



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EVALUACIÓN IN VIVO DE LA
RESPUESTA INFLAMATORIA DEL
TEJIDO CELULAR SUBCUTÁNEO DE
RATAS HOLTZMAN FRENTE A DOS
SELLADORES DE CONDUCTOS
RADICULARES

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA
OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN
ENDODONCIA

MANUEL FERNANDO CORDOVA MALCA

LIMA-PERÚ
2023

ASESOR

Mg. Esp. Carlos Mendiola Aquino

JURADO DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

MG. MIGUEL BENJAMIN PEREA PAZ

PRESIDENTE

MG. LILLIE ELIZABETH ABANTO SILVA

VOCAL

MG. CARLOS YURI LIÑAN DURAN

SECRETARIO

DEDICATORIA

A mis hijos Mateo y Mauricio que son todo en mi vida, a Lucía mi esposa, a mi hermana Milagros y a mis padres Manuel y Rosaura, ya que gracias a su valioso apoyo puedo conseguir todo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Mendiola y al Dr. Roberto León por el apoyo constante durante todo este trabajo.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Trabajo de investigación autofinanciado.

EVALUACIÓN IN VIVO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA DEL TEJIDO CELULAR SUBCUTÁNEO DE RATAS HOLTZMAN FRENTE A DOS SELLADORES DE CONDUCTOS RADICULARES

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	1library.co Fuente de Internet	2%
2	doczz.es Fuente de Internet	2%
3	repositorio.uladech.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	www.slideshare.net Fuente de Internet	1%
5	repositorioinstitucional.uabc.mx Fuente de Internet	1%
6	www.anmat.gov.ar Fuente de Internet	1%
7	es.slideshare.net Fuente de Internet	1%
8	es.scribd.com Fuente de Internet	1%

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
Resumen	
Abstract	
I. Introducción	1
II. Desarrollo temático	2
II.1. Docencia universitaria estomatológica	2
II.2. Análisis crítico de literatura estomatológica	9
II.3. Proyecto de investigación en estomatología	16
III. Conclusiones	39
IV. Referencias bibliográficas	40
V. Anexos	

RESUMEN

Introducción: Los tratamientos de conductos implican el uso de un sellador endodóntico de obturación para proporcionar un sellado apical y facilitar la regeneración y reparación de los tejidos apicales. La investigación contemporánea se ha centrado en su capacidad para respaldar una respuesta inflamatoria del tejido celular subcutáneo favorable. **Desarrollo temático:** El presente trabajo de investigación consta de 3 proyectos: Un sílabo para un curso de educación continua, un análisis crítico para ver la calidad del reporte escrito, CRIS y para la calidad metodológica, AXIS para estudios in vitro y un proyecto de investigación. **Conclusiones:** La correcta elaboración de un sílabo para un curso es de vital importancia para conseguir las competencias propuestas y elaboradas. El análisis crítico de literatura estomatológica ha sido de gran importancia para verificar la calidad del nuevo conocimiento obtenido. La valoración del artículo de Silva RAB, Gatón-Hernández P, Pucinelli CM, Silva FWG de PE, Lucisano MP, Consolaro A, et al. del 2022 mediante las listas CRIS y AXIS demostró que cumplió con la mayoría de los ítems evaluados. obteniendo así un gran valor a sus resultados. El Proyecto de investigación tiene como objetivo evaluar in vivo la respuesta inflamatoria del tejido celular subcutáneo de ratas Holtzman frente a dos selladores de conductos radiculares. Esto nos podrá servir para saber qué tipo de sellador endodóntico puede ser utilizado para realizar un tratamiento de endodoncia.

Palabras clave: Tejido apical, sellador, endodoncia.

ABSTRACT

Introduction: Root canal treatments involve the use of an obturation endodontic sealer to provide an apical seal and facilitate the regeneration and repair of apical tissues. Contemporary research has focused on its ability to support a favorable subcutaneous cellular tissue inflammatory response. **Thematic development:** This research consists of 3 projects: A syllabus for a continuing education course, a critical analysis to see the quality of the written report, CRIS and for methodological quality, AXIS for in vitro studies and a research project. **Conclusions:** The correct elaboration of a syllabus for a course is of vital importance to achieve the proposed and elaborated competences. The critical analysis of stomatological literature has been of great importance to verify the quality of the new knowledge obtained. The evaluation of the article by Silva RAB, Gatón-Hernández P, Pucinelli CM, Silva FWG from PE, Lucisano MP, Consolaro A, et al. of 2022, through the CRIS and AXIS lists, it emerged that it complied with most of the items evaluated. thus obtaining a great value to their results. The objective of the research project is to evaluate in vivo the inflammatory response of the subcutaneous cell tissue of Holtzman rats against two root canal sealers. This can help us to know what type of endodontic sealant can be used to perform endodontic treatment.

Keywords: Apical tissue, sealer, endodontics.

I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo consta de tres diferentes productos:

El primero es un sílabo para un curso teórico de educación continua. Está diseñado para que el estudiante de comprender la histología de la pulpa dental y pueda explicar las diferentes reacciones inflamatorias que causan los selladores endodónticos.

El segundo producto, es un análisis crítico de literatura estomatológica del artículo de Silva RAB, Gatón-Hernández P, Pucinelli CM, Silva FWG de PE, Lucisano MP, Consolaro A, et al. del 2022. Es un artículo in vitro que evaluó la respuesta del tejido celular subcutáneo de ratones isogénicos expuestos a silicato tricálcico (Biodentine) y agregado de trióxido mineral (ProRoot MTA). Se evaluó la calidad del reporte escrito mediante CRIS y la calidad metodológica del estudio mediante AXIS.

Por último, se elaboró un proyecto de investigación con la siguiente pregunta: ¿Cuál es la respuesta inflamatoria del tejido celular subcutáneo de ratas Holtzman frente a dos selladores de conductos radiculares in vitro?

II. DESARROLLO TEMÁTICO

II.1. Docencia universitaria estomatológica

FACULTADES DE MEDICINA, DE ESTOMATOLOGIA Y DE ENFERMERIA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
UNIDAD DE POSGRADO Y ESPECIALIZACIÓN
EDUCACION CONTINUA

I. DATOS GENERALES

1.1.	Nombre del curso	:	Reacción inflamatoria de los selladores endodónticos
1.2.	Código	:	NR
1.3.	Dirigido a	:	Cirujanos dentistas
1.4.	Organizado por	:	Unidad de Posgrado y Especialización
1.5.	Semestre académico	:	2023-II
1.6.	Tipo de asignatura	:	Educación continua
1.7.	Prerrequisito	:	Ninguno
1.8.	Modalidad	:	Presencial
1.9.	Créditos	:	1 crédito
			Horas teóricas: 15 horas
			Evaluaciones: 01 hora
1.10.	Duración	:	Del 01 de agosto al 14 de octubre de 2023
1.11.	Coordinador	:	Esp. Manuel Fernando Cordova Malca manuel.cordova@upch.pe

II. RESULTADO DE APRENDIZAJE

Al término del curso el estudiante será capaz de:

1. Conocer la histología de la pulpa dental mediante clases participativas.
2. Conocer los diferentes tipos de selladores endodónticos que existen en el mercado peruano.
3. Explicar las reacciones inflamatorias que causan los selladores endodónticos.

III. CONTENIDOS

Unidad 1: Histología de la pulpa dental
Zona de pulpa periférica
Zona pulpar central
Fibroblastos
Odontoblasto
Células de defensa y otras células
Elementos estructurales y extraestructurales
Fibras
Sustancia fundamental

Riego sanguíneo pulpar

Unidad 2: Selladores de conducto

Óxido de Zinc y Eugenol

Hidróxido de Calcio

Ionómero de Vidrio

Siliconas

Resinas Plásticas

Resinas Hidrofílicas

Poliésteres

Agregado de Trióxido Mineral

Biocerámicos

Unidad 3: Reacciones inflamatorias

Inflamación

Inflamación Aguda

Inflamación Crónica

Reparación

Regeneración

Cicatrización

IV. ESTRATEGIAS DIDÁCTICAS

El contenido del curso se desarrolla en base a clases magistrales y a la presentación oral de un tema de revista de revistas por cada uno de los alumnos participantes.

Clase Magistral: Sinónimo de Clase Teórica (conferencia o clase expositiva) exposición de un tema, siguiendo una estructura determinada, con ayudas audiovisuales y promoviendo la participación activa de los estudiantes.

Revista de revistas: revisión por parte de cada uno de los estudiantes de un tema específico correspondiente a literatura moderna y contemporánea, relacionada con los objetivos específicos, que es presentada y discutida grupalmente con la asesoría del docente.

V. EVALUACIÓN

1. El estudiante será evaluado con un examen final al término del curso.
2. El estudiante será evaluado al final de su presentación de revista de revistas
3. La participación en la discusión de las revistas a través de comentarios, y preguntas también serán calificadas.
4. A los estudiantes que no rindan las evaluaciones se les calificará con nota cero (0).

El examen de rezagados: Es un examen para los estudiantes, quienes por causa justificada no acudieron al examen programado en el sílabo.

El examen sustitutorio: Es un examen para los estudiantes desaprobados. El

resultado se califica con nota máxima de once (11) y sustituye solo la calificación original.

No tienen derecho a examen sustitutorio los estudiantes que desaprobaban por inasistencia y los que desaprobaban el examen de rezagados.

Para la nota final del curso se considerará el siguiente porcentaje.

Aspectos para evaluar	Ponderación
Revistas de revistas	40%
Examen final	60%
Total	100%

La nota final se expresa en escala vigesimal, con valores de dos decimales. No hay redondeo a la cifra inmediata superior o inferior. La nota mínima aprobatoria es once (11.00).

EQUIVALENCIA	
00.0 – 10.99	Desaprobado
11.00 – 20.00	Aprobado

La calificación final se expresa en escala vigesimal, con valores de dos decimales. No hay redondeo a la cifra inmediata superior o inferior. La calificación mínima aprobatoria es once (11.00).

VI. BIBLIOGRAFÍA

Básica:

1. ISO 10993-6:2016. ISO. 2022. Available from: <https://www.iso.org/standard/61089.html>
2. Ricucci D, Grande NM, Plotino G, Tay FR. Histologic Response of Human Pulp and Periapical Tissues to Tricalcium Silicate-based Materials: A Series of Successfully Treated Cases. *J Endod.* 2020;46:307–317.
3. Pucinelli CM, Silva RABD, Borges LL, Borges ATDN, Nelson-Filho P, Consolaro A, et al. Tissue Response after Subcutaneous Implantation of Different Glass Ionomer-Based Cements. *Braz Dent J.* 2019;30:599–606.
4. Ikarashi Y, et al. Tissue Reactions and Sensitivity to Iron Chromium Alloys. *Mater Trans.* 2002;43:3065-71.
5. Khandelwal A, Janani K, Teja K, Jose J, Battineni G, Riccitiello F, et al. Periapical healing following root canal treatment using different endodontic sealers: A systematic review. *Biomed Res Int.* 2022:3569281.
6. Seltzer, S. *Endodontology. Biological consideration in endodontic procedures.* New York: Mc Graw-Hill Company; 1971
7. Silva RAB, Gatón-Hernández P, Pucinelli CM, Silva PE, Lucisano MP, Consolaro A, et al. Subcutaneous tissue reaction and gene expression of

inflammatory markers after Biodentine and MTA implantation. *Braz Dent J.* 2022;33(1):41–56.

Complementaria:

8. Abou ElReash A, Hamama H, Abdo W, Wu Q, Zaen El-Din A, Xiaoli X. Biocompatibility of new bioactive resin composite versus calcium silicate cements: an animal study. *BMC Oral Health.* 2019;19(1):194.

9. Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod.* 2012;38(9):1233-8.

