

Pruebas de biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico: Revisión de la literatura.

Tests of biocompatibility for dental materials. Review of the literature

Ángela M. VILLEGAS¹, Everaldo NARANJO¹, Diana M. GÓMEZ¹

1. Odontólogo, Residentes Biomateriales, Operatoria, y Estética Facultad de Odontología, Universidad Santiago de Cali.

RESUMEN

El propósito de este artículo es realizar una revisión de la literatura acerca de las diferentes técnicas de investigación para evaluar la biocompatibilidad de los materiales dentales. Para ello, se realizó una búsqueda entre los principales investigadores de esta área para definir los métodos de investigación aplicados a los materiales dentales. Los pasos descritos para cada prueba se han encontrado aplicados en la literatura para evaluar la biocompatibilidad de diversos materiales que están siendo utilizados en la práctica odontológica. Al finalizar esta revisión se pudo concluir que el cumplimiento de los protocolos de investigación y los resultados sobre biocompatibilidad obtenidos de estos estudios brindan la confianza para la utilización de los diversos materiales en odontología.

Palabras Claves: Materiales dentales, biocompatibilidad, citotoxicidad, pulpa dental.

SUMMARY

The purpose of this article is to present a review of different investigation approaches to evaluate the biocompatibility of dental materials. A search was conducted among the investigators in this field in order to

define the test methods applied to evaluate dental materials. The described stages for each test are found in the literature used to evaluate the biocompatibility of different materials used in dental practice. At the end of this review it can be concluded that compliance with research protocols and results obtained on biocompatibility of these studies provide confidence for the use of various dental materials.

Key words: Dental materials, biocompatibility, cytotoxicity, dental pulp.

INTRODUCCIÓN

En la presente revisión de la literatura se hace una descripción general de las diferentes técnicas y procedimientos de la investigación clínica que pretenden determinar la capacidad que tiene un material de uso odontológico para provocar una respuesta biológica favorable o desfavorable como las pruebas de uso, específicamente Test del tejido subcutáneo en ratas).

En ese orden de ideas, se define biomaterial como aquel elemento, ordinariamente químico pero ocasionalmente de otra naturaleza, que se integra de forma armónica con los tejidos naturales del organismo sin causarles daño alguno y sin que el cuerpo humano lo rechacen, de tal manera que se establece un equilibrio de compatibilidad biológica entre ambos (1).

Por otro lado, dentro del contexto de la biocompatibilidad, existe otro término relacionado como lo es toxicidad, el cual se entiende como el potencial relacionado con

la dosis de un material que causa la muerte celular o tisular (1,2). Es así como durante el ejercicio clínico de la odontología, se han cometido errores ante la escasa evidencia científica, producto de la falta de investigación sobre la bio-compatibilidad de los materiales de uso odontológico antes de que sean empleados de manera clínica, toda vez que, para muchos autores, la ausencia de dolor y la falta de alteraciones periapicales detectadas a través de exámenes radiográficos, han sido parámetros suficientes para definir la compatibilidad biológica de un material determinado (3).

Dado que uno de los principales objetivos de la odontología restauradora y de la endodoncia es devolver la funcionalidad y la estética pérdidas por los dientes, además de proteger el remanente dentario, es conservar el estado vital de los mismos, de donde esto último resulta que debe ser el objetivo principal de cualquier tratamiento, pero esto sólo se logra con el empleo de materiales de uso odontológico que sean biocompatibles (4).

Es por ello, que el propósito de esta revisión es describir los diferentes procedimientos, métodos y técnicas de investigación de la biocompatibilidad de los materiales de uso odontológico, de acuerdo con los protocolos descritos en la literatura y con la normatividad universal regida por la ANSI/ADA (Instituto Estadounidense de estándares de la Asociación Dental Norteamericana), las normas del ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas) y las normas ISO (Organización Internacional para la Estandarización).

Recibido para publicación: Octubre 14 de 2008
Aceptado para publicación: Diciembre 1 de 2008
Correspondencia:
A. Villegas, Universidad Santiago de Cali.
(e-mail: angelavillegas@msn.com)

CLASIFICACIÓN DE LOS BIOMATERIALES

De acuerdo al grado de contacto que tiene el material de uso odontológico con el organismo, su alteración en el tejido será directa o indirecta, lo que permite clasificarlos en (1):

Tipo 1:

Materiales que pueden entrar en contacto con otras cavidades del cuerpo que no sean la cavidad bucal.

