b>	4	Sim	Natural
<b>GRUPO 6 (G6)</b>	Elástico intra-oral (3/16)	<b>Morelli®</b>	4	Não	Transparente
<b>GRUPO 7 (G7)</b>	Elástico intra-oral (3/16)	<b>TP Orthodontics®</b>	4	Sim	Natural
<b>GRUPO 8 (G8)</b>	Elástico intra-oral (3/16)	<b>GAC®</b>	4	Sim	Natural
<b>GRUPO 9 (G9)</b>	Elástico intra-oral (3/16)	<b>3M UNITEK®</b>	4	Sim	Natural
<b>Controle (+)</b>	Hipoclorito 1%	Hipoclorito de sódio a 1%	4	-	

## Ensaio Cometa

Para a determinação da genotoxicidade dos elastômeros, 1X10<sup>5</sup> células foram semeadas por poço em placas de 24 poços (TPP) e incubadas durante 24 horas em meio DMEM completo, após lavou-se as células com DPBS e, em seguida submeteu as mesmas aos tratamentos com os diferentes elásticos. No final dos tratamentos, as células foram lavadas com DPBS a 37°C e tripsinizadas com 350 µL de tripsina. Após 5 minutos, estas mesmas células foram

ressuspendidas em meio completo, e o volume da suspensão celular imediatamente utilizado para o ensaio.

Antes da análise das células, estas foram homogeneizadas com gel de agarose de baixo ponto de fusão, distribuídas sobre lâminas de vidro previamente cobertas com gel de agarose de ponto de fusão normal. Após, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise e submetidas a um campo elétrico que induz à migração de fragmentos livres de DNA para fora do núcleo. Após a eletroforese em condições alcalinas ( $\text{pH} > 13$ ), as lâminas foram coradas com brometo de etídio e os núcleos das células portadoras de quebras de DNA foram visualizadas (Figura 1).

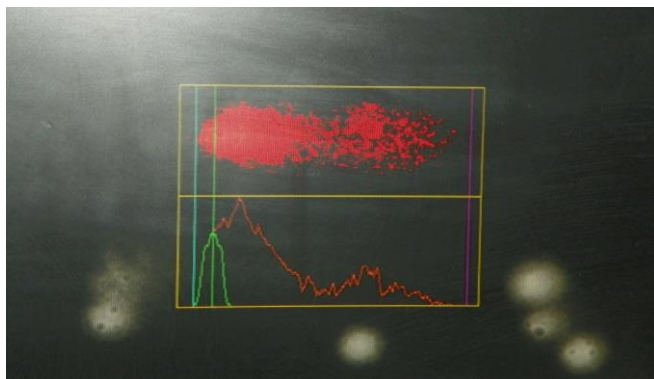


Figura 1: Célula com cometa.

Após coloração, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51). Um total de 100 células foram analisadas por amostra – 25 células contadas para cada repetição. Os núcleos intactos aparecem redondos, enquanto que nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, mostrando uma cauda de fragmentos, semelhante a um cometa. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estarem associados ao núcleo por uma cauda simples. A classificação dos cometas foi realizada por meio de um software (Comet Assay IV - Perceptive) acoplado ao microscópio.

### **Análise Estatística**

Para análise estatística sobre a ação genotóxica das amostras utilizou-se a Análise de Variância (one-way ANOVA) e teste posthoc de Dunnett com  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

A partir dos dados obtidos na Tabela 2, pôde-se observar que todos os grupos de elastômeros com e sem látex das diferentes marcas testadas mostraram-se genotóxicos, sendo significativamente diferentes do controle negativo ( $p < 0,05$ ). Salienta-se, ainda, que os grupos G5 (Morelli® com látex) e G9 (3M Unitek® com látex) foram tão genotóxicos a ponto de não permitirem a análise pelo teste cometa.