VII. PROFESORES DEL CURSO E INVITADOS

Grado o Título	Nombres	Apellidos	Departamento Académico	Condición Docente/Invitado	Correo electrónico
Esp.	Manuel Fernando	Cordova Malca	Departamento Académico de Clínica Estomatológica	Contratado	manuel.cordova@upch.pe

VIII. PROGRAMACIÓN DE ACTIVIDADES

N° de Sesión	Fecha	Horario	Contenido	Estrategias didácticas	Docente
1	01/08/2023	08:00am-09:00am	Histología de los tejidos pulpares	Clase magistral participativa	Esp. Fernando Cordova
2	08/08/2023	08:00am-09:00am	Selladores de conducto	Clase magistral participativa	Esp. Fernando Cordova
3	15/08/2023	08:00am-09:00am	Reacciones inflamatorias	Clase magistral participativa	Esp. Fernando Cordova
4	22/08/2023	08:00am-09:00am	Zona de pulpa periférica Zona pulpar central	Revista de revista de Histología de tejidos pulpares	Esp. Fernando Cordova
5	29/08/2023	08:00am-09:00am	Fibroblastos Odontoblasto	Revista de revista de Histología de tejidos pulpares	Esp. Fernando Cordova
6	05/09/2023	08:00am-09:00am	Células de defensa y otras células Elementos estructurales y extraestructurales	Revista de revista de Histología de tejidos pulpares	Esp. Fernando Cordova
7	12/09/2023	08:00am-09:00am	Fibras Sustancia fundamental Riego sanguíneo pulpar	Revista de revista de Histología de tejidos pulpares	Esp. Fernando Cordova
8	19/09/2023	08:00am-09:00am	Óxido de Zinc y Eugenol Hidróxido de Calcio	Revista de revista de selladores endodónticos	Esp. Fernando Cordova

9	26/09/2023	08:00am-09:00am	Ionómero de Vidrio Siliconas	Revista de revista de selladores endodónticos	Esp. Fernando Cordova
10	03/10/2023	08:00am-09:00am	Resinas Plásticas Resinas Hidrofílicas	Revista de revista de selladores endodónticos	Esp. Fernando Cordova
11	10/10/2023	08:00am-09:00am	Poliésteres Agregado de Trióxido Mineral Biocerámicos	Revista de revista de selladores endodónticos	Esp. Fernando Cordova
12	17/10/2023	08:00am-09:00am	Inflamación Aguda Inflamación Crónica	Revista de revista de reacción inflamatoria	Esp. Fernando Cordova
13	24/10/2023	08:00am-09:00am	Reparación	Revista de revista de reacción inflamatoria	Esp. Fernando Cordova
14	31/10/2023	08:00am-09:00am	Regeneración	Revista de revista de reacción inflamatoria	Esp. Fernando Cordova
15	07/10/2023	08:00am-09:00am	Cicatrización	Revista de revista de reacción inflamatoria	Esp. Fernando Cordova
16	14/10/2023	08:00am-09:00am	Examen final	Examen	Esp. Fernando Cordova

IX. ANEXOS

RÚBRICA DE EVALUACIÓN DE REVISTA DE REVISTAS

Alumno: Fecha:

Título de la Revista:.....

AutorRevista:.....

ITEM A EVALUAR	PUNTAJE IDEAL	PUNTAJE OBTENIDO	FIRMA DE DOCENTE
Presentación personal	02		
Envía la traducción al docente y sus compañeros hasta el sábado anterior a la fecha de presentación	03		
Presenta hoja de resumen del artículo el día de la exposición	02		
Rev. Del esquema teórico de la revista de revistas	03		
Oratoria y exposición (20 minutos)	03		
Comprensión de la revista	03		
Material audiovisual y didáctico, presentación del PPT	02		
Calidad de las respuestas (10 minutos)	02		
Nota Final			

II.2. Análisis crítico de literatura estomatológica

II.2.1. Información general

Información	Descripción
Título	Subcutaneous tissue reaction and gene expression of inflammatory markers after Biodentine and MTA implantation
Autores	Bezerra Silva RA, Gatón-Hernández P, Maschietto Pucinelli C, García de Paula E Silva FW, Pacífico Lucisano M, Consolaro A, Cardoso de Sá R, Curcino Araujo LD, Damião Sousa-Neto M, Bezerra Silva LA.
Revista	Brazilian Dental Journal
Año de publicación	2022
País	Brasil
Tipo de estudio	In vitro
Objetivo	
Evaluar la respuesta del tejido conectivo subcutáneo de ratones isogénicos expuestos a silicato tricálcico (Biodentine) y agregado de trióxido mineral (ProRoot MTA).	
Metodología	
La muestra estuvo compuesta por 120 ratones divididos en 4 grupos en 3 periodos experimentales diferentes (7, 21 y 63 días): Biodentine; MTA Pro-Root; Óxido de zinc-eugenol y Control negativo-Falso. Se realizaron análisis microscópicos descriptivos, semicuantitativos y cuantitativos del proceso inflamatorio en secciones H&E y se realizó la evaluación de la expresión génica.	
Resultados	
Se observó un ligero infiltrado inflamatorio, con predominio de escasos macrófagos y polimorfonucleares, ligera fibrosis tisular, cápsula fibrosa regular y con calcificaciones distróficas, en todos los grupos que recibieron los materiales (Biodentine y Pro-Root MTA). Paralelamente, todos los materiales modularon la expresión génica de las diferentes citoquinas y receptores evaluados.	
Conclusiones	
MTA Pro-Root y Biodentine mostraron compatibilidad tisular, inflamación mediada, con aumento del tejido fibroso y producción de citocinas pro y antiinflamatorias.	

II.2.2. Calidad del reporte escrito: CRIS para estudios in vitro

Secciones	Ítem	Recomendación	Descripción	Página
Título y resumen				
Título y resumen	1a	Identifica en el título que es un estudio in vitro/laboratorio.	No, no se mencionó.	41
	1b	Resumen estructurado del diseño, métodos, resultados y conclusiones.	No, no está siguiendo la estructura debido a que solo se menciona resultado y conclusiones.	41
Introducción				
Antecedentes y objetivos	2a	Antecedentes científicos y explicación de los motivos del estudio	Sí, se mencionó los antecedentes relacionados a los materiales que fueron evaluados.	41,42
	2b	Objetivos específicos o hipótesis	Sí, se mencionan objetivos específicos y también una hipótesis nula.	42
Métodos				
Intervenciones	3	La intervención para cada grupo, incluyendo cómo y cuándo se administraron realmente, tienen suficiente detalle para permitir su reproducción.	Sí, se detalla todo el proceso de obtención de los animales, así como con los materiales a evaluar y las muestras histológicas.	42,45
Resultados (outcomes)	4	Medidas de resultado primarias y secundarias completamente definidas, incluyendo cómo y cuándo fueron evaluadas.	Sí, se mencionó las medidas que fueron: Análisis microscópico descriptivo que fue una descripción cualitativa de los eventos histopatológicos observados en el tejido de reacción en contacto con los materiales. Análisis microscópico semicuantitativo que fue en el tejido periférico al material ensayado, se dio una puntuación (0,1,2,3) según lo observado para formación de fibras de colágeno y para infiltrado inflamatorio. Los tiempos a evaluar en el estudio fueron 7, 21 y 63 días.	43
Tamaño muestral	5	Explica cómo se determinó el tamaño muestral.	No, no se explicó cómo obtienen el tamaño muestral.	43

Randomización:				
Generación de la secuencia	6	Menciona el método utilizado para generar la secuencia de asignación aleatoria.	No, no se aplicó asignación aleatoria en el estudio.	-
Mecanismo de ocultación de la asignación	7	Indica el mecanismo usado para implementar la secuencia de asignación aleatoria (como contenedores numerados secuencialmente), descripción de las medidas adoptadas para ocultar la secuencia hasta la asignación de las intervenciones.	No, no aplicaron secuencia de asignación aleatoria en el estudio.	-
Implementación	8	Determina quién generó la secuencia de asignación aleatoria, quién enroló las muestras y quién las asignó a la intervención.	No se determinó quien generó la secuencia aleatoria o dirigió en enrolamiento.	-
Cegamiento	9	En caso sea afirmativo, ¿indica a quién se cegó tras la asignación a las intervenciones (por ejemplo, a los profesionales sanitarios, a los que evalúan los resultados) y cómo se hizo?	No se indica quien dirigió el cegamiento.	-
Métodos estadísticos	10	Menciona los métodos estadísticos usados para comparar los grupos para resultados primarios y secundarios	Sí, se mencionó todas las pruebas estadísticas que fueron utilizadas en el estudio: Para datos semicuantitativos la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba posterior de Dunn. Para los datos cuantitativos el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido de la prueba posterior de Bonferroni.	45
Resultados				
Especímenes analizados	11a	Indica el número de especímenes incluidos en cada grupo de análisis.	No, no se indicó el número de especímenes de cada grupo evaluado.	46
Resultados y estimación	11b	Describe los resultados primarios y secundarios, de cada grupo, y la magnitud estimada del efecto y su precisión (como el intervalo de confianza del 95%, valor de p, etc.)	Sí, se describieron los resultados primarios de cada grupo y en los días que fueron evaluados, y la precisión del intervalo de confianza fue de 5% y si mencionaron el valor de p.	46,47, 48,49, 51,51
Discusión				

Limitaciones	12a	Establece las limitaciones, abordando las fuentes de posibles sesgos, imprecisiones y, si procede, multiplicidad de análisis.	Sí, se estableció las limitaciones debido a que los resultados se aplicaron a tejido de ratones y no a tejido pulpar.	51,52
Generalización	12b	Indicar la generalización (validez externa, aplicabilidad) de los resultados.	Sí, se indicó la validez de los resultados en comparación con otros estudios ya realizados.	51,52
Interpretación	12c	Interpretación coherente con los resultados, sopesando los beneficios y los perjuicios, y teniendo en cuenta otras pruebas pertinentes.	Sí, se mencionó una interpretación coherente con los resultados del estudio y se compararon los beneficios y perjuicios teniendo en cuenta otros estudios.	51,52, 53,54
Otra información				
Protocolo	24	Indica dónde puede consultarse el protocolo completo, si está disponible	No, no lo mencionaron en ninguna parte del artículo. El estudio se aprobó por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Odontología de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo (CEUA/FORP-USP) (Proceso Número 2015.1.890.58.4).	42
Financiamiento	25	Menciona las fuentes de financiamiento y otras ayudas (como suministros), papel de los financiadores	No, no lo mencionaron en ninguna parte del artículo.	-

II.2.3. Calidad metodológica del estudio: AXIS adaptada para estudios in vitro

Introducción	Sí	No	No sé	¿Por qué?	Página
1. ¿Fueron los objetivos del estudio claros?	X			El objetivo principal fue evaluar la respuesta del tejido conectivo subcutáneo de ratones isogénicos expuestos al silicato tricálcico (Biodentine) y al agregado de trióxido mineral (ProRoot MTA).	41
Métodos					

2. ¿Fue el estudio diseñado apropiadamente para los objetivos propuestos?	X			Todos los objetivos mencionados fueron desarrollados en el artículo.	42
3. ¿Fue el tamaño de muestra justificado?		X		El tamaño muestral no fue justificado, pero si se mencionó el número de ratones adquiridos.	43
4. ¿Fueron los especímenes tomados de una población de base apropiada?	X			Todos los ratones fueron de una sola especie (Isogénicos de la cepa BALB/c).	43
5. ¿Fue el proceso de selección de especímenes congruente con la población de investigación?	X			Se siguió correctamente los criterios de selección, que incluía ratones macho de la cepa BALB/c, de 6 a 8 semanas con un peso promedio de 20 gramos.	43
6. ¿Se midieron adecuadamente los resultados de acuerdo con los objetivos del estudio?	X			Se evaluó la respuesta tisular, la respuesta inmune y la participación de citocinas pro y anti inflamatorias inducidas por los diferentes materiales utilizados en el estudio (Biodentine, MTA).	44
7. ¿Se midieron correctamente los resultados con el uso de instrumentos o medidas que hayan sido experimentadas, probadas o publicadas previamente?	X			Todos las muestras se midieron siguiendo los parámetros histológicos y también se menciona que siguen los procedimientos del estudio de Puccinelli en el 2019.	44
8. ¿Está claro que se usó para determinar significancia estadística, estimadores de precisión, o ambos? (por ejemplo: valores p, intervalos de confianza)	X			El estimador de precisión utilizado en este estudio fue Bonferroni, el valor de p (significancia estadística) fue del 5% El nivel de significación adoptado fue del 5% e intervalo de confianza del 95%	45

9. ¿Fueron los métodos (incluye métodos estadísticos) suficientemente descritos para permitir que estos sean repetidos?	X			<p>Los datos cuantitativos se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA)</p> <p>Los datos semicuantitativos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba posterior de Dunn.</p> <p>Todos los análisis y representaciones gráficas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.</p>	45
Resultados					
10. ¿Fueron descritos adecuadamente los datos básicos?	X			Se mencionó los resultados de todos los materiales que fueron estudiados (MTA, Biodentine, Óxido de Zinc-eugenol y el grupo control). También se mencionó las diferentes reacciones para los diferentes tiempos que se evaluaron en el estudio.	46,47,48
11. ¿Si es apropiado, la información de los individuos con no respuesta fue descrita?				No aplica	
12. ¿Fueron los resultados consistentes internamente?	X			Debido a que se mostraron las diferentes reacciones que arrojaban cada uno de los materiales evaluados en los tiempos que detalló el estudio	
13. ¿Fueron los resultados presentados descritos en la metodología?	X			Se realizó basado en el análisis microscópico descriptivo, análisis microscópico semicuantitativo y el	48,49,50, 51

				análisis microscópico cuantitativo.	
Discusión					
14. ¿Fueron las discusiones y conclusiones de los autores justificadas por los resultados?	X			Se mencionó los resultados de todos los materiales y se compararon entre ellos. Con respecto a las conclusiones se mostró que tanto Biodentine como MTA fueron los materiales que mostraron mayor compatibilidad tisular, inflamación mediana.	51-54
15. ¿Fueron discutidas las limitaciones del estudio?		X		No se mencionó en ninguna parte del artículo.	-
Otros					
16. ¿Existieron algunas fuentes de financiación o conflictos de interés que puedan afectar la interpretación de los resultados por los autores?		X		Los autores niegan cualquier conflicto de interés relacionado con este estudio.	54
17. ¿Se obtuvo aprobación ética o consentimiento de los participantes?	X			Aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Odontología de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo (CEUA/FORP-USP) (Proceso Número 2015.1.890.58.4).	42

Adaptado de:

1. Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta M. CRIS Guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research. *J Conserv Dent.* 2014;17(4):301–304.
2. Downes MJ, Brennan ML, Williams HC, et al. Development of a critical appraisal tool to assess the quality of cross-sectional studies (AXIS). *BMJ Open* 2016;6:e011458.
3. Plaza-Ruiz SP. Estudios transversales analíticos. En: Barbosa-Liz DM, Pineda-Vélez EL, Agudelo-Suárez AA. *Odontología basada en la evidencia: de la teoría a la práctica.* Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2020.

