

Estudio *in vitro* de la actividad citotóxica de resinas dentales tipo BIS-GMA

RÍOS, M¹, CEPERO, J², KRAEL, R³, DAVIDENKO, N³, GONZÁLEZ, A²

¹Centro de Control Estatal de Equipos Médicos (CCEEM). Grupo de Evaluación Preclínica,

²Instituto de Oncología y Radiobiología (INOR). Departamento de Ensayos Preclínicos,

³Centro de Biomateriales. Universidad de La Habana.

Resumen

*Las resinas composites se emplean desde hace varias décadas en distintas aplicaciones estomatológicas, volviéndose indispensables para lograr una alta calidad en los servicios modernos. Uno de los monómeros acrílicos más utilizados en estos materiales poliméricos de recubrimiento es el 2-bis-[p-(2-hidroxi-3-metacriloxipropoxi)fenil] propano, conocido comúnmente como Bis-GMA. El conocimiento de las interacciones de estos materiales con el sistema biológico es de vital importancia debido al uso tan difundido de los mismos en la práctica clínica. El comportamiento de una célula viva en contacto con un material extraño es un problema esencial en las aplicaciones biomédicas de polímeros sintéticos. Los ensayos *in vitro* son sistemas muy útiles para la evaluación de los efectos biológicos de los biomateriales.*

*En el laboratorio de Inmunofarmacología del INOR se llevó a cabo la evaluación de la toxicidad de dos resinas dentales tipo Bis-GMA producidas por el Centro de Biomateriales de la Universidad de La Habana: el Obtudent Fotocurado (FC), resina fotopolimerizable para restauraciones dentales y el Cubridem Autocurado (AC), sellante dental para fosas y fisuras. Este estudio forma parte de las evaluaciones preclínicas biológicas de biomateriales y equipos médicos implantables que se lleva a cabo en Cuba a través de la Red Funcional de Implantología del Ministerio de Salud Pública. Se aplicó el método de citotoxicidad *in vitro* descrito por Stanley para la evaluación toxicológica de materiales dentales. Ambos composites resultaron citotóxicos para la línea de fibroblastos L929, lo que se corresponde con lo descrito en la literatura para este tipo de material. Su citotoxicidad se encontró en el rango de la de los análogos comerciales evaluados.*

Abstract

*Composite resins are being used in dental applications some decades ago and they have become indispensable for high quality modern services. The bis-phenol-A-diglycidylether dimethacrylate, commonly known as Bis-GMA, is one of the acrylic monomers more used in these filling polymeric materials. The knowledge of biological systems and dental materials interactions has a vital importance because of the spread use of these materials in clinical practice. The cell behavior in the strange material interface is an essential problem in the biomedical applications of synthetic polymers. *In vitro* assays are useful systems for the biological evaluation of biomaterials.*

*In the Immunopharmacology laboratory at Oncology Institute we evaluated the cytotoxicity of two Bis-GMA dental resins produced by the Havana University Center of Biomaterials: Obtudent FC, photocured resin for dental restorations and Cubridem AC, dental sealing for pits and fissures. This study is part of the preclinical biological evaluation of biomaterials and medical devices that take place in Cuba through the Health Ministry Functional Implantology Network. We applied the *in vitro* cytotoxicity test described by Stanley for a toxicological evaluation of dental materials. Both composites were cytotoxic in L929 fibroblast line, in accordance with the literature reports of this kind of materials. Their cytotoxicity was in the range of the commercial analogs evaluated.*

Palabras Claves: composite resins, polymeric materials, synthetic polymers, Bis-GMA dental resins, *in vitro* assays, biological evaluation, cytotoxicity.