Tabela 2: Danos no DNA após exposição (24 horas) das células L929 nos diferentes grupos avaliados

<b>Controles</b>	<b>Teste Cometa (% de DNA na Cauda) Média ± DP</b>	<b>Coefficiente de Variação (%)</b>
Negativo	5.5±2.2	40%
Positivo	35.1±12.2 <sup>a</sup>	34,75%
<b>Elásticos</b>		
G1 – AMO® (com látex)	62.2±6.6 <sup>a,c</sup>	10,61%
G2 – AMO® (sem látex)	37.6±23.8 <sup>a</sup>	63,30%
G3 – RMO® (com látex)	30.7±10.3 <sup>a</sup>	35,55%
G4 - RMO® (sem látex)	30.6±18.8 <sup>a</sup>	61,44%
G5 - Morelli® (com látex)	*	
G6 - Morelli® (sem látex)	16.3±7.0 <sup>b</sup>	42,94%
G7 – TP® (com látex)	31.3±7.2 <sup>a</sup>	23 %
G8 – GAC® (com látex)	16.2±6.1 <sup>b</sup>	37,65%
G9 - Unitek® (com látex)	*	

**a** Significativo em relação ao controle negativo,  $P < 0.001$ ; **b** Significativo em relação ao controle negativo,  $P < 0.05$ ; **c** Significativo em relação a G6 e G8,  $P < 0.01$ . One-way ANOVA e teste *post-hoc* de Dunnett.

As médias para os grupos de elastômeros com látex foram semelhantes em relação aos sem látex, exceto entre os grupos G1 (American Orthodontics® com látex) e G6 (Morelli® sem látex).

Para os grupos com látex, pode-se considerar mais genotóxicos em ordem crescente os grupos: GAC®, RMO® TP Orthodontic®, American Orthodontics®, Morelli® / 3M Unitek ®. Já para os sem látex, Morelli®, RMO® e American Orthodontics®.

O Gráfico 1 mostra os valores mínimos e máximos encontrados em cada grupo, onde se pode observar nítidas variações, sendo maiores nos grupos de elastômeros sem látex G2 (American Orthodontics®) e G4 (RMO®).

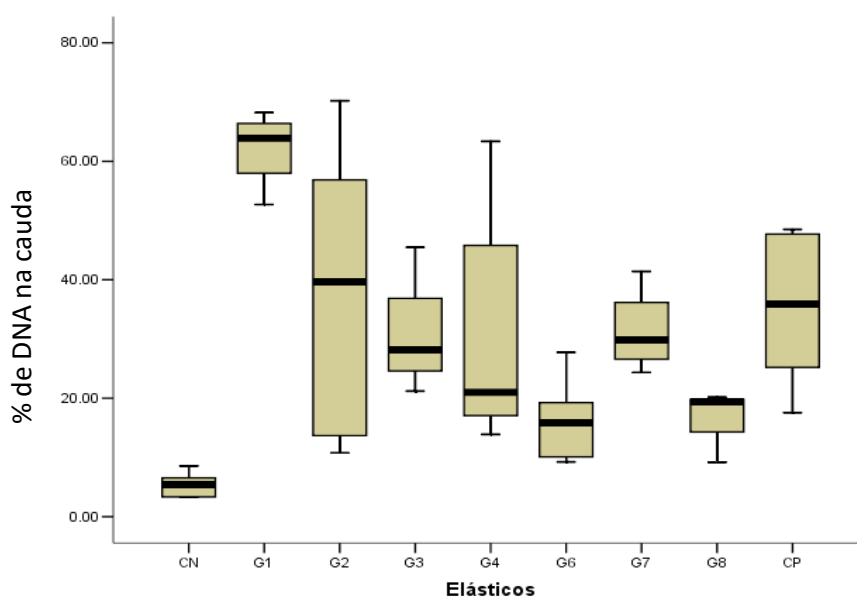


Gráfico 1: Boxplots - Grupos de Elastômeros e proporção de danos ao DNA.