II.3. Proyecto de investigación en estomatología

TÍTULO

Evaluación in vivo de la respuesta inflamatoria del tejido celular subcutáneo de ratas holtzman frente a dos selladores de conductos radiculares

RESUMEN

Antecedentes: Los tratamientos de conductos implican el uso de un sellador endodóntico de obturación para proporcionar un sellado apical y facilitar la regeneración y reparación de los tejidos periapicales. La investigación contemporánea se ha centrado en su capacidad para respaldar una respuesta inflamatoria del tejido celular subcutáneo favorable. **Objetivos:** Comparar histológicamente la respuesta inflamatoria y reparación del tejido celular subcutáneo de ratas Holtzman frente a 2 selladores endodónticos a base de MTA e Hidróxido de Calcio) **Material y métodos:** La presente investigación se desarrollará en el paradigma cuantitativo y el diseño de estudio será tipo será tipo experimental *in vivo*, longitudinal, experimental y comparativo. Se emplearán 24 ratas Holtzman machos de 3 meses de edad y con un peso aproximado entre 200 a 300 gramos. Se evaluará la reacción inflamatoria de los 2 selladores endodónticos a las 48 horas, 15 días y 30 días.

Palabras Clave: Tejido apical, Sellador, endodoncia

INTRODUCCIÓN

Actualmente, después del desbridamiento completo del sistema de conductos radiculares, la obturación total de dicho espacio con un material biocompatible establece un factor clave para el éxito de los tratamientos endodónticos (1). El uso de selladores de conductos radiculares (SCR) es fundamental para promover la capacidad de sellado de la gutapercha en conductos radiculares complejos; los SCR comúnmente utilizados incluyen resina, hidróxido de calcio, óxido de zinc-eugenol o silicona (2,3).

Los selladores a base de hidróxido de calcio pueden promover la formación de tejido duro y disminuir la osteoclastogénesis (4), pero tienden a disolverse con el tiempo y, por lo tanto, pueden comprometer el sellado endodóntico (5). Se han comercializado selladores a base de hidróxido de calcio, como Sealapex® (SybronEndo, Glendora, CA, USA). En los últimos años, el agregado de trióxido mineral (MTA), un material a base de silicato de calcio, ha ganado popularidad en endodoncia como material de obturación del extremo radicular y recubrimiento pulpar, su alto pH genera una estrecha zona de necrosis por coagulación que es un iniciador de una respuesta de cicatrización de heridas (6,7,8). En el mercado también tenemos selladores que contienen agregado de trióxido mineral (MTA) y silicato de calcio. MTA-Fillapex® (Angelus, Londrina, Brazil) es un sellador a base de MTA compuesto por resinas, bismuto radiopaco, sílice nanoparticulada y MTA (9).

La inflamación es una reacción de la microcirculación, que se caracteriza por desplazamientos de líquidos y leucocitos de la sangre hacia el compartimiento extravascular (10,11). Se entiende por esta definición, como una respuesta biológica frente a un estímulo producido por un daño a los tejidos. Se caracteriza por la microcirculación provocada por moléculas liberadas por el daño hístico, que ocasiona desplazamientos de líquidos y leucocitos de la sangre hacia el compartimiento de los elementos desplazados, así como el comportamiento del medio extravascular. La calidad y duración de la inflamación depende de la magnitud del daño y de la capacidad de respuesta del huésped. El resultado favorable de la inflamación de corta duración (inflamación aguda) conduce a la reparación del daño; cuando la inflamación no llega a vencer la agresión el proceso puede prolongarse indefinidamente (inflamación crónica) o alcanzar niveles de agresión y daño (11).

En el caso de que el sellador se extruya accidentalmente a través del ápice, lo cual no es una experiencia poco común en endodoncia, desencadenaría en que los componentes no polimerizados puedan ser tóxicos para los tejidos periapicales (9); por ello, la pregunta de investigación es ¿Cuál es la respuesta inflamatoria del tejido celular subcutáneo de ratas holtzman frente a dos selladores de conductos radiculares in vitro?

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar in vivo la respuesta inflamatoria del tejido celular subcutáneo de ratas Holtzman frente a dos selladores de conductos radiculares.

Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta inflamatoria y reparación del tejido celular subcutáneo de ratas Holtzman a los implantes conteniendo un sellador de conductos a base de MTA (MTA Fillapex®) e Hidróxido de Calcio (Sealapex®) a las 48 horas.
2. Evaluar la respuesta inflamatoria y reparación del tejido celular subcutáneo de ratas Holtzman a los implantes conteniendo un sellador de conductos a base de MTA (MTA Fillapex®) e Hidróxido de Calcio (Sealapex®) a los 15 días.
3. Evaluar la respuesta inflamatoria y reparación del tejido celular subcutáneo de ratas Holtzman a los implantes conteniendo un sellador de conductos a base de MTA (MTA Fillapex®) e Hidróxido de Calcio (Sealapex®) a los 30 días.
4. Comparar la respuesta inflamatoria y reparación del tejido celular subcutáneo de ratas Holtzman a los implantes conteniendo un sellador de conductos a base de MTA (MTA Fillapex®) e Hidróxido de Calcio (Sealapex®) a las 48 horas, 15 días y 30 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

In vitro

Muestra

Se utilizará el mismo número de muestra que se utilizó en el artículo base (12), y estará conformada por 24 ratas holtzman macho, de 3 meses de edad, con un peso aproximado entre 200 a 300 gramos; divididas en 3 grupos experimentales (n=8), de acuerdo con el sellador:

Grupo 1: Sealapex® un sellador a base de hidróxido de calcio.

Grupo 2: MTA Fillapex® un sellador a base de Agregado de Trióxido Mineral.

Grupo 3: Grupo control, tubos de polietileno vacíos usados como control.

Los animales se conseguirán del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y se cumplirá con los requisitos zoonosanitarios del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) del Perú (13).

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Ratas Holtzman machos de 3 meses de edad aproximadamente.
- Ratas Holtzman machos con peso aproximado entre 200 a 300 gramos.

Criterios de exclusión

- Ratas Holtzman de la misma familia.
- Ratas Holtzman con alguna alteración genética o física

Operacionalización de variables (Anexo 1)

La reacción inflamatoria es la respuesta frente a las agresiones del medio, y está generada por los agentes inflamatorios. Para la operacionalización, se definirá como el conteo de células relacionadas con el proceso inflamatorio y que determina el tipo de inflamación. Variable cuantitativa, politómica y ordinal. Los valores serán: 1: No irritante (conteo celular 0,0 - 2,9); 2: Irritante Leve (conteo celular 3,0 - 8,9); 3: Irritante Moderado (conteo celular 9,0 - 15,0); 4: Irritante Severo (conteo celular >15).

El sellador endodóntico es el material utilizado para realizar la obturación tridimensional en un tratamiento de conductos. Para la operacionalización será definida como el material endodóntico colocado en tubos de teflón. Variable

cualitativa, dicotómica y nominal. Los valores contemplados serán 1: Sealapex y 2: MTA Fillapex.

Los tiempos de evaluación serán el número de horas y días que el investigador propone para la evaluación de la respuesta inflamatoria. Para la operacionalización será el número de días que lleva el investigador para realizar el sacrificio de los animales. Variable cualitativa, politómica y nominal. Los valores serán de 1: 48 horas, 2: 15 días y 3:30 días.

Técnicas y procedimientos

Adquisición de los animales

Los animales se conseguirán del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y se cumplirá con los requisitos zoonosanitarios del servicio nacional de sanidad animal (SENASA) del Perú (13).

Bioterio de los animales

La Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: Ratón menciona que las exigencias de temperatura para ratones son de 20 a 25 °C y la humedad relativa ambiental entre 40 y 70% (13). El trabajo de investigación se realizará en el Bioterio del LID (Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”) donde se tendrá una temperatura de 22 °C, con una humedad de 70% y fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Los animales estarán en jaulas (4 por jaula) bajo condiciones ambientales de temperatura y régimen alimentario estándar. Cumpliendo así con los estándares establecidos por la Guía de la INS.

Período de cuarentena

El tiempo de adaptación (cuarentena) que pasarán los animales, desde su adquisición hasta su uso, deberá ser no menor a 15 días. El objetivo será tener las ratas menos estresadas y más sanas para que así proporcionen un mejor resultado experimental (13).

Durante este período se observarán a las ratas, para detectar cambios de

comportamiento, enfermedades, heridas o muertes.

Alimentación de los animales

Los animales recibirán alimento en cantidad y calidad suficiente para conservar la salud. El acceso al alimento será libre y dosificado de acuerdo con los requerimientos; el alimento no estará expuesto a temperaturas por encima de 25 °C, humedades relativas mayores a 60%, condiciones insalubres, luz, oxígeno, insectos y roedores, porque ello aumenta el deterioro y la contaminación. Con respecto al agua, será renovada en forma total cada dos días y se eliminará todo contenido residual del frasco de bebida. Estos frascos de bebida serán lavados y desinfectados una vez por semana, los picos serán observados y lavados con cepillo periódicamente para evitar el taponamiento (13).

Manejo de lecho o cama de los animales:

La viruta de madera será el material seleccionado para el lecho o cama de los animales, que se transportará y será almacenado en sacos o envases de plástico, cerrados y aislados del piso, de modo que evite la contaminación. Se utilizarán cantidades suficientes para mantener a los animales secos entre cada cambio. La eliminación de la viruta potencialmente contaminada se realizará tres veces por semana (13).

Preparación de los selladores de conductos

Los tubos de polietileno serán rellenos con la mezcla fresca de los selladores Sealapex y MTA Fillapex. Para el llenado, se utilizarán jeringas descartables

hipodérmicas de 1 cc que contengan el material fresco en su interior; posteriormente, se procederá a inyectar dentro del tubo de polietileno el material correspondiente, de modo que el llenado se hace más exacto y sin desperdiciar.

Los selladores (Sealapex y MTA Fillapex) se prepararán según las indicaciones del fabricante con la ayuda de una espátula de cemento de acero inoxidable y una platina de vidrio estéril. El sellador Sealapex se presenta en forma de dos tubos, un tubo base de 12 gramos y un tubo de 12 gramos de catalizador. Las instrucciones de uso del material mencionan que deben mezclarse porciones iguales en longitud de la pasta base y de la pasta catalizador durante 15 a 20 segundos o hasta que queden perfectamente mezcladas. No se deben variar las proporciones de la mezcla. El Sealapex fragua en aproximadamente 60 minutos en un conducto radicular a 37 °C y humedad relativa del 100%.

El sellador MTA Fillapex se presenta en forma de jeringa doble de automezcla. Las instrucciones de uso del material mencionan que se debe hacer una proporción adecuada del producto (1:1), se presiona el émbolo para dispensar el producto en una platina de vidrio o bloque de mezcla y se tiene un tipo de trabajo de 23 minutos. Luego el sellador será introducido al tubo de polietileno, se cortará en fragmentos de 5 milímetros de longitud con la ayuda de una hoja de bisturí N° 15. Entonces observaremos que los tubos de teflón estén llenos al ras de ambos extremos y se procederá al retiró del exceso de material utilizando gasas estériles. Cada uno de estos tubos cortados serán colocados en el Tejido Celular Subcutáneo de las ratas.

Preparación de los animales

A los animales se les suspenderá el alimento y el agua 12 horas antes del procedimiento anestésico. El procedimiento anestésico será por vía intraperitoneal (IP) con una solución aproximada de Ketamina (Keta A 100 ®, 0.2 ml por cada 100 gramos de peso) y Xilazina (Dormixil ®, 0.1 ml por cada 100 gramos de peso). Para esto se usará jeringas de 01 ml con aguja 25G, este procedimiento lo realizará un veterinario capacitado del bioterio del LID. Luego se procederá al recorte de pelo del animal en el área establecida, con la ayuda de una tijera, casi al ras de la piel, repasando después con una rasuradora eléctrica. Luego, se aplicará una crema depilatoria por 2-3 minutos, y será retirada con una gasa humedecida en suero fisiológico. De esta manera se logrará retirar todos los pelos del animal en la zona de experimentación.