Tipo 2:

Materiales que entran en contacto con las mucosas de la cavidad oral.

Tipo 3:

Materiales que afectan la pulpa dental o los tejidos adyacentes.

Tipo 4:

Materiales para la obturación de conductos radiculares.

Tipo 5:

Materiales que pueden afectar el tejido duro del diente.

RESPUESTA BIOLÓGICA

Los efectos adversos de los materiales de uso odontológico van desde la toxicidad leve, hasta la inflamación, la alergia y la mutabilidad. Un material puede tener como variables que influyen en su potencial citotóxico el tiempo de exposición en boca, las fuerzas aplicadas sobre el material para obtener la respuesta biológica esperada, las fuerzas de fatiga a corto, mediano y largo plazo (5). No obstante, la respuesta biológica del diente en su medio ambiente depende también de factores como la anatomía dental, la unión periodontal y la zona periapical, ya que todos representan ubicaciones de la interfase entre los materiales

empleados en un tratamiento odontológico específico y los tejidos dentales blandos y duros (6). Además, todos los tejidos dentales son permeables a algunas sustancias (por ejemplo el esmalte es permeable a los peróxidos de los agentes aclaradores), que en condiciones de normalidad no suelen absorber los componentes de los materiales, las bacterias o los productos bacterianos (7).

Para saber si un material es biocompatible o no, se debe seguir una secuencia de pruebas que van desde las *In vitro*, pruebas de uso en animales y finalmente pruebas de uso en humanos (8).

PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Históricamente, el avance técnico y científico de la odontología clínica; viene auspiciando el empleo de nuevos materiales que surgen día a día en concordancia con nuevas técnicas y procedimientos terapéuticos y, si antes eran simplemente evaluados en humanos para observar si eran biocompatibles, desde hace algún tiempo, los nuevos materiales debe ser sometidos a una serie de pruebas antes de que puedan justificar su empleo inocuo en los seres humanos (1,2) (Tabla 1).

Las pruebas de biocompatibilidad se han identificado como pruebas iniciales o primarias las cuales incluyen las pruebas de citotoxicidad (evaluación del efecto de

los materiales sobre poblaciones celulares para evaluar la respuesta inflamatoria o inmunológica) y las de mutagenicidad o carcinogénesis (valoran los efectos de los materiales sobre el material genético celular); pruebas intermedias o secundarias las cuales permiten medir los niveles de reacciones inflamatorias o de respuestas inmunitarias frente a un material (pruebas de irritación de mucosas, sensibilidad cutánea e implantación); y las pruebas de uso o terciarias las cuales se realizan en animales y humanos una vez se hayan realizado las pruebas primarias, las pruebas secundarias y la aprobación de un comité de ética certificado (2).

Pruebas *In vitro*

Las pruebas *In vitro* se realizan con el material o un extracto de este que se pone en contacto (exposición) con algún sistema biológico; en este caso, dientes sanos obtenidos por razones terapéuticas como las que se aplican en ortodoncia (3).

Para este fin, se emplean tubos de ensayo, placas de cultivo celular, muflas u otros recipientes, a través de medios biológicos específicos como células de mamíferos, organelas celulares, tejidos, bacterias o algún tipo de enzima que se ponen en contacto inmediato con la corona del o de los dientes cuyas raíces se protegen para que no entren en contacto con el material cuya capacidad de penetración se desea verificar. Además, la exposición se puede hacer por

Tabla 1. Pruebas de compatibilidad biológica de materiales de uso odontológico

| <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> | Pruebas de uso |
|--|--------------------------|----------------|
| 1. Citotoxicidad: - Crecimiento celular - Permeabilidad de la membrana celular - Biosíntesis enzimática - Pruebas indirectas (barreras) - Pruebas de barrera dentinal | 1. Irritación de mucosas | 1. En animales |
| 2. Carcinogénesis | 2. Sensibilidad cutánea | 2. En humanos |
| 3. Mutagénesis | 3. Implantación | |

contacto directo o indirecto (en esta ultimo caso se utiliza Agar, filtro de membrana o dentina).