*Danos no DNA após exposição (24 h) das células L929 aos diferentes elastômeros. EMS – Controle Positivo (CP). CN (Controle negativo). Os dados são representados como diagramas de caixas (boxplots). As caixas se estendem do quartil 25% (linha inferior) ao quartil 75% (linha superior). A mediana é representada pela linha sólida que corta a caixa horizontalmente. As linhas verticais em direção ao centro da caixa representam os valores máximos e mínimos*

## DISCUSSÃO

De acordo com os resultados da Tabela 2 todos os elastômeros testados, com e sem látex de todas as marcas, mostraram-se genotóxicos, destacando-se os grupos G5 (Morelli®) e G9 (3M Unitek ®) ambos com látex, que foram ao extremo, não sendo possível quantificar o tamanho do cometa. Para Marins et al. (2012), esse achado não é incomum e explicaram que isso ocorre devido ao alto percentual citotóxico do material durante a cultura de células, superando os

30%, o que inviabiliza a realização do teste cometa. Resultados similares foram encontrados em estudos anteriores como o de Santos et al. (2010) que comprovaram a citotoxicidade dos elastômeros da marca Morelli® para as células avaliadas, utilizando, entretanto, testes de viabilidade celular.

Dos nove grupos de elastômeros analisados, seis apresentavam látex na sua composição, os quais mostraram alto percentual de dano ao DNA, com diferença estatisticamente significativa apenas entre G1 (American Orthodontics®) com 62.2% e G8(GAC®) com 16.2%. Tal diferença pode estar associada às diferentes composições e/ou processo de fabricação.

Levando em consideração a presença ou não de látex, pôde-se observar que entre os elastômeros da mesma marca, não houve diferença estatisticamente significativa, sendo esta detectada apenas entre os grupos com látex G1 (American Orthodontics®) e sem látex G6 (Morelli®).

Tais achados trazem uma nova perspectiva de etiologia para as reações até então associadas possivelmente ao látex presente nesses materiais, e para a compreensão da alergia é de extrema importância a análise do processo de produção dos elastômeros, que envolve a coleta, centrifugação, coagulação, vulcanização e aplicação do pó que cobre os mesmos (Warshaw 1998).<sup>17</sup> Os diferentes processos de fabricação desses elastômeros podem ser a explicação para essa diferença na genotoxicidade, uma vez que em geral podem ser adicionados estabilizadores visando melhorar suas propriedades mecânicas como o zinco, íon considerado neurotóxico; antioxidantes e antiozonizantes (Martins et al. 2006).<sup>18</sup>

Outro dado que ratifica que as diferenças de genotoxicidade não somente estão associadas ao látex é que os grupos G6 e G8 tiveram comportamento similar, apresentando os menores valores de genotoxicidade, com percentuais de DNA na cauda de 16,3% e 16,2% respectivamente, apesar de G6 não conter látex.

Em seus estudos sobre a citotoxicidade dos mesmos elastômeros mencionados na Tabela 1, Trevisan (2014)<sup>19</sup> constatou que nas primeiras 24h, a maioria das marcas que apresentavam látex em sua composição, TP®, Morelli®,



3M®, GAC® e American Orthodontics®, mostraram baixas médias de viabilidade celular, e conseqüentemente maior toxicidade celular, tendo inclusive valores inferiores ao controle positivo (C+), diferente da marca RMO®, a qual teve seu resultado semelhante ao controle negativo (C-), apresentando o maior valor de viabilidade celular. Esses resultados corroboram com a hipótese de que existem diferenças no processo de produção<sup>5</sup> ou composição básica dos elastômeros, especialmente para a marca RMO®, assim como na liberação dos componentes utilizados.