Introducción

Los biomateriales son por definición aquellos materiales que asumen las funciones de los tejidos en los órganos naturales, siendo capaces de imitar en lo posible las propiedades del tejido en su ambiente biológico. Los biomateriales deben reunir los requisitos de factibilidad funcional, bioestabilidad, biocompatibilidad y esterilidad.^{1,2}

Hoy en día, es una práctica habitual en Odontología el empleo de recubrimientos poliméricos, tanto con fines preventivos (sellantes de fosas y fisuras, adhesivos, etc) y restaurativos (obturantes) como estéticos. En la mayor parte de estos materiales el proceso de polimerización (fraguado) se inicia a través de un mecanismo de radicales libres, producidos tanto por vía química (sistemas autocurados) como por la acción de la luz (sistemas fotocurados). La mayoría de los recubrimientos dentales fotopolimerizables, contienen una mezcla, cuidadosamente seleccionada, de monómeros acrílicos mono- y multi-funcionales, siendo uno de los más utilizados el 2-bis-[p-(2-hidroxi-3-metacriloxipropoxi) fenil] propano, conocido comúnmente como Bis-GMA, que fue desarrollado por Rafael Bowen en 1956. Estos materiales compuestos, composites, están generalmente constituidos por una matriz polimérica y un relleno inorgánico. El análisis de las resinas dentales y los materiales composites han demostrado que la mayoría de ellos contienen dimetacrilatos derivados del Bis-GMA.³⁻¹¹

A pesar del progreso en el desarrollo de nuevos materiales dentales poliméricos, han existido algunos problemas en su aplicación; entre ellos: degradación química, daños mecánicos del polímero en el ambiente de la mucosa oral y también problemas alérgicos y toxicológicos. Se han reportado reacciones alérgicas a las resinas de composites causadas por las moléculas de Bis-GMA; otras sustancias, como el metil metacrilato, presentan una toxicidad pulpar relativamente alta. Estos sistemas poliméricos se colocan en contacto con el tejido inmediatamente después de mezclados, por lo que uno o más de sus componentes pueden migrar al mismo, ocasionando respuestas locales irritantes, o tóxicas de origen sistémico.^{3, 4,12-19}

Correspondencia:

Centro de Control Estatal de Equipos Médicos (CCEEM). Grupo de Evaluación Preclínica. Calle 4 No. 455 e/ 19 y 21. Vedado. Plaza de la Revolución. CP 10 400. Ciudad de La Habana. Cuba. Tel. (537) 832 50 72 E-mail: mrios@infomed.sld.cu

La despolimerización es ampliamente reconocida como el mayor inconveniente de los materiales de restauración dental basados en resinas. La cantidad de productos migrables se relaciona indirectamente con el peso molecular y directamente con la difusibilidad de las moléculas del polímero. Los componentes citotóxicos son extraídos de las resinas en diferentes cantidades y a diferentes proporciones y la cantidad de productos tóxicos migrables puede ser afectada por el pH. Las sustancias que eluyen pueden inhibir el crecimiento celular, provocar cambios en el pH del medio y alterar varios procesos metabólicos, como el metabolismo lipídico. Algunos estudios realizados con resinas activadas por diferentes vías han demostrado un mayor efecto citotóxico para los eluatos recobrados a un menor tiempo de extracción.^{3,20-25}

El uso de resinas para restauraciones indirectas está difundiendo con rapidez y constituye una aplicación importante en la práctica clínica, por lo que es de vital importancia el conocimiento de las interacciones de estos materiales con el sistema biológico. El comportamiento de una célula viva en contacto con un material extraño es un problema esencial en las aplicaciones biomédicas de polímeros sintéticos. Los estudios toxicológicos constituyen una herramienta eficaz en estas investigaciones y sus resultados pueden servir de base para hacer predicciones y proyecciones razonables acerca de las condiciones en que el producto ofrece seguridad.^{1,3,26-30}