En las pruebas *In vitro* se puede determinar la muerte o el crecimiento celular, la función celular y, en algunos casos, se puede evaluar la integridad del material genético de la célula (1,9).

Los ensayos *In vitro* resultan muy útiles para la evaluación de los efectos biológicos de los biomateriales y tienen como ventajas que no requieren el uso de animales de experimentación, la rapidez con que se realizan los estudios y su relación costo-efectividad. Sin embargo, las respuestas *in vitro* no siempre son indicadoras de reacciones *in vivo* ya que las condiciones que pueden reproducirse *in vitro* son sólo una parte de las que pueden presentarse *In vivo* (10).

Pruebas *In vivo*

Los animales de mayor uso por su similitud con el organismo humano en cuanto a respuesta de tejidos son los ratones, las ratas, los hámsteres, los hurones y los conejos. También se han utilizado ovejas, monos, bovinos, cerdos, perros y gatos (1).

Las pruebas en animales se pueden subdividir en grupos, como de toxicidad sistémica a largo y corto plazo, de exposición a membranas intactas o dañadas y de sensibilización inmune o respuesta ósea. También hay pruebas que incluyen mutagenicidad, carcinogenicidad y otras situaciones. No obstante, el test más utilizado es el del tejido subcutáneo en ratas, el cual se emplea con frecuencia para evaluar materiales dentales de uso en la terapia pulpar o la obturación radicular (1).

Test del tejido subcutáneo en ratas

Los especímenes utilizados en esta prueba deben ser machos o hembras de 200 a 300 gramos de peso que tengan estandarizada su salud y su edad. El número de animales que se deben utilizar depende de la canti-

dad de materiales experimentales y de los controles que serán realizados para avalar el resultado positivo. Se recomienda por lo menos seis especímenes en cada grupo experimental durante dos periodos de evaluación. Un animal experimental puede ser anestesiado con diferentes anestésicos, pero la dosis dependerá del peso del animal (3) (Figura 1).

El procedimiento se inicia con la eliminación de pelos y con una incisión central de 8 milímetros a lo largo del eje axial

del cuerpo del ratón por 18 milímetros de profundidad realizada mediante una tijera de punta roma de tal forma que permita abrir el tejido subcutáneo de manera lateral para obtener dos ventanas quirúrgicas una a cada lado de la incisión sin que se produzca hemorragia (si hay sangrado durante el procedimiento el animal debe ser descartado). Además, se pueden realizar dos incisiones con cuatro bolsillos quirúrgicos para dos materiales, pero se debe tener cuidado de no mezclar los dos materiales en el mismo animal (3) (Figura 2).

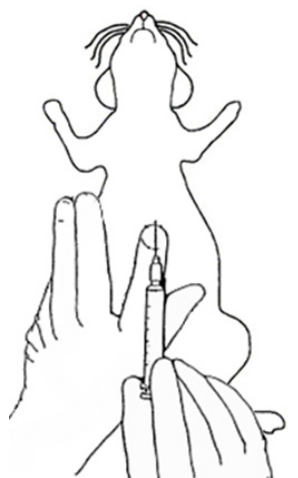


Figura 1. Procedimiento de anestesia.

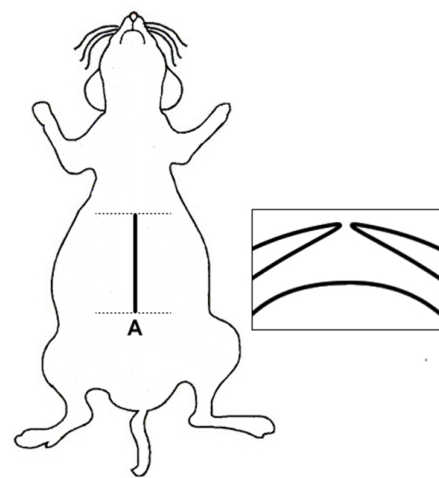


Figura 2. Incisión y ventanas quirúrgicas.