Outro fator que pode contribuir para diferença na genotoxicidade é a presença de corantes nos elastômeros, conforme estudo de Holmes et al. (1993)<sup>20</sup>, que testou elastômeros de várias cores, e verificou que houve mais lise celular nas primeiras 24 horas em elastômeros coloridos, porém sem diferença significativa. Isso poderia explicar, por exemplo, a similaridade da genotoxicidade entre os grupos G3 e G4, da marca RMO®, que apesar de serem com e sem látex, respectivamente, mostraram valores de 30,7% e 30,6% de DNA na cauda. Como o G4 foi o único elastômero sem látex colorido de todos os grupos do estudo, sua maior toxicidade pode estar associada, a despeito de não apresentar látex, ao corante presente na sua composição. Da mesma forma, Trevisan (2014)<sup>19</sup> obteve resultados idênticos dessa marca em seus estudos sobre citotoxicidade. Contrapondo essa linha, no estudo realizado por Santos et al. (2009)<sup>2</sup>, onde foi avaliada a viabilidade celular em elastômeros de várias cores, constatou-se que a pigmentação não interfere na maior ou menor lise celular.

Um detalhe importante a ser analisado, é a presença de valores altos no desvio padrão dos diferentes grupos avaliados (Tabela 2, Gráfico 1), demonstrando a grande variabilidade dos dados, e em comum com diversos estudos sobre a genotoxicidade citados na literatura, a exemplo: Angieleri et al 2011, Zhilong et al 2011, Haffez et al 2011, Angieleri et al 2012, Gonçalves et al 2014. Teoricamente, não existem explicações plausíveis para tais achados, entretanto, partindo do princípio de que o ensaio cometa exige a leitura de um número relativamente grande de cometas, em média 50, para a análise em microscopia óptica, e que, para evitar a análise repetida de um mesmo cometa o processo de seleção das imagens compreenda um rastreamento completo das lâminas do topo a base (Brianezi et al (2009), isso permitiria a inserção de

leituras em valores mínimos e máximos. Acrescenta-se que, segundo Burlinson et al. (2007), em doses citotóxicas, um decréscimo na migração de DNA pode ser detectado, devido à perda de células danificadas ou mortas durante o processamento da amostra e /ou eletroforese.

Por fim, faz-se perceptível que os resultados aqui descritos corroboram com a ideia de que apesar de ser o látex um alérgeno comprovado, não é somente ele o agente causador de efeitos adversos. Novas pesquisas precisam ser realizadas com o aval das empresas fabricantes no sentido de disponibilizar as composições dos elastômeros, buscando elucidar a real etiologia dos efeitos tóxicos determinados por esses produtos.

## **CONCLUSÕES**

Todos os grupos, independentes da presença do látex, das diferentes marcas mostraram-se genotóxicos.

Para os grupos com látex, pode-se considerar mais genotóxicos em ordem crescente os grupos: American Orthodontics®, TP Orthodontic®, RMO®, GAC®, Morelli® / 3M Unitek ®. Já para os sem látex, American Orthodontics®, RMO® e Morelli®.

## **REFERÊNCIAS**

1. Angelieri F, Marcondes JPC, Almeida DC, Salvadori DMF, Ribeiro D. Genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic brackets in vitro. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop* 2011;139(4):504–9.
2. Angelieri F, Joias RP, Bresciani E, Noguti J, Ribeiro DA. Orthodontic cements induce genotoxicity and cytotoxicity in mammalian cells in vitro. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012 Jul-Aug; 9(4): 393–398.(b)
3. Brianezi G, Camargo JLV, Miot HA. Development and validation of a quantitative image analysis method to evaluate comet assay (silver staining). *J Bras Patol Med Lab*. 2009; 45(4):325-334.
4. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research*. 2007; 627:31–35.