Los ensayos *in vitro* son sistemas 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 la relación costo/efectividad de los mismos. Los cultivos de células son modelos toxicológicos alternativos de gran sensibilidad, lo que es una ventaja importante para el tamizaje de toxicidad de rutina de los biomateriales, aunque no siempre las respuestas *in vitro* son indicadoras de reacciones *in vivo* ya que las condiciones que pueden reproducirse *in vitro* son solo una parte de las que pueden presentarse *in vivo*. Una de las principales atracciones del uso del cultivo de tejidos es la posibilidad de observar el comportamiento de tipos específicos de células vivas en un ambiente controlado.^{21,31-36}

La evaluación cuantitativa del daño celular se basa en la medición de la liberación de trazadores radioactivos por las células marcadas expuestas a un agente tóxico. Un sistema de ensayo recomendado en este tipo de estudio es la línea celular L-

929 de fibroblastos. Estas células están especializadas en el establecimiento y mantenimiento de la estructura de la matriz extracelular, en cuya función son muy importantes las interacciones célula-célula y célula-sustrato. Esta es una línea celular establecida, disponible y bien caracterizada, que ha demostrado resultados reproducibles en muchos laboratorios.³⁷

En el Laboratorio de Inmunofarmacología del INOR se llevó a cabo la evaluación de la toxicidad *in vitro* de dos resinas tipo Bis-GMA obtenidas en el Centro de Biomateriales de la Universidad de La Habana, el Obtudent FC y el Cubridem AC, como parte de la evaluación preclínica biológica de biomateriales y equipos médicos implantables que se lleva a cabo en Cuba a través de la Red Funcional de Implantología del MINSAP.

Materiales y Métodos

El Obtudent FC es una resina foto-polimerizable para restauraciones dentales y el Cubridem AC es un sellante dental autocurado para fosas y fisuras. En ambos materiales la matriz polimérica está constituida por Bis-GMA y dimetacrilato de tetraetilenglicol en diferentes proporciones, entre otros compuestos. El Obtudent FC presenta como relleno inorgánico cuarzo cubano del yacimiento del Cacahual, que constituye el componente sólido mayoritario (77 % del material). Para la evaluación toxicológica de estos materiales se aplicó el ensayo de citotoxicidad *in vitro* (contacto directo) en la línea de fibroblasto de ratón L929, descrito por Stanley.³⁸

Ensayo de citotoxicidad in vitro:

Las células L929 se subcultivaron en Medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, durante 3-5 días previos a la realización del ensayo. Luego se colectaron en tripsina al 0.25% en solución salina, se marcaron durante 24 h con 1.5 mCi ⁵¹Cr/10⁶ células y se ajustaron a una concentración final de 3 x 10⁵ células/mL; la viabilidad fue del 97%.

Los materiales se depositaron en placas de poliestireno estériles de 24 pozos por 10 réplicas. Se realizaron dos series de ensayos, cada una en dos placas de cultivo: en un caso las células se sembraron a los 30 min del mezclado inicial de los componentes del material (2.0 mL de la suspensión celular por pozo) y en el otro la siembra se realizó a las 24 horas de comenzada la polimerización. Se emplearon 2.0 mL de la suspensión celular como

control negativo y 2.0 mL de dicha suspensión más 0.2 mL de fenol al 6.4 % como control positivo, ambos por 5 réplicas.

Las placas se incubaron a 37°C, por 4 y 24 h respectivamente, en ambos casos y se evaluó la citotoxicidad de los materiales al cabo de cada tiempo de contacto con las células. Transcurrido el tiempo se extrajo 1.0 mL del medio sobrenadante de cada pozo en las placas correspondientes y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, separándose 0.5 mL del sobrenadante para el conteo de la radioactividad durante 10 min/tubo. Se calculó el % de liberación de ⁵¹Cr, empleando como valor de referencia de radioactividad total el promedio de los conteos de 4 muestras de 0.5 mL de la suspensión celular marcada. Para el análisis estadístico de los resultados se realizó una comparación múltiple de medias a través de la prueba de Duncan.