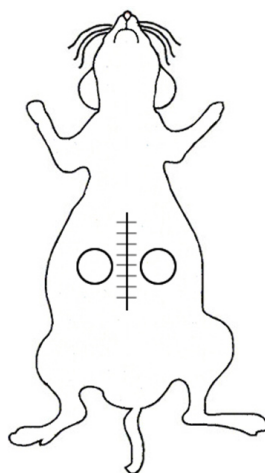


Figura 3. Suturas y disposición de los tubos de polietileno.



Figura 4. Biopsia de los tejidos afectados y de los tubos con el material de experimentación.

El material dental experimental, se debe empacar en tubos de polietileno de 5 milímetros de longitud por 1.3 milímetros de diámetro interno (lumen) del cual, uno de sus extremos queda expuesto al medio. Antes de colocar estos tubos en la ventana quirúrgica preparada, se deben mantener en alcohol al 70% por seis horas y luego se introducen en un autoclave a 110°C por 30 minutos (3).

Los materiales que se van a experimentar, ya en estado semilíquido y fluido, se introducen en los tubos mediante el empleo de jeringas de insulina esterilizadas, pero se debe poner atención en no permitir que el material que se va a probar sobrepase. Los materiales de consistencia pastosa, como cementos resinosos de auto o foto polimerización pueden ser introducidos en los tubos con ayuda de espátulas o condensadores con dimensiones algo menores que la boca de tubo de polietileno que se colocará en el animal. Una vez preparados los tubos, estos se introducen en bolsillos quirúrgicos preparados en el animal por medio de una pinza curva y en un sentido paralelo a la incisión y con el extremo abierto en dirección cefálica de tal forma que el tubo no pueda ser tocado fácilmente durante los controles y quede en contacto con tejido conjuntivo del animal. Una vez posicionado de manera correcta el tubo se procede a suturar la incisión (3) (Figura 3).

De acuerdo a los reportes de la literatura, la evidencia demuestra que las reacciones del tejido conectivo al entrar en contacto con el material experimental ocurren en un período que fluctúa de 14 días (lapso corto) a 84 días (lapso largo), por ello, se ha sugerido que, durante la aplicación de este test, los periodos entre 7 y 30 días son adecuados para determinar de manera comparativa la evolución de la reacción frente a los materiales que se están evaluando. Sin embargo, en algunos casos se han requerido períodos más largos, de hasta 60 días, esto demuestra que cada material tiene un cuadro de comportamiento determinado, que consecuentemente los períodos experimentales recomendados son de 7, 15, 30 y

60 días. Finalizado el periodo experimental, los animales son anestesiados como se describió anteriormente y se realiza una incisión en el área del implante (tubo de polietileno con el material experimental) con suficiente margen de seguridad para que no se afecte o se remueva el tejido remanente que ha estado en contacto con el material. La biopsia del tejido que contiene el implante se obtiene mediante tricotomía de la misma forma como se describió con anterioridad. Después de la biopsia los animales son sacrificados con una sobredosis de anestesia (3) (Figura 4).

Una vez obtenida la biopsia, se elaboran discos de papel cartulina de tamaño comparable y sobre ellos se colocan pequeñas porciones del tejido animal para facilitar su fijación mediante el empleo de formol al 10% taponado. Después de 48 horas de fijación las muestras se incluyen en parafina y se realizan cortes histológicos de 5 a 7 micrómetros de espesor. Estos cortes, permitirán evaluar la respuesta de los tejidos presentes en la interfase entre el material experimental y el tejido conectivo del animal, de tal manera que se puede encontrar una cápsula fibrosa o no junto al extremo expuesto del tubo (3) (Figuras 5 y 6).

De esta forma, las reacciones pulpares que se pueden evaluar incluyen necrosis, reacción inflamatoria, amplitud de la reacción adyacente al extremo expuesto del tubo y presencia de macrófagos y células gigantes, eventos histológicos que son clasificados de acuerdo a las características observadas mediante microscopía óptica (3) (Figuras 7 y 8).

De acuerdo a este protocolo se han encontrado tres artículos que evidencian la citotoxicidad de algunos materiales utilizados actualmente en el consultorio odontológico donde han dado un resultado desfavorable durante los primeros días en estos estudios (3,12,13).