5. Gonçalves TS, Menezes LM, Trindade C, Machado MS, Thomas P, Fenech M, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without silver soldered joints. *Mutation Research*.2014; 762:1–8.
6. Hafez HS, Selim EMN, Eid FHK, 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.
7. Hain MA, Longman LP, Field EA, Harrison JE. Natural rubber latex allergy: implications for the orthodontist. *Journal of Orthodontics*. 2007; 34:6–11.
8. Hanson M, Lobner D. In vitro neuronal cytotoxicity of latex and nonlatex orthodontic elastics. *Am. J. Orthod. Dentofac Orthop*.2004; 126(1):65–70.
9. Henriques JFC, Hayasaki SM, Henriques RP. Elásticos Ortodônticos: como Seleccioná- los e Utilizá-los de Maneira Eficaz Orthodontic Elastics : how to Select them to Obtain the. *J Bras Ortodon Ortop Facial*. 2003;8(48):471–5.
10. Holmes J, Barker MK, Walley EK, Tuncay OC. Cytotoxicity of orthodontic elastics. *AM J Orthod Dentofac Orthop*. 1993; 104:188-91
11. Leão Filho JCB, Gallo DB, Santana RM, Guariza-Filho O, Camargo ES, Tanaka OM. Influence of different beverages on the force degradation of intermaxillary elastics: an in vitro study. *J. Appl. Oral Sci*. 2013;21(2):145–9.
12. Loriato LB, Machado AW, Pacheco W. Considerações clínicas e biomecânicas de elásticos em Ortodontia. *R Clin Ortodon Dent. Press*. 2006; 5(1):44–57
13. Marins JSR, Sassone LM, Fidel SR, Ribeiro DA. In Vitro Genotoxicity and Cytotoxicity in Murine Fibroblasts Exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and Citric Acid. *Braz Dent J*. 2012; 23(5): 527-533.
14. Martins MM, Mendes AM, Almeida MAO, Goldner MTA, Ramos VF, Guimarães SS. Estudo comparativo entre as diferentes cores de ligaduras elásticas. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*. 2006; 11(4):81-90.
15. Menezes LM, Campos LC, Quintão CC, Bolognese AM. Hypersensitivity to metals in orthodontics. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop*. 2004;126(1):58–64.

16. Menezes LM, Freitas MPM, Gonçalves TS. Biocompatibilidade dos materiais em ortodontia: mito ou realidade? R Dental Press Ortodon Ortop Facial. 2009;14(2):144-57.
17. Palosuo T, Alenius H, Turjanmaa K. Quantitation of latex allergens. Methods. 2002; 27:52–58.
18. Pithon MM, Santos RL, Ruellas ACO, Sant' Anna EF, Romanos MTV, Silva-Mendes G. Avaliação in vitro da citotoxicidade de elásticos ortodônticos intermaxilares. Rev. odonto ciênc. 2008; 23(3):287-290.
19. Pithon MM, Santos RLD, Martins FO, Romanos MTV, Araújo MT. Cytotoxicity of orthodontic elastic chain bands after sterilization by different methods. Orthodontic waves. 2010; 69:151–155.
20. Santos RL, Pithon MM, Silva Mendes G, Romanos MTV, De Oliveira Ruellas AC. Cytotoxicity of intermaxillary orthodontic elastics of different colors: an in vitro study. J. Appl. Oral Sci. 2009;17(4):326–9.
21. Santos RL Dos, Pithon MM, Martins FO, Romanos MTV, Ruellas ACDO. Cytotoxicity of latex and non-latex orthodontic elastomeric ligatures on L929 mouse fibroblasts. Braz. Dent. J 2010; 21(3):205–10.
22. Trevisan MF. Citotoxicidade dos elastômeros utilizados em ortodontia: estudo in vitro sobre viabilidade celular. Canoas (RS). Dissertação [Mestrado em Odontologia com ênfase em Ortodontia]. Universidade Luterana do Brasil, 2014
23. Warshaw EM. Latex allergy. Journal of the American Academy of Dermatology. 1998 July; 39 (1): 3-19.
24. Westphalen G, Menezes L, Prá D, Garcia GG, Schmitt VM, Henriques JAP, et al. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. Genet. Mol. Researh. 2008; 7(4):1259–66.
25. Wong A K. Orthodontic elastic materials. Angle Orthod. 1976; 46(2):196-205.
26. Zhihong C, Yezhen L, Zhiyuan G, Zhongqiao Y, Xiaoxue L, Yifeng R, et al. Comparison of the cytogenotoxicity induced by five different dental alloys using four in vitro assays. Dental Materials Journal. 2011; 30(6): 861–868.