Resultados y Discusión

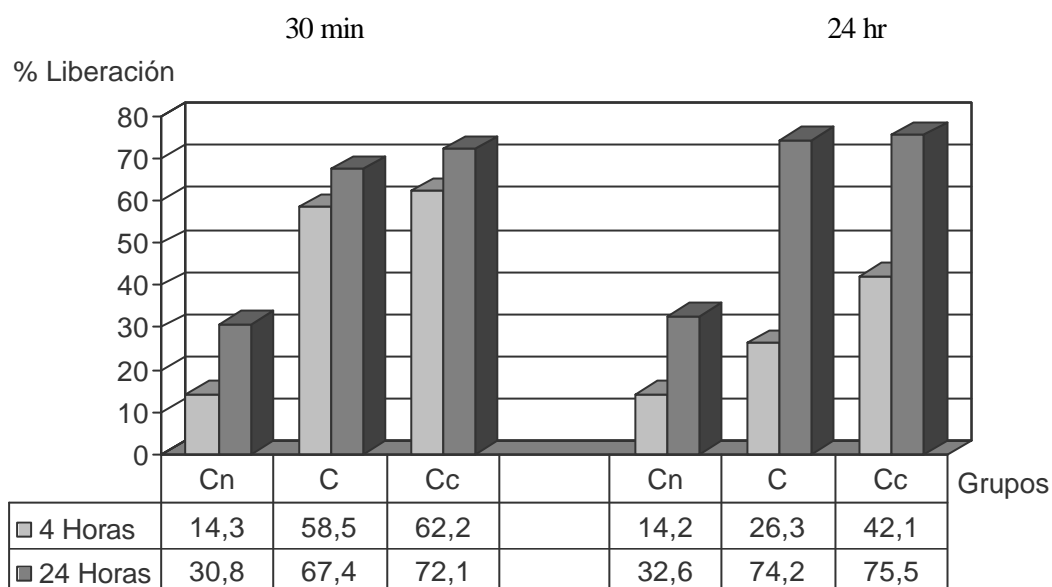
Los resultados obtenidos en la aplicación del ensayo de citotoxicidad *in vitro* con el Cubridem AC y un análogo comercial (Coltene brilliant margin bond) (Figura 1) indican que ambos son severamente citotóxicos, de acuerdo con la clasificación propuesta por Stanley, ya que los porcentajes de liberación de ⁵¹Cr exceden el doble del valor de la media del control negativo en los ensayos de 24 horas con el material fresco y endurecido. No existe diferencia entre la citotoxicidad del producto y la del control comercial.

Los resultados obtenidos con el Obtudent FC y un control comercial (Degufill LC) (Figura 2) muestran que ambos materiales también resultan severamente citotóxicos. En los ensayos de 4 y 24 h de exposición, tanto con el material fresco como endurecido, la liberación de ⁵¹Cr por las células excede el doble del valor de la media del control negativo, lo que también ocurre con el control comercial. Estos resultados concuerdan con reportes anteriores en la literatura que evidencian que resinas dentales basadas en Bis-GMA y dimetacrilatos de glicoles, como los casos de este estudio, manifiestan efectos tóxicos significativos sobre cultivos celulares, lo cual se atribuye a la migración de los monómeros u oligómeros residuales hacia el cultivo celular. El material migrable representa alrededor de un tercio del peso de la porción orgánica del compuesto.^{21,39}

Los componentes usuales de las resinas dentales han mostrado acción citotóxica aún en grandes