Procedimiento quirúrgico e implantación de la muestra

Para el procedimiento quirúrgico y la implantación de la muestra, a las 24 horas de la depilación, los animales se les volverá a anestésiar con Ketamina (Keta A 100 ®, 0.2 ml por cada 100 gramos de peso) y Xilazina (Dormixil ®, 0.1 ml por cada 100 gramos de peso). Luego de comprobar que la anestesia hizo efecto, se procederá a limpiar y desinfectar el área de trabajo con la ayuda del alcohol yodado y gasas estériles. Posteriormente, se realizará una cruz con plumón indeleble para tener una división en 4 zonas en la cual por cada zona se realizará un corte horizontal de 0.5 cm aproximadamente en la región dorsal con una tijera pequeña de punta cortante. Una vez hecho el corte, y con la ayuda de una tijera recta de punta roma, se decolará la piel por sobre el músculo panículus carnosus.

Los tubos de teflón con el sellador recién preparado se colocarán en un trocar N° 12 por el borde del bisel hasta dejar de observarlos. Una vez preparada, se sujeto al animal por la región cervical y de la cola con el objetivo de exponer el área depilada; seguidamente se implantará el tubo de teflón en el tejido subcutáneo de dicha área hasta 2 cm del punto de punción del trocar, el cual estuvo orientado paralelamente al plano muscular. Después de la implantación, se colocará un punto de sutura con hilo seda negra 5-0 con aguja cortante e inmediatamente después cada rata fue devuelta a su respectiva jaula hasta la fecha prevista del sacrificio.

Controles de los animales

Todos los animales de la investigación serán controlados diariamente durante los primeros 7 días después de los procedimientos quirúrgicos y observar cambios en el apetito y/o en la apariencia física. Las observaciones estarán a cargo de un personal capacitado por el LID y por el investigador (13).

Sacrificio de los animales

Para obtener las muestras, los animales serán sacrificados mediante una sobre dosis (Triple Dosis) de Ketamina (Keta A 100 ®, 0.6 ml por cada 100 gramos de peso) y Xilazina (Dormixil ®, 0.3 ml por cada 100 gramos de peso) y siguiendo los parámetros del comité de ética para animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en los tiempos establecidos: 48 horas, 15 días y 30 días (14). Una vez sacrificada la primera rata se procederá a realizar los cortes en bloques de tejido que contengan el tubo de teflón con un margen de seguridad de 1 cm aproximadamente, se hará la biopsia al tejido que contenga la muestra con la ayuda de una hoja de

bisturí N° 11 en un mango N° 3 y pinzas de disección.

Obtención de la muestra, técnica y observaciones histológicas

La pieza quirúrgica que se obtendrá consiste en piel y tejido conjuntivo subcutáneo, la muestra tendrá un margen de seguridad de 10 mm en todas las direcciones. Contuvo desde el tejido celular subcutáneo hasta el plano muscular, luego se fijan en formol al 10% como mínimo 24 horas a temperatura ambiente. Los especímenes fueron codificados.

Las piezas quirúrgicas o biopsias serán procesadas histológicamente utilizando la coloración Gram con H-E. Cada corte histológico será observado con un microscopio de luz, empleando lentes de aumento de 40x, 100x y de 400x. El primer lente será para observar una imagen panorámica y el segundo y tercero para ver con precisión la reacción inflamatoria. Las observaciones se realizarán en base a los cambios cualitativos predominantes en la zona adyacente al tubo de teflón. El objetivo fue apreciar la reacción inflamatoria en ambos extremos del tubo de teflón; se determinará si la imagen será compatible con un proceso inflamatorio según la composición del infiltrado celular predominante.

Se determinará la intensidad del proceso inflamatorio según la norma ISO 10993-6 y para cada característica histológica se evaluará, la como formación de inflamación, la presencia de células polimorfonucleares, células gigantes, células plasmáticas y/o degradación de los materiales. El sistema de puntuación semicuantitativo utilizado será descrito en el informe de evaluación (15).

Ikarashi *et al.*, en el año 1992 y 2002, describieron sistemas de puntuación semi-cuantitativos (16,17). Es por eso que en la norma ISO 10993-6 se describen las tablas Anexo 2 y Anexo 3, que se puede convertir en un sistema de evaluación de implante tal como se describe en la Tabla Anexo 4 (15).

Plan de análisis

Para evaluar los grupos y tiempos de cada cemento se realizará la evaluación estadística mediante el uso de Pruebas No Paramétricas en el Programa STATA, versión 17.0 para Windows, calculándose las pruebas de Kruskal-Wallis (análisis de varianza con un solo criterio de clasificación). Para evaluar si existen diferencias entre los 3 grupos se aplicará U-Mann Whitney con la finalidad de comparar si existen diferencias entre pares. El nivel de significancia estadística será del 95% ($p < 0.05$).

Consideraciones éticas

Los procedimientos experimentales que se realizarán en este estudio serán revisados y aprobados por el Comité de Ética en Investigación Animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y tendrán que estar de acuerdo con los principios generales internacionales para la investigación biomédica con animales.

Los animales serán sacrificados mediante una sobre dosis (Triple Dosis) de Ketamina (Keta A 100 ®, 0.6 ml por cada 100 gramos de peso) y Xilazina (Dormixil ®, 0.3 ml por cada 100 gramos de peso) y siguiendo los parámetros del comité de

ética para animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en los tiempos establecidos: 48 horas, 15 días y 30 días (13). Una vez sacrificada la primera rata se procederá a realizar los cortes en bloques de tejido que contengan el tubo de teflón con un margen de seguridad de 1 cm aproximadamente, se hará la biopsia al tejido que contenga la muestra con la ayuda de una hoja de bisturí N° 11 en un mango N° 3 y pinzas de disección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nguyen TN. Obturation of the root canal system. In: Cohen S, Burns RC. *Pathways of the Pulp*. 4th ed. St Louis: Mosby; 1987.
2. Kim Y, Chang SW, Lee JK, Chen IP, Kaufman B, Jiang J, et al. A micro-computed tomography study of canal configuration of multiple-canalled mesiobuccal root of maxillary first molar. *Clin Oral Investig*. 2013;17:1541–6.
3. Chang SW, Lee JK, Lee Y, Kum KY. In-depth morphological study of mesiobuccal root canal systems in maxillary first molars: review. *Restor Dent Endod*. 2013;38:2–10.
4. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. *J Endod*. 2013;39:833–8.
5. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J*. 2002; 35:153–8.
6. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod*. 1993; 19:591–5.
7. Min KS, Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. *J Endod*.

- 2008; 34:666–70.
8. Silva RAB, Gatón-Hernández P, Pucinelli CM, Silva FWG de PE, Lucisano MP, Consolaro A, et al. Subcutaneous tissue reaction and gene expression of inflammatory markers after Biodentine and MTA implantation. *Braz Dent J.* 2022;33(1):41–56.
 9. Chang S-W, Lee S-Y, Kang S-K, Kum K-Y, Kim E-C. In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin apatite root sealer, MTA Fillapex, and iRoot SP root canal sealer. *J Endod.* 2014; 40(10):1642–8.
 10. Rubin E, Farber J. *Patología Básica*. Buenos Aires. Ed. panamericana 1990.
 11. Robbins F. *Patología estructural y funcional*. 3ed. México: Ed. Interamericana; 1987.
 12. Zmener O, Martínez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod.* 2012; 38(9):1233–8.
 13. Fuentes-Paredes F, Mendoza-Yanavilca R, Rosales-Fernández A, Cisneros Tarmeño R. *Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón*. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2010.
 14. American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 Edition. Consultado el 10 de julio del 2023. Disponible en: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
 15. International Organization for Standardization. ISO 10993-6. Biological

evaluation of medical devices-part 6: Tests for local effects after implantation. Consultado el 10 de julio del 2023. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/61089.html>

16. Ikarashi Y, Toyoda K, Ohsawa N, Uchima T, Tsuchiya T, Kaniwa M,. Comparative studies by cell culture and in vivo implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. *J Biomed Mater Res.* 1992;26(3):339-56.
17. Ikarashi Y, Tsuchiya T, Toyoda K, Kobayashi E, Doi H, Yoneyama T, et al. Tissue reactions and sensitivity to iron-chromium alloys. *Mater Trans.* 2002;43(12):3065-7

PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA

Presupuesto

Concepto	Cantidad	Precio unidad (S/.)	Precio total (S/.)
Adquisición y mantenimiento de animales	2	S/ 4 000.00	S/ 8 000.00
Análisis histológico	1	S/ 5 000.00	S/ 5 000.00
TOTAL (S/.)			S/ 13 000.00

Cronograma

Actividades	Agosto 2023	Septiembre 2023	Octubre 2023	Noviembre 2023	Diciembre 2023	Enero 2024
Presentación del protocolo	X					
Aceptación del protocolo	X					
Recojo de datos		X	X			
Procesamiento de datos				X		
Análisis de los resultados					X	
Informe final					X	
Presentación de resultados						X

ANEXOS

Anexo 1. Operacionalización de variables

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Tipo	Categoría Escala	Valores
Reacción Inflamatoria	Respuesta frente a las agresiones del medio, y está generada por los agentes inflamatorios	Conteo de células relacionadas con el proceso inflamatorio y que determina el tipo de inflamación	Cuantitativa	Politémica Ordinal	1: No irritante (conteo celular 0,0 - 2,9) 2: Irritante Leve (conteo celular 3,0 - 8,9) 3: Irritante Moderado (conteo celular 9,0 - 15,0) 4: Irritante Severo (conteo celular >15)
Sellador Endodóntico	Material utilizado para realizar la obturación tridimensional en un tratamiento de conductos	Material endodóntico que será colocado en tubos de teflón	Cualitativo	Dicotómica Nominal	1: Seal Apex 2: MTA Fillapex
Tiempos de evaluación	Número de horas y días que el investigador propone para la evaluación de la respuesta inflamatoria	Número de días que lleva el investigador para realizar el sacrificio de los animales	Cualitativo	Politémica Nominal	1: 48 horas 2: 15 días 3: 30 días

Anexo 2. Ejemplos de un sistema de evaluación histológica-Tipo de célula/respuesta

Tipo de célula/Respuesta	Score				
	0	1	2	3	4
Células polimorfonucleares	0	Rare, 1-5/phf ^a	5-10/phf ^a	Infiltrado Pesado	Lleno
Linfocitos	0	Rare, 1-5/phf ^a	5-10/phf ^a	Infiltrado Pesado	Lleno
Células plamáticas	0	Rare, 1-5/phf ^a	5-10/phf ^a	Infiltrado Pesado	Lleno
Macrófagos	0	Rare, 1-5/phf ^a	5-10/phf ^a	Infiltrado Pesado	Lleno
Células Gigantes	0	Rare, 1-5/phf ^a	5-10/phf ^a	Infiltrado Pesado	Lleno
Necrosis	0	Mínimo	Ligero	Moderado	Severo
^a phf = campo por alta potencia (400 ×).					

Anexo 3. Ejemplos de un sistema de evaluación histológica-Respuesta

Tipo de célula/Respuesta	Score				
	0	1	2	3	4
Neovascularización	0	Proliferación capilar mínima, 1-3, brotes focales	Grupos de 4-7 capilares con las estructuras de soporte de fibroblástico	Banda ancha de los capilares con estructuras de soporte	Banda extensiva de los capilares con estructuras de soporte de fibroblástico
Fibrosis	0	Banda Estrecha	Banda moderadamente gruesa	Banda Gruesa	Banda extensiva

Anexo 4. Ejemplo de un sistema de evaluación semi-cuantitativa

Muestra de prueba	Intervalo de implantación					
	Muestra de prueba			Muestra control		
Número Animal						
Células polimorfonucleares						
Linfocitos						
Células Plasmáticas						
Macrófagos						
Células gigantes						
Necrosis						
SUB-TOTAL (x2)						
Neovascularización						
Fibrosis						
SUB-TOTAL						
TOTAL						
TOTAL GRUPO	Irritante moderado					

III. CONCLUSIONES

Del presente trabajo de investigación se concluye que:

1. La correcta elaboración de un sílabo para un curso es de vital importancia para conseguir las competencias propuestas y elaboradas.
2. El análisis crítico de literatura estomatológica ha sido de gran importancia para verificar la calidad del nuevo conocimiento obtenido. La valoración del artículo de Silva RAB, Gatón-Hernández P, Pucinelli CM, Silva FWG de PE, Lucisano MP, Consolaro A, et al. del 2022 mediante las listas CRIS y AXIS demostró que cumplió con la mayoría de los ítems evaluados obteniendo así un gran valor a sus resultados.
3. El Proyecto de investigación tiene como objetivo evaluar in vivo la respuesta inflamatoria del tejido celular subcutáneo de ratas Holtzman frente a dos selladores de conductos radiculares. Esto nos podrá servir para saber que tipo de sellador endodóntico puede ser utilizado para realizar un tratamiento de conductos.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abou ElReash A, Hamama H, Abdo W, Wu Q, Zaen El-Din A, Xiaoli X. Biocompatibility of new bioactive resin composite versus calcium silicate cements: an animal study. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):194.
2. American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 Edition. Consultado el 10 de julio del 2023. Disponible en: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
3. Chang S-W, Lee S-Y, Kang S-K, Kum K-Y, Kim E-C. In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin apatite root sealer, MTA Fillapex, and iRoot SP root canal sealer. *J Endod*. 2014;40(10):1642–8.
4. Chang SW, Lee JK, Lee Y, Kum KY. In-depth morphological study of mesiobuccal root canal systems in maxillary first molars: review. *Restor Dent Endod*. 2013;38:2–10.
5. Downes MJ, Brennan ML, Williams HC, et al. Development of a critical appraisal tool to assess the quality of cross-sectional studies (AXIS). *BMJ Open* 2016;6:e011458.
6. Fuentes-Paredes F, Mendoza-Yanavilca R, Rosales-Fernández A, Cisneros Tarmeño R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima: Instituto Nacional de Salud;2010.
7. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human

- periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J.* 2002; 35:153–8.
8. Ikarashi Y, Toyoda K, Ohsawa N, Uchima T, Tsuchiya T, Kaniwa M,. Comparative studies by cell culture and in vivo implantation test on the toxicity of natural rubber latex materials. *J Biomed Mater Res.* 1992;26(3):339-56.
 9. Ikarashi Y, Tsuchiya T, Toyoda K, Kobayashi E, Doi H, Yoneyama T, et al. Tissue reactions and sensitivity to iron-chromium alloys. *Mater Trans.* 2002;43(12):3065–7
 10. International Organization for Standardization. ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices-part 6: Tests for local effects after implantation. Consultado el 10 de julio del 2023. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/61089.html>
 11. Khandelwal A, Janani K, Teja K, Jose J, Battineni G, Riccitiello F, et al. Periapical healing following root canal treatment using different endodontic sealers: A systematic review. *Biomed Res Int.*2022:3569281.
 12. Kim Y, Chang SW, Lee JK, Chen IP, Kaufman B, Jiang J, et al. A micro-computed tomography study of canal configuration of multiple-canal mesio Buccal root of maxillary first molar. *Clin Oral Investig.* 2013;17:1541–6.
 13. Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta M. CRIS Guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro

- studies in experimental dental research. *J Conserv Dent.* 2014;17(4):301–304.
14. Min KS, Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, et al. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. *J Endod.* 2008; 34:666–70.
 15. Nguyen TN. Obturation of the root canal system. In: Cohen S, Burns RC. *Pathways of the Pulp.* 4th ed. St Louis: Mosby; 1987.
 16. Plaza-Ruiz SP. Estudios transversales analíticos. En: Barbosa-Liz DM, Pineda-Vélez EL, Agudelo-Suárez AA. *Odontología basada en la evidencia: de la teoría a la práctica.* Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2020.
 17. Pucinelli CM, Silva RABD, Borges LL, Borges ATDN, Nelson-Filho P, Consolaro A, et al. Tissue Response after Subcutaneous Implantation of Different Glass Ionomer-Based Cements. *Braz Dent J.* 2019;30:599–606.
 18. Ricucci D, Grande NM, Plotino G, Tay FR. Histologic Response of Human Pulp and Periapical Tissues to Tricalcium Silicate-based Materials: A Series of Successfully Treated Cases. *J Endod.* 2020;46:307–317.
 19. Robbins F. *Patología estructural y funcional.* 3ed. México: Ed. Interamericana; 1987.
 20. Rodrigues C, Costa-Rodrigues J, Capelas JA, Fernandes MH. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. *J Endod.* 2013;39:833–8.
 21. Rubin E, Farber J. *Patología Básica.* Buenos Aires. Ed. panamericana 1990.

22. Seltzer, S. Endodontology. Biological consideration in endodontic procedures. New York: Mc Graw-Hill Company; 1971
23. Silva RAB, Gatón-Hernández P, Pucinelli CM, Silva FWG de PE, Lucisano MP, Consolaro A, et al. Subcutaneous tissue reaction and gene expression of inflammatory markers after Biodentine and MTA implantation. Braz Dent J. 2022;33(1):41–56.
24. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. J Endod. 1993; 19:591–5.
25. Zmener O, Martínez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. J Endod. 2012;38(9):1233–8.

V. ANEXOS

Anexo. Artículo empleado para el análisis crítico de literatura estomatológica

Brazilian Dental Journal (2022) 33(1): 41-56
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-6440202203562>

ISSN 0103-6440



Subcutaneous tissue reaction and gene expression of inflammatory markers after Biodentine and MTA implantation

Raquel Assed Bezerra Silva¹, Patricia Gatón-Hernandez², Carolina Maschietto Pucinelli¹, Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva¹, Marília Pacifico Lucisano¹, Alberto Consolaro^{1,3}, Rafaela Cardoso de Sá¹, Lisa Danielly Curcino Araujo¹, Manoel Damiano Sousa-Neto⁴, Léa Assed Bezerra Silva¹.

The aim of this study was to evaluate the subcutaneous connective tissue response of isogenic mice exposed to tricalcium silicate (Biodentine) and aggregated mineral trioxide (ProRoot MTA). A total of 120 mice were divided into 4 groups in 3 different experimental periods (7, 21 and 63 days): Biodentine; Pro-Root MTA; zinc oxide-eugenol and; Negative control - Sham. After the experimental periods microscopic descriptive, semi-quantitative and quantitative analysis of the inflammatory process were analyzed on H&E sections and evaluation of the gene expression of *IL10*, *Infγ*, *IL6*, *IL17* and *Tnf* (qRT-PCR) were performed. The data obtained were analyzed using the chi-square test and two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test (5% significance level). **Results:** In the microscopic analysis, a slight inflammatory infiltrate was observed, with a predominance of sparse macrophages and polymorphonuclear cells, slight tissue fibrosis, regular fibrous capsule and with dystrophic calcifications, in all groups that received the materials (Biodentine and Pro-Root MTA). In parallel, all materials modulated the gene expression of the different cytokines and receptors evaluated. **Conclusion:** Pro-Root MTA and Biodentine showed a tissue compatibility, mediated inflammation, with increased fibrous tissue and production of pro- and anti-inflammatory cytokines.

Introduction

Pulpotomy is a conservative endodontic procedure indicated for teeth that have extensive caries lesions, but without evidence of infection in the radicular pulp tissue, traumatic pulp exposure, in addition to the absence of spontaneous and persistent pain, abscess and fistula (1). The success rate of this treatment, when correctly indicated, varies between 90 to 100% (2).

The ideal biological response expected after pulpotomy is the formation of a mineralized tissue barrier over the remaining radicular pulp, protecting this tissue from additional irritating stimuli. This biological process depends on the correct execution of all operative phases, as well as the choice of a biological protective material, which presents tissue compatibility and repair capacity.

Mineral trioxide aggregate (MTA) has been recognized as the gold-standard material for conservative pulp vitality treatments, with high success rates (90%-100%) in clinical, radiographic, and histopathologic studies (3-5). The effect of MTA on pulpal tissue has certain similarities to that produced by calcium hydroxide. Its high pH generates a narrow zone of coagulation necrosis that is an initiator of a wound healing response. Next to that zone, a reparative dentin is formed. In addition to tissue compatibility and antibacterial properties, MTA induces a release of wound healing signals (growth factors) from dentin and promotes a very tight seal with the dentin walls due to a layer of hydroxyapatite created as a link, forming a physical and chemical bond between MTA and dentin (6). However, MTA has some disadvantages, such as long hardening time (2.75 hours), need for hydration during this period (7), and handling difficulties (8). Besides that, some brands offer a MTA with grey color, favoring a dental color change.

Currently, the search for biological materials has grown in Dentistry, in an attempt to promote an adequate repair process, without cytotoxic or irritating action to the organism. Biodentine™ (Septodont - St-Maur-des-Fossés - France), a cement based on tricalcium silicate, was introduced on the market and

¹ Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

² Department of Integrated Paediatric Dentistry, School of Dentistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

³ Department of Oral Pathology, Bauru Dental School, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

⁴ Department of Restorative Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Correspondence: Dra. Carolina Maschietto Pucinelli; Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida do Café s/n, Monte Alegre, 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brasil Phone: +55-16-3315-3995. Fax: +55-16-3633-0999.
e-mail: carolinamachietto@yahoo.com.br

Key Words: Pro-Root MTA; Biodentine; Immune-inflammatory response; Subcutaneous connective tissue; Cytokines.

has shown satisfactory results in clinical and laboratory researches (9), being able to stimulate the formation of tertiary dentin on the exposed pulp tissue (10). The main advantages of using Biodentine™ over MTA include ease of handling, high viscosity, shorter hardening time and better physical properties (11), besides presenting color stability (12).

Application of Biodentine on vital pulp tissue stimulates early formation of reparative dentin, resulting in complete dentin bridge, absence of an inflammatory pulp response and layers of well-arranged odontoblast-like cells (11). The interactions of Biodentine dental tissues lead to a marginal sealing, with bond strength to dentine compared to MTA, due to penetration of Biodentine into the dentin tubules forming tag-like structures and promoting a micromechanical retention (13). There is evidence for the positive effects of Biodentine on vital pulp cells due to its high biocompatibility, antibacterial properties and excellent bioactivity. However, the literature is still inconclusive in choosing the most reliable pulp capping material, highlighting the relevance of understanding the mechanisms that induce repair and mineralization of both materials. Although there are studies in the literature evaluating MTA and Biodentine™ (14), the study of the immune-inflammatory response is important, including the detection of pro and anti-inflammatory markers stimulated by these materials, to elucidate the mechanisms involved in the repair process and to support the clinical use.

Wound healing is a complex process involving different cellular, molecular and biochemical events. Briefly, healing response can be divided into three distinct but overlapping phases, being them inflammation, proliferation and maturation. Among the inflammatory reactions, local release of cytokines and growth factors plays important functions during the repair process. These molecules may have more than one specific effect on cells, depending on the local conditions. In addition, the responses are also mediated by cell surface receptors (15).

Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) and IL-6 are proinflammatory cytokines. TNF- α and IL-1 may lead to both activation of resident stromal and immune cells and recruitment of leukocytes, mostly neutrophils, from circulation with subsequent activation of phagocytosis and secretion of antimicrobial peptides. IL-6 was described as a mediator of inflammation and lymphocyte differentiation (16). Signaling pathway of IL-1 is associated with activation of a cascade characteristic of innate immunity Toll-like receptors, via the receptor complex IL-1R1.

Interferon- γ (IFN- γ) is considered a major mediator of macrophage inflammation, by inducing a dramatic increase in the production of inflammatory mediators (17). On the other hand, principal actions of IL-10 are primarily considered anti-inflammatory and inhibitory, targeting both innate and adaptive immune responses and playing immunosuppressive functions to reduce tissue damage caused by excess and uncontrolled inflammatory responses (18, 19).

Considering that wound repair is characterized by a well-orchestrated response, studying the behavior of the involved molecules, after biomaterials exposure, presents scientific and clinical relevance.

Thus, the objective of this study was to evaluate the tissue response, immune response and participation of pro- and anti-inflammatory cytokines induced by Biodentine™ and MTA materials in subcutaneous connective tissue of isogenic mice. The null hypothesis was that immuno-inflammatory reactions would not be different between MTA and Biodentine.

Material and methods

The design of the study was based on the ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) guidelines. Initially, the project was submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo (CEUA / FORP-USP) (Process Number 2015.1.890.58.4). Care for the welfare of animals followed the ethical standards and principles adopted by CEUA / FORP-USP and the Normative Resolutions of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), regulated by the Brazilian Federal Constitution. Tests were conducted as determined by ISO 10993-6: 2007.

Materials Preparation

The materials Biodentine™ (Septodont, Saint Maur des Fosses, France), Pro-Root MTA (Dentsply, Tulsa, USA) and zinc oxide-eugenol (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA., Ibitiporã, PR - Brasil) were handled according to their respective manufacturers in laminar flow for the maintenance of the aseptic chain. Thirty specimens of each material were prepared using as model a Teflon matrix (5 mm in height and 1.5 mm in diameter). The composition and manufacturer information of the materials are listed in Table 1.

Table 1. The composition and manufacturers of dental materials

Product/manufacturer	Composition
ProRoot MTA/ Dentsplay, Tulsa, USA	Tricalcium silicate (66.1%), dicalcium silicate (8.4%), tricalcium aluminate (2.0%), tetracalcium aluminoferrite, calcium sulphate bismuth oxide (14%), calcium oxide (8%), silicon oxide (0.5%), and aluminium oxide (1.0%)
Biodentine®/ Septodont, St. Maur des Fosses, FRANCE	Powder: tricalcium silicate (80.1%), dicalcium silicate, calcium carbonate (14.9%), iron oxide, and zirconium oxide (5%). Liquid: water, calcium chloride, and partially modified polycarboxylate
Zinc oxide-eugenol/ Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, Ibiaporã, PR – Brasil	Powder: Zinc Oxide Liquid: Eugenol, glacial acetic acid

Obtaining the Animals

A total of 120 isogenic male mice of the BALB/c strain, from 6 to 8 weeks of age, weighing an average of 20 grams, were purchased from the central animal facility of the University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil (USP). All animals were kept at the animal facility of the School of Dentistry of Ribeirão Preto - University of São Paulo, in polypropylene cages, with constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and relative humidity ($55 \pm 10\%$), in a 12:12 hour dark light cycle, with standard food and free access to water.