En estudios subcutáneos se ha encontrado que productos como los sistemas adhesivos, tienen un efecto citotóxico debido

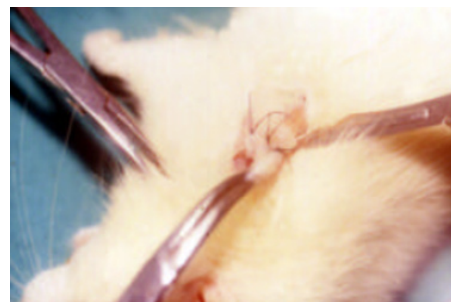


Figura 5. Biopsia. Modificado de J. P. Gutiérrez (11).



Figura 6. Tejidos afectados y tubo de polietileno. Modificado de J. P. Gutiérrez (11).

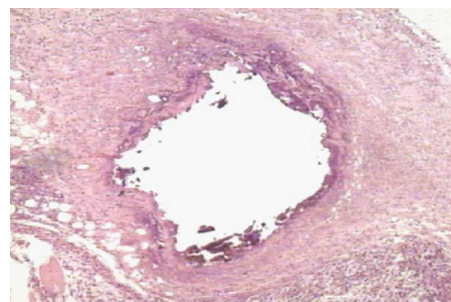


Figura 7. Tejido afectado y lumen del tubo de polietileno. Modificado de J. P. Gutiérrez (11).

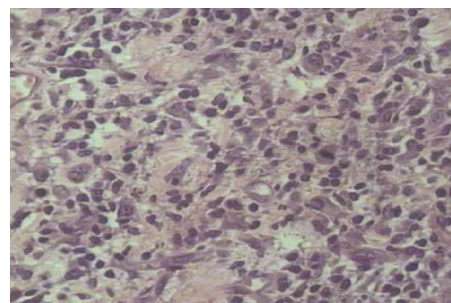


Figura 8. Células inflamatorias del tejido afectado. Modificado de J. P. Gutiérrez (11).

a la presencia de sustancias como Bis GMA, TEGDMA, HEMA, glutaraldehído y UDMA, de tal forma que se observa un intenso efecto citotóxico inicial del agente adhesivo, lo que permite determinar áreas de necrosis de contacto (14). No obstante, otros estudios prueban que los sistemas adhesivos promueven inicialmente una intensa reacción inflamatoria, la cual disminuye con el tiempo, mientras que el hidróxido de Calcio desarrolla un tejido conectivo saludable más biocompatible a los 30 días. Es así como la implantación de materiales dentro del tejido conectivo de ratas es considerado un test secundario para evaluar biocompatibilidad de materiales restauradores y de endodoncia. Con posterioridad a los resultados obtenidos, se debe proceder de manera consecuente con estudios *In vivo* en base en la respuesta pulpar de estos materiales evaluados (3).

Pruebas de uso

Estas pruebas son realizadas en animales y en seres humanos. En estos últimos, dichos estudios se denominan “ensayos clínicos” y son los que proporcionan mayor y real evidencia científica. Las desventajas de estos son su complejidad (dificultad en términos de control experimental e interpretación, sometimiento al comité de ética y marco legal) además que son mucho más costosos (1).

Por lo general, las pruebas de mayor empleo para evaluar los materiales dentales en humanos se realizan en cavidades clase V preparadas por vestibular o por oclusal en premolares que van a ser extraídos por motivos ortodónticos o periodontales y cuyos criterios de inclusión implican estar sanos, sin restauraciones, sin caries y sin lesiones no cariosas (abrasiones, abfracciones o erosiones). Una vez biselada la cavidad preparada, de inmediato, el material experimental se coloca en la parte más profunda de la preparación y se procede a obturarla con un material temporal tipo cemento de óxido de fosfato. A los dientes premolares que cumplan con dichos criterios, después de que reciban la obturación experimental

convenientemente aislada, con una frecuencia operacional predeterminada y de forma cíclica, con controles periódicos que incluyan radiografías periapicales se les debe realizar, un test de sensibilidad para determinar el estado pulpar y de los dientes. Se debe tener en cuenta que para cumplir con las condiciones de protección pulpar en los dientes seleccionados se deben realizar cavidades preparadas de forma estandarizada, con suficiente irrigación y con movimientos intermitentes para no generar otro tipo de reacción pulpar diferente a la que el propio material experimental pueda ocasionar. En estas pruebas, las fresas se deben usar como máximo para cuatro cavidades (3).