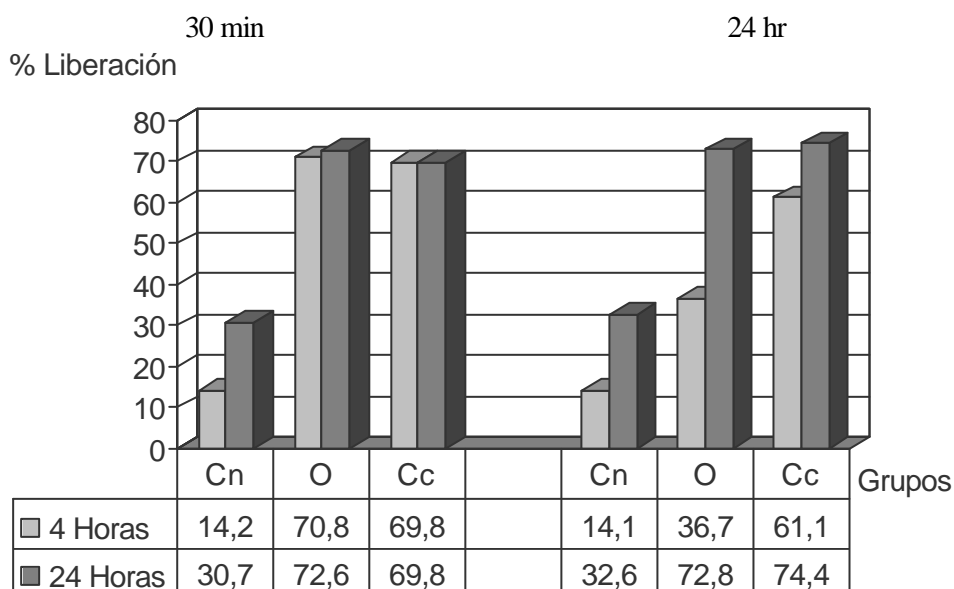
diluciones y se ha demostrado que la extracción previa del material con solventes adecuados provoca la reducción de su citotoxicidad casi en un 90%, en una razón directamente dependiente de la temperatura de extracción. Se ha evidenciado que la citotoxicidad de los materiales dentales constituidos por Bis-GMA es causada principalmente por este componente.^{21,40,41}

En los ensayos realizados con ambos materiales cubanos se obtuvo que el material endurecido era menos citotóxico que el polimerizado 30 minutos antes de la siembra, al cabo de 4 horas de exposición de las células. Este resultado se debe a que al aumentar el tiempo de polimerización del material, es menor la cantidad de sustancias migrables que se desprenden del mismo. El grado



Cn: Control negativo C: Cubridem AC Cc: Control comercial

Figura 1. Citotoxicidad *in vitro* del Cubridem AC con el material fresco (30 min) y endurecido (24h). Ensayo a las 4 y 24 horas de contacto.



Cn: Control negativo O: Obtudent FC Cc: Control comercial

Figura 2. Citotoxicidad *in vitro* del Obtudent FC con el material fresco (30 min) y endurecido (24h). Ensayo a las 4 y 24 horas de contacto.

de polimerización de los composites es cerca de un 25 % en la capa superficial y un 75% en el volumen.²¹ A las 24 horas de contacto no se obtuvieron diferencias en la liberación de ⁵¹Cr causada por los materiales frescos y endurecidos; esto puede deberse a un aumento de la concentración de productos tóxicos en el medio, al ser mayor el tiempo de extracción a que se someten los materiales.

La mayoría de los materiales dentales compuestos de sistemas poliméricos han demostrado efectos tóxicos cuando se ensayan en animales de experimentación. Algunos experimentos *in vivo* han demostrado que las resinas de restauración y los cementos a base de acrílicos son irritantes a la pulpa, relacionándolo con el hecho de la difusión de algunos monómeros a través de la dentina, lo cual se ha evidenciado con el metacrilato de metilo y otros componentes.^{3,42-44}