In vivo study of subcutaneous tissue reaction in mice

After a week of acclimation, the animals were anesthetized with intramuscular injection of ketamine 10% (Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) and 2% xylazine (Dopaser, Laboratorios Calier, SA, Barcelona, Espanha) in the proportion of 0.2 mL/kg and 0.8 mL/kg, respectively, immediately before the surgery. Then, trichotomy on the animal's back and antiseptics of the region with 1% chlorhexidine digluconate was performed. The incision was made with sterilized surgical scissors in the dorsal region, with a size of 1 cm, followed by divulsion. After positioning the specimen inside the tissue, the skin was sutured using silk suture (Vicryl 4-0, Ethicon, Johnson & Johnson). The animals were kept at animals' facility at School of Dentistry of Ribeirão Preto - USP, during the experimental periods, with food and water *ad libitum*.

The experimental groups were divided according to the material inserted in the subcutaneous tissue of each animal. The distribution of groups, materials used, number of animals and experimental periods are shown in Table 2.

Table 2. Distribution of experimental groups, materials used, number of animals and experimental periods

Group	Material	Animals per period	Experimental Periods
Experimental	Biodentine™	n=10	7, 21 e 63 days
Experimental	MTA	n=10	7, 21 e 63 days
Experimental	Zinc oxide-eugenol	n=10	7, 21 e 63 days
Negative control	Surgical procedure only (<i>sham</i>)	n=10	7, 21 e 63 days

At the end of each experimental period (7, 21 and 63 days), the animals were euthanized by anesthetic overdose. The connective tissue block containing the specimen with the material was removed with surgical scissors and divided into two parts. The upper part, the tissue was removed, fixed in 10% formaldehyde and sent for routine histotechnical processing for further microscopic analysis of H&E stained sections. The lower part of the connective tissue block containing the specimen with the material was immersed in an RNAlater® solution (Ambion™, Carlsbad, CA, USA) for further analysis of gene expression using the qRT-PCR technique.

Histotechnical processing and microscopic evaluation

The set containing the specimen of the tested material, the surrounding portion of the subcutaneous connective tissue and the skin were removed with sterile surgical scissors, fixed by immersion in 10% buffered formalin for 24 hours at room temperature and then washed for approximately 4 hours in running water. Using a needle, the specimens were gently removed from the subcutaneous tissue. Then, the pieces were subjected to routine histotechnical processing, as described in the study by Pucinelli *et al.*, (20) and included in paraffin.

Semi-serial sections of 5µm (10 to 15 slides with 2 cuts per slide), with intervals of 15µm, were obtained over the entire tissue. Then, the sections were stained with HE, and submitted to analysis under a conventional optical microscope Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), with attached AxioCam MRc5 camera (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany). All analyzes were performed by a single experienced evaluator, without previous knowledge of the group to be analyzed. Three regions of each section were evaluated and the average field was always the chosen field.

Descriptive microscopic analysis

A qualitative description of the histopathological events observed in the reaction tissue in contact with the tested materials or in the control group (Sham) was performed in each experimental period (7, 21 and 63 days).

Semi-quantitative microscopic analysis

In the tissue peripheral to the tested material, phenomena related to the fibrous and inflammatory infiltrate of the tissue adjacent to the evaluated materials were observed, according to the following criteria described by our research group previously (20):

- Collagen Fiber Formation: The number and density of collagen fibers in the reaction tissue surrounding the evaluated materials were analyzed and the score description is described in Table 3.
- Inflammatory infiltrate: The density of polymorphonuclear (PMN) surrounding the reactional tissue adjacent to the evaluated materials was analyzed and the score description is described in Table 4.

Table 3. Collagen Fiber Formation scores description

Analysis	Scores	Fibrosis Classification	Description
Collagen Fiber Formation	0	Absent	Absence of collagen fiber formation
	1	Mild	The collagen fibers were individualized just like normal connective tissue, interspersed with negative spaces indicative of non-fibrous components of extracellular matrix
	2	Moderate	Some areas the collagen fibers were individualized, but with alternating areas of eosinophilic extracellular matrix without linear and undulate formations
	3	Intense	The collagen fibers are present in the middle of an extracellular eosinophilic matrix, without typical linear and undulate formations, not allowing its individual observation

Table 4. Inflammatory infiltrate score description

Analysis	Scores	Fibrosis Classification	Description
Inflammatory infiltrate	0	Absent	Absence of inflammatory infiltrate
	1	Mild	1 to 10 PMN were observed in the reactional tissue
	2	Moderate	11 to 20 PMN were observed in the reactional tissue
	3	Intense	More than 21 PMN were observed in the reactional tissue.

PMN: polymorphonuclear

Quantitative microscopic analysis

The Figure 1 is a representative image describing the measurement of the fibrous capsule thickness. It was measured in images obtained from 3 regions of each section, using 3 sections per specimen, in a 10 × magnification. The software used was AxioVision Rel, v 4.8, Carl Zeiss MicroImaging GmbH using the "measures" tool. The results were expressed in μm.

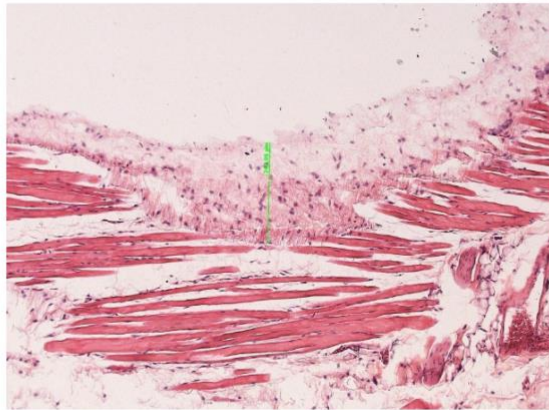


Figure 1. Representative image of the measurement of the fibrous capsule thickness in the subcutaneous tissue of mice, after implantation with Biodentine™, MTA, Zinc oxide-eugenol and from the Sham group (10 × magnification).

Evaluation of gene expression - qRT-PCR (Real Time Polymerase Chain Reaction)

To perform the qRT-PCR analysis, the pieces carrying the lower part of the set containing the piece of the tested material and the surrounding portion of the subcutaneous connective tissue were used. The pieces were removed and dipped in a solution of RNAlater® (Ambion™, Carlsbad, CA, EUA) for subsequent performance of qRT-PCR to detect messenger RNA for cytokines *Il10*, *Infg*, *Il6*, *Tnf* and receptor *Il1r1*. Total RNA was extracted using the column method, using a method based on guanidine thiocyanate (RNEasy, Qiagen Inc.). Then, reverse transcription was performed for the synthesis of complementary DNA (cDNA) and, finally, the polymerase chain reaction. Primers and probes for *Il10* (Mm00439614), *Infg* (Mm01168134), *Il6* (Mm00446190), *Il1r1* (Mm00434237) and *Tnf* (Mm00443258) were obtained commercially and are private properties, therefore the nucleotide sequences are not available (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*Gapdh*; Hs 138400) was used as a reference. The qRT-PCR reactions were performed in duplicate, using the StepOne Plus (Applied Biosystems) device.

Amplification was carried out under the following conditions: activation of the AmpliTaq Gold Enzyme polymerase at 95°C for 2 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 1 second for DNA denaturation and 60°C for 15 seconds for primer annealing and polymerization. The results were analyzed based on the value of the threshold cycle (Ct, *cycle threshold*). As a negative control, deionized distilled water was used, subjected to the reaction with each pair of primer and probe sequences used. For each gene, the calculation of the relative expression was performed from the difference between the ΔCt of the samples and the ΔCt presented by the control ($\Delta\Delta Ct$), based on the equation: $Relative\ expression = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Statistical analysis

Semi-quantitative data were compared using the Kruskal-Wallis test and the Dunn post-test. Quantitative data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-test. The level of significance adopted was 5%. All analyzes and graphic representations were performed using the GraphPad Prism 7 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Results

Descriptive Microscopic Analysis

Biodentine™

Figure 2 is a representative image of the tissue response observed in the subcutaneous conjunctive tissue at 7 (A, B), 21 (C, D) and 63 (E, F) days after implantation of the Biodentine™ cylinder. In the 7-day experimental period, the formation of a disorganized fibrous membrane and great infiltration of polymorphonuclear and macrophages are observed. In this area, either focally or just below the reaction tissue, basophilic degeneration of the tissue was noted, characterized by the loss of cell boundaries with purple coloration of the intercellular spaces. Isolated points of dystrophic calcification were also observed.

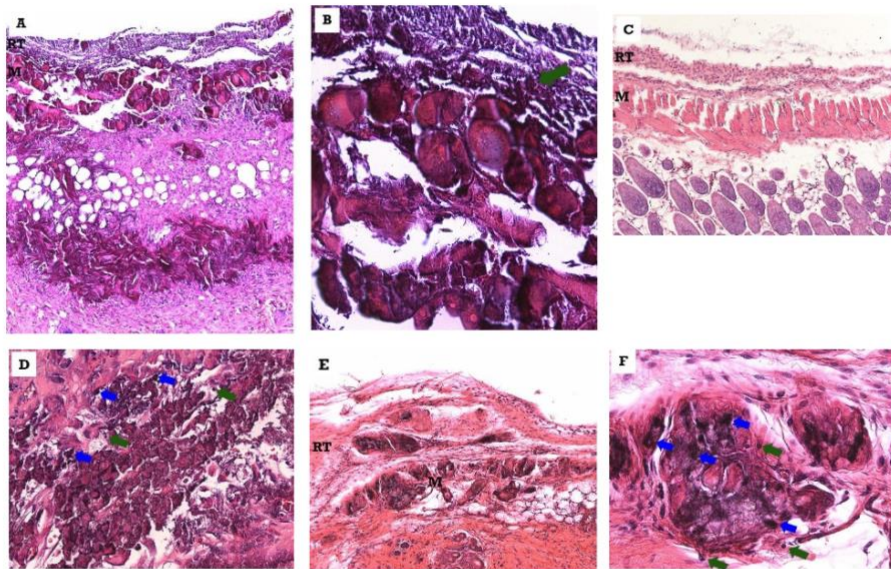


Figure 1. Representative image of the measurement of the fibrous capsule thickness in the subcutaneous tissue of mice, after implantation with Biodentine™, MTA, Zinc oxide-eugenol and from the Sham group (10 × magnification).

At 21 days, at the interface around the material, the reaction tissue showed a degree of slight fibrous and mixed inflammatory infiltrate composed of macrophages and polymorphonuclear cells, ranging from mild to moderate. The thickness of the reaction tissue was uniform and the organizational structure was rudimentary. In the most peripheral part of the material, the connective tissue showed many basophilic formations, indicating the presence of dystrophic calcifications.

At 63 days, the reactional tissue presented with slight fibrous and mild mononuclear inflammatory infiltrate, predominantly macrophage and with eventual randomly dispersed polymorphonuclear cells. The thickness of the capsule formed was uniform. Many dystrophic calcifications have been found on the periphery of the reaction tissue.

Pro-Root MTA

Figure 3 shows the tissue response in the subcutaneous conjunctive tissue at 7 (A, B), 21 (C, D) and 63 (E, F) days after implantation of the Pro-Root MTA cylinder. At 7 days, a uniform tissue reaction was observed, with a slight degree of fibrous. The intensity of the infiltrate varied, in some specimens, from moderate to intense and, in others, from mild to moderate. Despite the macrophage predominance, polymorphonuclear cells were common. In two specimens, particles of material surrounded by the reaction tissue were observed.