Cumplido el período de observación de las reacciones pulpares por el empleo del material en el que desea determinar la citotoxicidad, se procede a realizar la extracción de los dientes sin uso de fórceps, es decir, con una técnica atraumática. Posteriormente se realizan los cortes que van a ser observados para analizar la respuesta de la pulpa (eventos histológicos y patológicos) ante el agente que se evalúa según los siguientes eventos: A) Remanente de dentina entre piso de cavidad y pulpa; B) Organización del tejido pulpar adyacente a la reparación cavitaria; C) Respuesta inflamatoria; D) Depósito de Dentina Terciaria o reparadora asociada a la cavidad; y E) Presencia de bacterias (3).

Estos eventos deben ser medidos con la ayuda de un microscopio óptico adaptado a un computador el cual debe tener un software para generar medidas lineales que permitan tener en cuenta los siguientes parámetros (3):

- A. La organización del tejido pulpar debe ser medida de la siguiente manera:
 1. Tejido Normal.
 2. Desorganización de la capa odontoblástica.
 3. Con tejido pulpar adyacente sano.
 4. Tejido pulpar completamente desorganizado.
 5. Necrosis pulpar.

B. La respuesta inflamatoria es medida así:

1. Ninguna o pocas células inflamatorias adyacentes al piso cavitario.
2. Discreto Infiltrado Inflamatorio con PLMN o células de predominio mono nuclear.
3. Moderado infiltrado inflamatorio en pulpa coronaria.
4. Infiltrado Inflamatorio envolviendo tejido pulpar o caracterizando un absceso.

C. El depósito de dentina terciaria debe ser determinado por características histológicas del tejido dentinario sintetizado por odontoblastos o células odontoblásticas recién diferenciadas. Se clasifica de acuerdo al espesor en:

1. Discreta.
2. Moderada.
3. Intensa.

D. presencia de Bacterias clasificada de acuerdo a la localización o no en la cavidad:

- 0. Ausente.
 1. Presente en paredes laterales.
 2. Presente en paredes laterales y en piso.
 3. Presente en paredes laterales, piso y túbulos dentinales.

Según estas pruebas de uso en humanos, algunos autores han demostrado que la cantidad de dentina remanente es muy importante para la respuesta inflamatoria pulpar presente o ausente y que al evaluarla en el tiempo (a los 15 y 30 días), el organismo logra resolverla o no, lo cual permite que en algunos casos la pulpa vuelva a su estado normal (15); tal como ocurre con los ionómeros de vidrio empleados como liners en cavidades profundas, los cuales inician a los 7 días de ser colocados una respuesta inflamatoria moderada que con el transcurrir del tiempo (30 días) se resuelve, de tal forma que la pulpa recobra su estado de salud anterior (16,17).

Caso contrario al de los sistemas adhesivos, que al entrar en contacto con la

pulpa generan una respuesta inflamatoria irreversible (15).

Todos los procedimientos y materiales involucrados en el tratamiento endodóntico (principalmente los cementos de obturación más comunes: de óxido de zinc-eugenol, de hidróxido de calcio, de resinas epóxicas o de ionómeros de vidrio), producen reacciones inflamatorias transitorias sobre el ligamento periodontal (2).

La toxicidad de los materiales de uso en endodocia se evalúa igual que cualquier material de uso odontológico a través de tres pasos: investigación del material mediante ensayos de citotoxicidad *In vitro*; determinación de la citotoxicidad *In vivo* (implantación en el tejido subcutáneo o en el músculo y se evaluación de la reacción tisular local); y pruebas directas en animales y humanos (18).

Por lo general, los estudios se han centrado en pruebas *In vivo* con implantes en animales o en dientes de animales a los que se les realiza tratamiento endodóntico para evaluar su efecto sobre dichos tejidos. *In vitro*, se han realizado pruebas de citotoxicidad sobre cultivos celulares; sin embargo, ninguno de estos métodos puede ofrecer resultados totalmente confiables, debido a que las condiciones y respuestas reales del tejido periapical humano, no pueden ser reproducidas fácilmente (19).