Sin embargo, Mjor y Langeland no encontraron relación entre el grado de irritación pulpar *in vivo* y la citotoxicidad *in vitro* de ciertos materiales. Los resultados reportados por Northup explican en parte estas contradicciones, la comparación de la repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo de citotoxicidad en los modelos *in vitro* e *in vivo* demuestra las ventajas del modelo *in vitro*. Se ha observado que resinas dentales colocadas en cavidades dentales profundas con fondo cercano a la pulpa, e incluso con la pulpa expuesta, solo producen una respuesta tóxica muy ligera a pesar de manifestar elevada toxicidad *in vitro*. Este hecho puede atribuirse a que en las técnicas *in vitro* la acción de los migrantes tóxicos sobre las células es constante, mientras que *in vivo* la acción es aguda (temporal), debido a la rápida migración de todo el monómero residual gracias a la acción lixivante y diluyente de la saliva, lo que se apoya en las observaciones de Pham y Ferracane, quienes encontraron que aproximadamente el 60% de los componentes migrables de una resina dental eran eluidos en solución salina durante las 8 horas posteriores al fraguado.^{21,45-50}

Las resinas de restauración dental, ya sean sellantes de fosas y fisuras u obturantes, se aplican habitualmente en pequeñas cantidades en sitios donde no hay contacto directo con el tejido pulpar o gingival, siendo además poco probable su ingestión, por lo que se minimiza el riesgo sistémico de toxicidad por vía oral.

Las reacciones observadas en el tejido pulpar o gingival con la aplicación de los materiales de restauración dental pueden ser causadas por varios factores, tales como: traumas durante la prepara-

ción del paciente, la aplicación de los materiales de recubrimiento y el procedimiento de acabado, defectos en el recubrimiento, rupturas por contracción, infección residual y raramente debido a efectos tóxicos del material. Si las resinas se aplican apropiadamente, se espera que sean bien toleradas por el tejido pulpar. Se considera que las reacciones pulpares son debidas fundamentalmente al efecto de bacterias en la interfase diente-recubrimiento. Si el tejido no está expuesto y si se evita la penetración bacteriana, entonces las reacciones gingivales son principalmente atribuibles a la placa bacteriana.^{3,51,52}

Las técnicas de cultivo de células constituyen sistemas muy simples para el tamizaje de toxicidad de rutina de los biomateriales y un medio muy efectivo para la investigación de los mecanismos de las respuestas tóxicas. Con el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos, los estudios *in vitro* se han convertido en uno de los métodos más importantes para la evaluación biológica de los materiales dentales, constituyendo una referencia obligada antes de profundizar en los estudios *in vivo*. Se han realizado estudios de validación que han demostrado que existe una alta correlación (97%) entre los ensayos de toxicidad local *in vitro* e *in vivo*, esto se debe a que los mecanismos de acción son generalmente los mismos.^{21,25,32-34,53}

Conclusiones

El obturante dental Obtudent FC y el sellante dental Cubridem AC resultaron severamente citotóxicos en contacto con la línea L929 de fibroblastos de ratón, de acuerdo a lo reportado para las resinas basadas en dimetacrilatos aromáticos tipo Bis-GMA. El grado de citotoxicidad mostrado por ambos materiales estuvo en el rango de los análogos comerciales evaluados.

Estos estudios complementaron otros ensayos preclínicos biológicos desarrollados que posibilitaron reunir la evidencia científica válida necesaria para la autorización del registro clínico al Cubridem AC, registrado en Cuba en la especialidad de estomatología.

Bibliografía

1. **Suh H.** Recent advances in biomaterials. *Yonsei Med J.* 1998; 39(2): 87-96.
2. **Vera R, Martínez A, Barceló F, Palacios J, Castañón V.** Macromolecular Symposia, Polychar-7. 1999, en prensa.