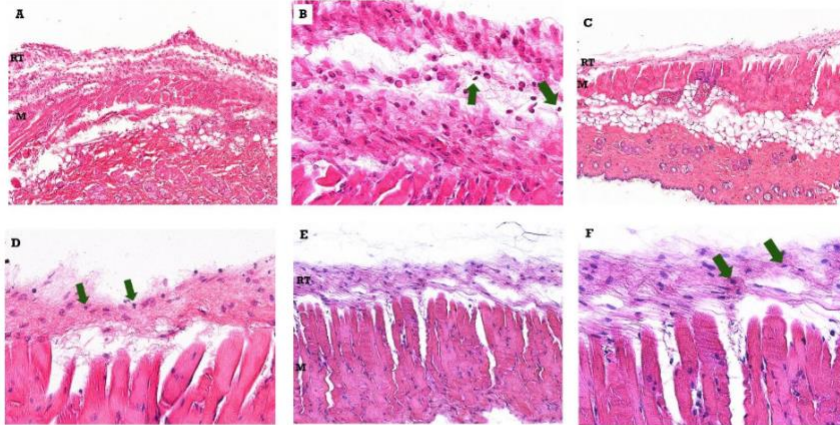


Figure 2. Representative photomicrographs of the tissue response observed in the subcutaneous connective tissue of mice after implantation of the Biodentine™ cylinder (10 x and 40 x magnifications) Blue arrow – PMN and Green arrow – macrophages. M – muscle, RT – reactional tissue. (A) – After 7 days were observed a disorganized fibrous membrane. Also, focally or just below the reaction tissue, basophilic degeneration of the tissue was noted, characterized by the loss of cell boundaries with purple coloration of the intercellular spaces. (B) – Detail in 40 x of (A) showing a polymorphonuclear and macrophages infiltration. (C) – After 21 days were observed a mixed inflammatory infiltrate composed of macrophages and polymorphonuclear cells, with the thickness of the reactionary tissue uniform and a rudimentary organization. The connective tissue showed many basophilic formations, indicating the presence of dystrophic calcifications. (D) – Detail of (C) in 40 x. (E) – After 63 days were observed a mild mononuclear inflammatory infiltrate, predominantly macrophage and with eventual randomly dispersed polymorphonuclear cells. The thickness of the capsule formed was uniform. Many dystrophic calcifications have been found on the periphery of the reaction tissue

At 21 days, there was an increase in the degree of fibrous reaction tissue. The predominantly mononuclear inflammatory infiltrate varied from mild to moderate with occasional polymorphonuclear cells. In two specimens, dystrophic calcification was noted on the periphery of the reaction tissue.

At 63 days, the thickness of the reaction tissue was markedly thin and regular with few leukocytes infiltrating the structure. The collagen fiber formation, in some cases, was moderate. In two specimens, dystrophic calcification was observed on the periphery of the reaction tissue.

Zinc oxide-eugenol

Figure 4 is a representative image of the tissue response observed in the mice subcutaneous connective at 7 (A, B), 21 (C, D) and 63 (E, F) days after implantation of the Zinc Oxide-Eugenol cylinder (ZOE). In the 7-day period, a peripheral reaction tissue with reduced collagen density and edema was observed, with predominantly macrophage inflammatory infiltrate and with a marked presence of polymorphonuclear cells, especially of the neutrophil type, although occasionally eosinophils were observed. The thickness was uniform throughout the length of contact with the material.

At 21 days, the reaction tissue formed a very thin and uniform capsule in thickness, with slight fibrous tissue and a discrete mononuclear infiltrate predominantly macrophage. Neutrophils and eosinophils were eventually observed.

The main characteristic in the 63-day experimental period with regard to zinc oxide-eugenol was the thin thickness of the reaction tissue and the reduced amount of inflammatory cells characterized by macrophages and polymorphonuclear cells.

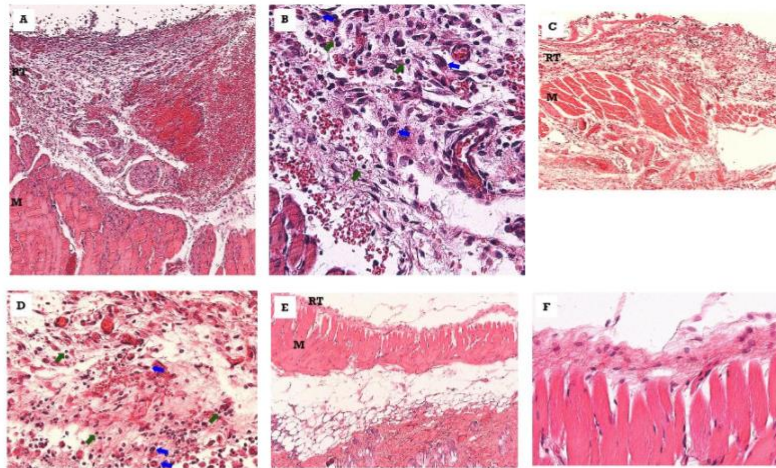


Figure 4. Representative photomicrographs of the tissue response observed in the subcutaneous connective tissue of mice after implantation of the zinc oxide-eugenol (ZOE) cylinder (10 x and 40 x magnifications) Blue arrow – PMN and Green arrow – macrophages. M – muscle, RT – reactional tissue. (A) – After 7 days were observed a reduced collagen density and edema was observed, with predominantly macrophage inflammatory infiltrate and with a marked presence of polymorphonuclear cells. (B) – Detail in 40 x of (A). (C) – At 21 days, were observed a mononuclear infiltrate predominantly macrophage, PMN were eventually observed. (D) – Detail in 40 x of (C). (E) – After 63 days, were observed a thin thickness of the reaction tissue and the reduced amount of inflammatory cells characterized by macrophages and polymorphonuclear cells.

Sham

Figure 5 is a representative image of the tissue response observed in the subcutaneous conjunctive of mice at 7 (A, B), 21 (C, D) and 63 (E, F) days after the surgical procedure (sham).

At 7 days, the connective tissue was markedly loose and infiltrated by eventual mononuclear leukocytes. The tissue structure was delicate and no edema was observed.

At 21 days, the Sham group revealed a slight increase in the thickness of the reaction tissue when compared to specimens from the 7-day period. There was no inflammatory infiltrate or edema.

At 63 days, the reaction tissue in the area was thin, well-organized and discretely fibrous, with no edema or local infiltration by leukocytes.

Semi-quantitative Microscopic Analysis

Collagen Fiber Formation (Figure 6)

At 7 days, all groups (Biodentine™, Pro-Root MTA, ZOE and sham) induced a slight fibrous connective tissue around the implant ($p > 0.05$).

At 21 days, the fibrous became greater around the Pro-Root MTA and the specimens of the sham group. These experimental groups showed a statistically significant difference when compared to the Biodentine™ and ZOE groups ($p < 0.05$), which remained with slight fibrosis.

At 63 days, all groups showed slight fibrosis in most specimens ($p > 0.05$).

Inflammatory infiltrate (Figure 6)

At 7 days, Biodentine™, Pro-Root MTA and ZOE induced the recruitment of inflammatory cells of moderate to intense acuteness to the subcutaneous connective tissue around the implant, unlike the sham group that had a mild inflammatory infiltrate. This response was more intense for Biodentine™ and Pro-Root MTA, which showed a statistically significant difference when compared to the ZOE and sham group ($p < 0.05$).

At 21 and 63 days, most specimens remained with a discrete infiltrate ($p > 0.05$).

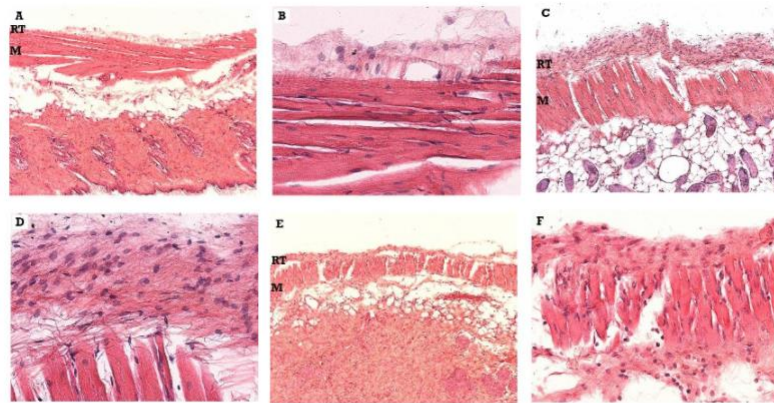
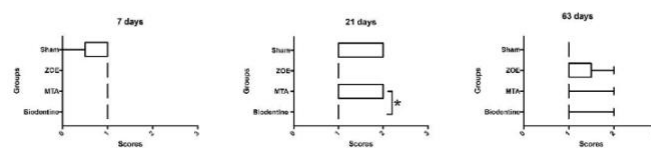


Figure 5. Representative photomicrographs of the tissue response observed in the subcutaneous connective tissue of mice after performing the experimental surgical procedure without implantation of the material (sham) (10 x and 40 x magnifications) Blue arrow – PMN and Green arrow – macrophages. M – muscle, RT – reactional tissue. (A) – After 7 days were observed a delicate tissue structure and no edema was observed. (B) – Detail in 40 x of (A). (C) – At 21 days, were observed a slight increase in the thickness of the reaction tissue, also no inflammatory infiltrate or edema. (D) – Detail in 40 x of (C). (E) – After 63 days, the reaction tissue in the area was thin, well-organized and discretely fibrous, with no edema or local infiltration by leukocytes.

Collagen Fiber Formation



Inflammatory Infiltrate

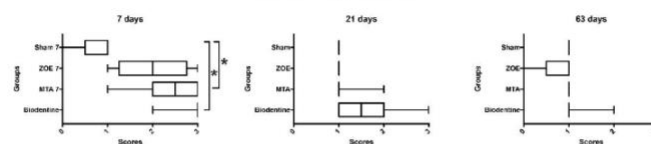


Figure 6. Graphical representation of the collagen fiber formation and inflammatory infiltrate scores around the implanted material, at 7, 21 and 63 days after implantation in the subcutaneous tissue of mice. Values expressed in micrometers for specimens from the Biodentine™, Mineral trioxide aggregate (MTA), Zinc oxide-eugenol (ZOE) groups and experimental surgical procedure without implantation (sham). * $p < 0.05$

Quantitative Microscopic Analysis

Thickness of the fibrous capsule (Figure 7)

At 7 days, the thickness of the fibrous capsule was increased around the Biodentine™ and ZOE specimens, compared to the sham and Pro-Root MTA groups ($p < 0.05$). In the periods of 21 and 63 days, the tissue around the materials did not increase in thickness and was similar to the sham group ($p > 0.05$).

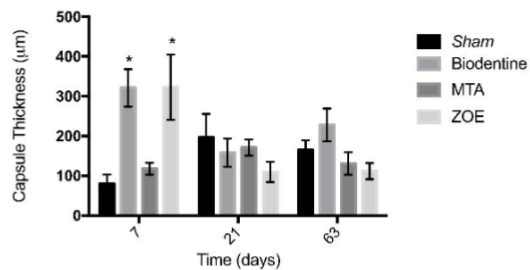


Figure 7. Graphical representation of the thickness of the fibrous capsule around the implanted material, at 7, 21 and 63 days after implantation in the subcutaneous tissue of mice. Values expressed in micrometers for specimens from the Biodentine™, Mineral trioxide aggregate (MTA), Zinc oxide-eugenol (ZOE) groups and experimental surgical procedure without implantation (sham). * $p < 0.05$

Evaluation of Gene Expression (Figure 8)

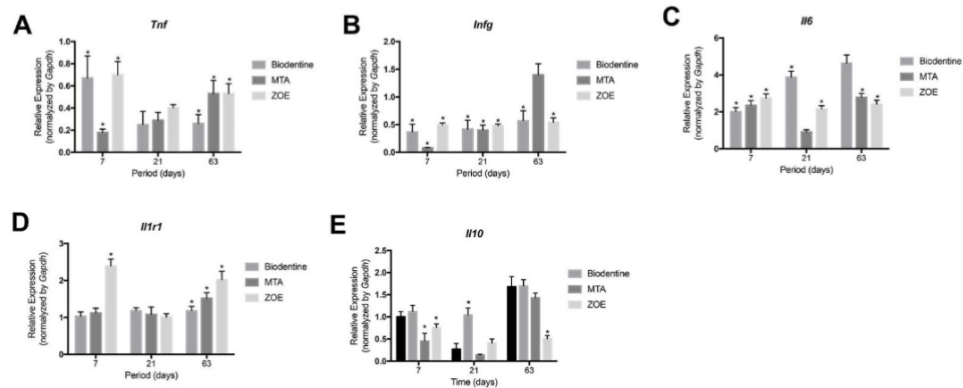


Figure 8. Graphical representation of the gene expression related to *Tnf* (A), *Infg* (B), *Il6* (C), *Il1r1* (D) e *Il10* (E) for specimens from the Biodentine™, Mineral trioxide aggregate (MTA), zinc oxide and eugenol (ZOE) groups and experimental surgical procedure without implantation (sham), at 7, 21 and 63 days after implantation in the subcutaneous tissue of mice. * $p < 0.05$ compared to the sham group.

Tnf

At 7 days, Biodentine™, Pro-Root MTA and ZOE inhibited *Tnf* expression ($p < 0.05$), but showed no effect at 21 days ($p > 0.05$). At 63 days, again Biodentine™, Pro-Root MTA and ZOE inhibited *Tnf* expression ($p < 0.05$). The greatest inhibition of gene expression occurred in subcutaneous connective tissue in contact with Pro-Root MTA, at 7 days, and with Biodentine™ at 63 days.

Infg

At 7 and 21 days, Biodentine™, Pro-Root MTA and ZOE inhibited *Infg* expression ($p < 0.05$). This inhibition was maintained until 63 days for Biodentine™ and ZOE ($p < 0.05$), but it was not modulated by the Pro-Root MTA in that period ($p > 0.05$). The greatest inhibition occurred in contact with Pro-Root MTA at 7 days and with Biodentine™ and ZOE at 63 days, with no statistical difference between them ($p > 0.05$).