El protocolo para evaluar los materiales de uso endodóntico incluye:

A. Límite apical de la obturación:

1. Sub-obturada
2. A nivel
3. Pasada del ápice radicular.

B. Sellamiento biológico apical:

1. Presente (el sellamiento puede ser clasificado 1: completo o 2: parcial)
2. Ausente.

C. Respuesta inflamatoria:

1. Ninguna: Con pocas células inflamatorias adyacentes al foramen apical.
2. Discreta cantidad de células inflama-

torias agudas o crónicas adyacentes al foramen apical.

3. Moderado cantidad de células inflamatorias.

4. Intensa respuesta inflamatoria asociada o no a absceso con desarrollo en lesión periapical.

D. Espesura del ligamento periodontal:

Por medio microscopio óptico acoplado a computador con analizador de imágenes para medidas de área:

1. Normal
2. Discreto espesamiento
3. Moderado
4. Severo espesamiento.

E. Reabsorción de tejidos mineralizados de región periapical (dentina, cemento y hueso alveolar):

1. Presente (puede ser clasificado 1: discreta, 2: moderada y 3: intensa).
2. Ausente.

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados que se pueden obtener con las diferentes pruebas, varios autores han establecido de forma gráfica, la manera como estas verificaciones experimentales se pueden correlacionar entre sí, de tal manera que el estudio sobre la compatibilidad biológica de un material de uso odontológico se debe medir en relación con niveles de evaluación referidos a una gráfica de forma piramidal. El paso exitoso y subsecuente por cada nivel (cada prueba) permitirá demostrar que tan biocompatible es el material experimental (14) (Figura 9).

Los nuevos avances tecnológicos han permitido desarrollar pruebas mucho más confiables que consideran la biocompatibilidad como un proceso continuo que evoluciona con la experiencia clínica en el cual, el esquema piramidal, pone en evidencia que las pruebas primarias y secundarias juegan un papel importante aunque a menor escala trascendencia conforme progresan los distintos niveles, toda vez que se re-

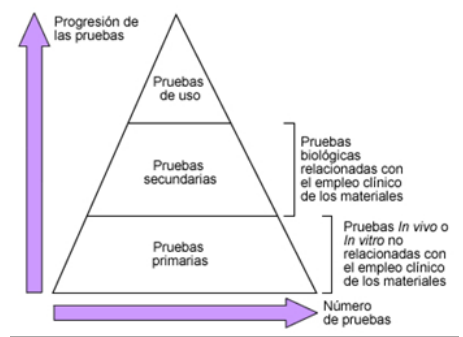


Figura 9. En este esquema el número de pruebas disminuye con la progresión de los distintos niveles: los materiales no aceptables son eliminados desde las primeras pruebas. Modificado de Schmalz (14).

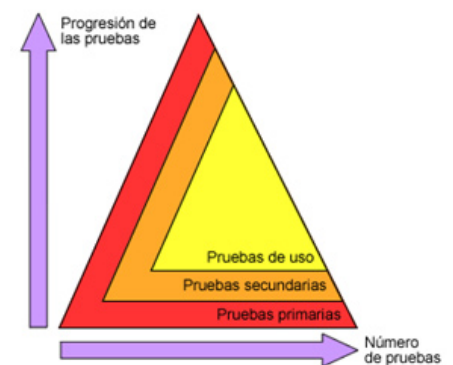


Figura 10. Nuevo esquema para las pruebas de biocompatibilidad, en donde se reconoce la necesidad de usar varios tipos de pruebas al tiempo y tratar la biocompatibilidad como un proceso continuo. Modificado de Schmalz (14).

conoce la necesidad de utilizar diferentes tipos de pruebas de manera simultánea (Figura 10).

CONCLUSIONES

En la investigación en el área de Biocompatibilidad existe una secuencia de pruebas que permiten concluir sobre el nivel y el grado de toxicidad de un determinado material que esté llegando al mercado de la odontología clínica. Son estos protocolos los que nos ayudan, en odontología restauradora, a determinar si el material utilizado es biológicamente compatible con el organismo humano. Los modelos actuales reflejan la complejidad de las pruebas de

biocompatibilidad de los materiales e involucran aspectos tanto de reglamentación como científicos cuyo objetivo principal es reducir los experimentos en animales, mejorar las pruebas *In vitro* (emulando al máximo las condiciones *In vivo*) de tal manera que se han optimizado el uso de barreras apropiadas en las pruebas, cultivos celulares y tejidos más convenientes, además del empleo y la determinación de marcadores clínicos y de laboratorio relevantes para medir los efectos biológicos inducidos por un material.