3. **Lindén LA.** Photocuring of Polymeric Dental Materials and Plastic Composite Resins, en: Radiation curing in polymer science and technology. Vol 4: Practical aspects and applications, Fouassier JP y Rabek JF (eds.), Elsevier Science Publishers LTD, (1993), pp 78.
4. **Casaret y Doullis.** Toxicology, en: The basic science of poisons, Doull Klaasen (ed.), Cd McMillan Publishing Co, (1980), p 11.
5. **Brankley WA, Segli RR.** Summaries of clinical relevant studies of dental materials from the 1995 meeting of American Association of Dental Research. General Dentistry. 1996;3, 250-62.
6. **Watts DC y col.** Dental materials: 1995 literature review. J. Dent. Res. 1997;25, 173 -208.
7. **Davidenko N, Díaz JM, Sastre R.** Recubrimientos dentales fotopolimerizables. Revista de Plásticos Modernos. 1999; 78 (519): 287-96.
8. **Brauer GM.** Biomedical and Dental Applications of Polymers, Gebelein CG y Koblitz FF (eds), New York, Plenum Press, (1981), p 395.
9. **CRA Newsletter.** 1991; 15(4):2.
10. **Dodon IL.** Posterior Composite Resin Dental Restorative Materials, Vanherle G y Smith DC (eds.), Minnesota Mining and Manufacturing co, MN, USA, (1985), p 71.
11. **Ruyter IE y Sjovik IJ.** Acta Odontol Scand. 1981; 39, 133.
12. **Niinimaki A, Rosberg J y Saari S.** Contact Dermatitis. 1983; 9, 148.
13. **Nygaard-Ostby, B.** Odontol Tiskr. 1955; 63, 173.
14. **Oysaed H, Ruyter IE y Sjovik-Kleven. IJ Dent Res.** 1988; 67, 1289.
15. **Stenman E y Bergman M. Scand J Dent Res.** 1989; 97,76.
16. **Lindén LA.** Polymeric Materials Encyclopedia, Salomone JC (ed.), CRC Press, Boca Raton FL, (1996), 1839.
17. **Dautzenberg H y Jeager W.** Polyelectrolytes, Hanser P (ed.), New York, (1994).
18. **Stanley HR.** Local and systemic responses to dental composites and glass ionomers. Adv Dent Res. 1992; 6: 55-64.
19. **Van Noort R y col.** Dental materials: 1992 literature review. J Dent. 1994; 22(1): 5-28.
20. **Labella R, Davy KW, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G.** Monomethacrylate comonomers for dental resins. Eur J Oral Sci. 1998; 106(3): 816-24.
21. **Rathbun MA, Craig RG, Hanks CT, Filisko FE.** Cytotoxicity of a Bis-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. Journal of Biomedical Materials Research. 1991; 25: 443-457.
22. **Lefebvre CA, Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL.** The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. Int J Prosthodont. 1995; 8(2): 122-8.
23. **Schuster GS, Lefebvre CA, Dirksen TR, Knoernschild KL, Caughman GB.** Relationship between denture base resin cytotoxicity and cell lipid metabolism. Int J Prosthodont. 1995; 8(6): 580-6.
24. **Sheridan PJ, Koka S, Ewoldsen NO, Lefebvre CA, Lavin MT.** Cytotoxicity of denture base resins. Int J Prosthodont. 1997; 10(1): 73-7.
25. **Kawahara H, Yamagami A, Nakamura M.** Biological testing of dental materials by means of tissue culture. Experimental electro-chemical and biological test. 1992; 18(2), 443-67.
26. **Courtney JM, Lamba NM, Gaylor JD, Ryan CJ, Lowe GD.** Blood-contacting biomaterials: bioengineering viewpoints. Artif Organs. 1995; 19(8): 852-6.
27. **Stanley HR.** Biological evaluation of dental materials. Int dent J. 1992; 42(1): 37-46.
28. **Brauer GM y Antonucci JM.** Polymers: Biomaterials and Medical Applications, Kroschwitz JI (ed.). Wiley, New York, USA, (1989), p.109.
29. **Polyzois GL, Dahl JE, Hensten-Pettersen A.** Biological testing of dental materials: development of national and international standards. J Biomater Appl. 1995; 9(4): 355-62.
30. **Larsson KS.** Screening test for systemic effects of dental materials. J Dent. 1994; 22 (2): S 12-5.
31. **Trevor Rae.** Tissue culture techniques in biocompatibility testing, en: Introduction to biocompatibility testing. Techniques of Biocompatibility Testing, William DF (ed.), CRC Series of Biocompatibility, CRC Press, Boca Raton, Florida, (1986), p 81.
32. **Spangberg LS.** Correlation *in vivo* and *in vitro* screening tests. J Endodont. 1978; 4, 296-99.
33. **Nakamura M, Doi H, Yokoyama K, Kawahara H.** Biocompatibility test of microfilled resins and composites for core use *in vitro*. Dent Mater J. 1984; 3, 280-87.
34. **Ekwall B.** Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. Ann New York Acad Sci. 1983; 407, 64-77.
35. **Cascone MG, Tricoli M, Cerrai P, Sbarbati Del Guerra R.** Cell cultures in the biocompatibility study of synthetic materials. Cytotechnology. 1993; 11(1): S137-9.
36. **Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola Cr, Granchi D, Savarino L.** Cell culture methods for testing biocompatibility. Clin Mater. 1994; 15(3): 173-90.
37. **Jawequi HO.** Cell adhesion to biomaterials: The role of several extracellular matrix components in the attachment of non-transformed fibroblasts and parenchymal cells. Trans Am Soc Artif Inten Organs. 1987; 33, 66-74.
38. **Stanley HR (ed.).** Toxicity Testing of Dental Materials, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, (1985), p 13.

39. **Soderholm KJ, Mariotti A.** Bis GMA-based resins in dentistry: are they safe?. *J. Am Assoc.* 1999; 130(2): 201-9.
40. **Anderson DAF, Zimmerman ER, Ferracane JL.** Cytotoxicity of combinations of dental composite components. *J. Dent. Res.* 1987; 66, 133, Abst. 214.
41. **Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N.** Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent.* 1994; 71(6): 618-24.
42. **Grossman LJ.** Full reaction to the insertion of self-curing acrylic resins filling materials. *J Am Dents Assoc.* 1953; 461,265.
43. **Stanley HR, Silverdlow H, Buonocore MC.** Full reaction to anterior restorative materials. *J Am Dents Assoc.* 1967; 751,132.
44. **Stanley HR.** Biological testing and reaction of dental materials, en: *Dental Materials Review*, Craig RG (ed.), University of Michigan, Ann Arbor, (1977), p 205.
45. **Mjor IA y Hensten-Pettersen A.** Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation test and pulp studies. *International Dental Journal.* 1977; 27, 124.
46. **Langeland K.** Correlation of screening test to usage test. *J. Endodont.* 1978; 4, 300-3.
47. **Cox CF, Keal HJ, Keal CL.** Biocompatibility of surface sealed dental materials against exposed pulps. *J. Prosthet. Dent.* 1987; 57, 1-8.
48. **Anderson DAF, Ferracane JL, Seale NS.** Pulp reactions to variably cured and sealed dental composites. *J. Dent. Res.* 1989; 68, 346, Abst 1319.
49. **Northup SJ.** Cytotoxicity of plastics and elastomers. Stimuli to the revision process. *Pharmacopoeial Forum.* Sept/Oct. 1987: 2939-40.
50. **Pham DC, Ferracane JL.** Leaching from lighth cured . *J. Dental. Res.* 1988; 67,225, Abst 903.
51. **Schmaltz G.** The biocompatibility of non-amalgam dental filling materials. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106 (2 Pt2): 696-706.
52. **Pameijer CH y Stanley HR.** Pulp reactions to resin cements. *Am J Dent.* 1992; 5(2): 81-7.
53. **Northup SJ.** Current Problems Associated with Toxicity Evaluation of Medical Device Materials and Future Research Needs. *Fundamental and applied Toxicology.* 1989; 13: 196-204.