Por otro lado, las pruebas *In vivo* realizadas en animales no siempre pueden ser extrapoladas al ser humano por lo que se hace, no solamente necesario sino indispensable realizar todas las pruebas existentes y aún otras que se pueda idear para poder concluir si el material se puede emplear o no en los seres humanos

REFERENCIAS

- Anusavice K. Phillips, Ciencia de los materiales dentales, 11 edición, Madrid: Elsevier; 2004. p. 171-202.
- Ochoa C, Pulido E, Rueda K. Cementos en endodoncia. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2006. Descargado en Mayo de 2008. Disponible en URL: http://www.javeriana.edu.co/academiapgendodncia/i_a_revision39.html
- Costa CA, Hebling J, Teixeira MF. Estudio preliminar da compatibilidade biologica dos adesivos dentinarios all-bond 2 e scotchbond mp. Avalicao: avalicao histologica de implantes subcutaneos em ratos. Rev Odontol Univ São Paulo 1997; 11(1):11-18.
- Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. Journal of Prosthetic Dentistry. 2001; 86:203-209.
- Rojas W. Inmunología. 11 edición, Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 1995. P. 47-66.
- Davis W. Histología y embriología Bucal. Primera edición. México: Interamericana McGraw-Hill; 1998. p. 144-157.
- Teixeira HM. In vivo evaluation of the biocompatibility of three current bonding agents. Journal of oral Rehabilitation. 2006; 33(7):542-550.
- Lliana CD, Llamosas E, Morales R. Evaluación de la biocompatibilidad del cemento Portland implantado en tejido conectivo subepitelial de ratas. Revista de la Asociación Mexicana de Odontología 2003; 60(2):45-51.
- Kawahara H biological testing of dental materials by means of tissue culture. Int Dent J 1988; 18:443.
- Ríos M, Cepero J, Davidenko N, Krael R, González A, Pérez K, Bello JL. Evaluación toxicológica in vitro de materiales poliméricos de restauración dental compuestos por BIS-GMA. Anuario Toxicología 2001; 1(1):65-72.
- Gutiérrez JP. Estudio de la respuesta tisular a una asociación experimental versus cemento convencional (tesis de pregrado para optar por el título de odontólogo). Lima; Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002.
- Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Citotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. Journal of Dental Research 1991; 70:1450-1455.
- Costa CA, Hebling J, Teixeira MF, Batista-López A. Biocompatibility of two current adhesive resins. Journal of Endodontics 2000; 26(9):512-516.
- Correa JA. Biocompatibilidad: conceptos básicos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá; 2000.
- Costa CA, Batista-Lopes do Nascimento B, Mezzalira-Teixeira H. Response of human pulps following acid conditioning and application of a bonding agent in deep cavities. Dental Materials 2002; 18(7):543-551.
- Berrios EJ, Porto S de T. Respuesta pulpar frente a diferentes agentes cementales. Rev Estomatol Herediana 2004; 14(1-2):84-88.
- Aranha AM, Hebling J, Giro EM, Costa CA. In vitro and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements, Dental Materials 2006; 22(9):38-844.
- Estévez MC, Rojas PA, Rueda K. Microfiltración bacteriana, citotoxicidad y respuesta del periápice al MTA, al IRM, al super EBA y a la amalgama. Una revisión. Revista de la Federación Odontológica Colombiana 2002; 202. Descargado en Junio de 2008. Disponible en URL: <http://encolombia.com/odontologia/foc/foc64dic-microfiltracion.htm>
- Caviedes J, Muñoz HR, Rodríguez CE. Respuesta del tejido periapical a los cementos endodónticos a base de oxido de zinc y eugenol. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2006. Descargado en Mayo de 2008. Disponible en URL: http://www.javeriana.edu.co/academiapgendodncia/i_a_revision10.html