Il6

At 7 days, Biodentine™, Pro-Root MTA and ZOE induced the expression of *Il6* ($p < 0.05$). This induction was maintained until 21 days for Biodentine™ and ZOE ($p < 0.05$), but it was not modulated by

Pro-Root MTA in that period ($p > 0.05$). At 63 days, Pro-Root MTA and ZOE inhibited IL6 while Biodentine™ had no effect on gene modulation ($p > 0.05$).

Il1r1

At 7 days, ZOE induced the expression of IL1r1 ($p < 0.05$) while Biodentine™ and Pro-Root MTA had no effect ($p > 0.05$). At 21 days, no material modulated gene expression ($p > 0.05$), unlike the 63-day period, when Biodentine™, Pro-Root MTA and ZOE induced IL1r1 ($p < 0.05$).

Il10

At 7 days, Pro-Root MTA and ZOE inhibited the expression of IL10 ($p < 0.05$) and Biodentine™ had no effect ($p > 0.05$). At 21 days, Pro-Root MTA and ZOE had no effect ($p > 0.05$) while Biodentine™ induced IL10 ($p < 0.05$). At 63 days, ZOE inhibited IL10 ($p < 0.05$), while Pro-Root MTA and Biodentine™ had no effect ($p > 0.05$).

Summary of the outcomes observed in each group

Biodentine

At 7 days, this group presented a disorganized and thicker fibrous membrane, inflammatory cells (neutrophils and macrophages), punctual dystrophic calcifications, inhibition of TNF- α , INF- γ and increased expression of IL-6.

At 21 days, the findings were slight fibrous tissue, with rudimentary organizational structure, mild to moderate mixed inflammatory infiltrate, presence of dystrophic calcifications, inhibition of INF- γ , continued increased expression of IL-6 and IL-10.

At 63 days, it was observed a uniform and slight fibrous capsule, mild mononuclear inflammatory infiltrate, many dystrophic calcifications, significant inhibition of TNF- α , INF- γ , continued increased expression of IL-6, slight increased expression of IL1r1 and continued increased expression of IL-10 (but similar to the sham).

Pro-Root MTA

At 7 days, this group presented a uniform tissue reaction with slight fibrous, a predominantly macrophage inflammatory infiltrate, significant inhibition of TNF- α , INF- γ , and IL-10 and increased expression of IL-6.

At 21 days, there were an increase in the degree of fibrous reaction tissue, mild to moderate predominantly mononuclear inflammatory infiltrate, inhibition of INF- γ and reduced expression of IL-6 and IL-10, similar to sham.

For 63 days, this group showed a thin reaction tissue, with collagen fiber formation and few leukocytes, inhibition of TNF- α and IL-6, increased expression of INF- γ and IL-10 (but similar to the sham) and increased expression of IL1r1.

Zinc oxide-eugenol

At 7 days, this group presented a uniform and thicker fibrous tissue, with edema, reduced collagen density and inflammatory cells (neutrophils and macrophages), inhibition of TNF- α , INF- γ and IL-10, and considerable increased expression of IL-6 and IL1r1.

At 21 days, it was observed a uniform, thin and slight fibrous capsule, few macrophages, inhibition of INF- γ , increased expression of IL-6 and reduced expression of IL-10, similar to sham.

At 63 days, the findings were a thin reaction tissue, reduced amount of inflammatory cells, inhibition expression of TNF- α , IL-6, being significant for INF- γ and IL-10 and increased expression of IL1r1.

Discussion

The null hypothesis of the study should be rejected since some immune-inflammatory reactions were different between MTA and Biodentine.

To be used directly in pulp tissue, any dental material must have adequate physical and mechanical properties and satisfactory biological properties. Thus, tissue compatibility tests are essential (21) and for that several methodologies can be used, among them, the evaluation of the *in vivo* tissue subcutaneous response of isogenic mice stands out (20). This method allows a detailed assessment of the

characteristics of the reaction tissue and provides sufficient information about inflammatory and immune responses, elucidating the mechanisms of action of the evaluated materials.

Experimental periods of 7, 21, and 63 days were selected based on previous study from our research group that evaluated tissue response after subcutaneous implantation of different materials (20). According to International Organization for Standardization (number 10993-6:2007), where there is no or minimal degradation, local tissue responses shall be evaluated at 1 week to 12 weeks after implantation. During the first two weeks after implantation, the reaction due to the surgical procedure itself may be difficult to distinguish from the tissue reaction evoked by the implant. In muscle and connective tissues, depending on the species, and the severity of the surgical trauma, a steady state is seen in the cell population after 9 weeks to 12 weeks (ISO 10993-6: 2007). Then, the periods of 7, 21 and 63 days comprise an initial acute response, an intermediate period without interference from the surgical procedure and a long-term chronic response to the materials. In addition, beyond the tissue response to the associated trauma of surgery, the local biological reaction depends on the properties of the materials and the test period shall be determined by the likely clinical exposure time, be continued until, or beyond a steady state has been reached with respect to the biological response. Considering that reparative dentinogenesis is a complex defense and healing pulp response, involving genes expression, signaling pathways activation and tissue mineralization and that both materials will remain reacting with the pulp tissue for a long period, the time points selected are justified. For a material to be considered suitable from a biological point of view, its toxicity must be low or zero. Tissue compatibility of MTA and Biodentine was confirmed by the present results, as supported by literature. Accordingly, the absence of cytotoxic effects is demonstrated in stem cells and odontoblasts (22) and these biomaterials were well tolerated by the subcutaneous connective tissues in the 60-day evaluation period (23).

As for inflammation, it is known that it is an essential process for tissue repair, and is even considered as the initial stage of repair, along with coagulation, followed by resolution of the inflammation and ended by revascularization (24). Thus, it is acceptable for a biocompatible material to trigger an inflammatory response in the initial evaluation periods (25), but this must be a controlled event and of mild magnitude. The results of the present study for ProRoot MTA and Biodentine® are consistent with recent findings that showed similar moderate inflammatory tissue response on day 7 and that inflammatory cell numbers decreased over time for both biomaterials (23).

The recognition of an offending agent triggers the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines capable of attracting inflammatory cells to the region, such as neutrophils and macrophages (21, 26), and to stimulate the migration of undifferentiated pulp cells to the pulp lesion site (27), being able to differentiate into odontoblasts, thus forming a restorative barrier to dentin (28). Thus, the study of inflammatory markers such as cytokines and interleukins are extremely important for understanding the tissue repair process of the dental pulp. They are modulators of immune and inflammatory responses, and can play a pro- or anti-inflammatory role, or both, depending on the cells and tissues analyzed (29), and can favor the worsening of inflammation or the repair process.

In agreement with the present findings, previous studies have shown that Biodentine™ is capable of promoting an initial inflammatory reaction, which becomes discreet in a short time (30). The fibrous capsule is an important inflammatory marker (31), as the materials can release proinflammatory substances, which stimulate the maintenance of the capsule as an attempt of the body to isolate that material (32). In the present study, it was observed that Biodentine™ initially stimulated the formation of a thicker fibrous capsule than Pro-Root MTA and the sham group, but it was not statistically different from the group induced by zinc oxide-eugenol. However, with time, this thickness decreased and it was no longer possible to observe a difference with the other experimental groups.

Initially, Biodentine promoted a more intense reaction in comparison with MTA, showing a tendency for higher expression of TNF- α , INF- γ and IL-10. Except for IL1r1, gene expression induced by Biodentine had a certain similarity to that induced by ZOE, mainly with regard to neutrophil and macrophages activating cytokines (TNF- α and INF- γ), confirming the initial stimulatory effect. This result correlates with histological analysis that evidenced a great infiltration of inflammatory cells at 7 days. With the presence of macrophages and the release of chemical mediators, migration and activation of fibroblasts is intensified, which may explain in part the thicker fibrous membrane observed in the Biodentine group. In parallel, expression of IL-10 was similar to the sham group and higher than MTA and ZOE, indicating that the initial response to Biodentine involves a protective function. The expression of IL-10 remained increased at 21 and 63 days.

Interleukin-6 is an activator of the immune system, playing a pivotal role during the transition from acute to chronic inflammation and acquired immunity (33). Although similar to MTA at 7 days, expression of IL-6 was higher in relation to sham group, corroborating the initial intense reaction promoted by Biodentine.

Regarding MTA, a study by Cintra et al. (34) found that at 7 days, MTA induced an inflammatory response ranging from mild to moderate, which did not persist over time. Da Fonseca et al. (30) evaluated the inflammatory process caused by MTA and Biodentine™, by measuring the number of inflammatory cells present in the connective tissue of rats, in sections stained with HE, and the numerical density of cells immunized with *Il6*. An inflammatory reaction initially induced by Biodentine™ was observed, compared to MTA. After 15 days, there was a significant reduction in the number of inflammatory cells and immunoreaction of *Il6* for both groups. According to Giraud et al. (35), Biodentine™ provided less expression of *Il6* throughout the inflammatory process. In the present study, both Biodentine™ and Pro-Root MTA were able to stimulate *Il6* expression in the initial periods. However, we observed that in the last evaluated period of 63 days, Pro-Root MTA inhibited the expression of this cytokine, which did not happen with Biodentine™, partially disagreeing with previous reports. Interleukin (IL)-6 has different biological effects and can act as a mediator of the host's response after injury and tissue infection, especially because it has activity in the regulation of adhesion molecules, inducing angiogenesis and increasing vascular permeability and inflammatory edema (36).

Similar result in IL-6 expression occurred only for MTA at 21 and 63 days, while Biodentine remained this expression increased in all experimental periods, being higher than MTA, mainly at 21 days.

The intermediate period of 21 days did not show relevant findings for pro-inflammatory markers differing both materials (*TNF- α* , *INF- γ* and *Il1r1*). On the other hand, expression of IL-6 and IL-10 was markedly higher for Biodentine, in comparison with MTA.

According to the present findings, it can be inferred that MTA plays a mechanism that inhibits the inflammatory response, since this material evidenced a significant reduction in the expression of the proinflammatory markers *Tnf* and *Inf γ* at 7 days, although without statistical difference from Biodentine. On the other hand, the inhibition of *Il-10* expression in the initial periods by MTA can demonstrate an indirectly pro-inflammatory response that stimulates tissue repair (37).

Gamma interferon (IFN- γ) is a cytokine that has important inflammatory properties, acting as a trigger for macrophages to produce and release inflammatory mediators such as reactive oxygen species (36). In 2013, Elsalhy and collaborators (36) observed high levels of IFN- γ in the pulps of teeth affected with caries lesions, as well as pulps that presented irreversible pulpitis, thus presenting their immunomodulatory and inflammatory effects.

At final period (63 days), the inhibition of IFN- γ was kept only for Biodentine, while MTA had a higher expression similarly to the sham group, suggesting a participation of macrophages and their mediators in tissue repair promoted by MTA at late stages, likely related to fibrous formation.

The IL-10 is considered an antiinflammatory cytokine, being the main inhibitor of proinflammatory mediator synthesis and macrophage activity (35,38). Its expression was elevated for MTA and Biodentine at 63 days, demonstrating that both biomaterials are able to modulate the inflammatory process and to stimulate tissue repair, corroborating previous evidences (21,23).

Interestingly, the materials increased the expression for *Il1r1* at the final stage, while this marker did not show relevant changes at 7 and 21 days in response to MTA and Biodentine. This high expression can be explained by the recognition of a foreign material by the tissue defense system during the repair process. IL-1 receptor (*Il1r1*) mediates almost all IL-1 actions (39), being found in a large variety of cells of innate immune system as well as selective T cell populations in the adaptive immune system. Evidence indicates that IL-1 family members play role in innate and adaptive lymphoid cell differentiation and function (40). It has been reported that lymphoid cells may act limiting inflammation and supporting tissue repair and wound healing mechanisms during the resolution phase of immune responses against certain pathogens and insults (41). Then, our findings of stimulated expression of *Il1r1* at the chronic stage can be supported by this evidence.

When properly indicated, cases treated with MTA and Biodentine™ can achieve a success rate of 84.6% and 92.3%, respectively (42). This success rate may be associated with the mechanism of action of both materials, being considered bioactives. Calcium hydroxide is the common product resulting from the tissue reaction, which has two important physiological properties: 1- release of calcium ions, fundamental for cell adhesion and proliferation; and 2- alkalization of the medium, generating an antibacterial environment, modulating the production of cytokines, inducing differentiation and migration of cells producing dentinal and bone-dentin tissue, and stimulating the formation of dentin

bridge (43). Consistent with the literature (44), the mineralizing potential of Biodentine™ and Pro-Root MTA was confirmed in the present study, after microscopic evidence of many basophilic formations, compatible with dystrophic calcifications, in the most peripheral portion of the connective tissue. In agreement with our findings, Karabulut et al. (23) evidenced the presence of dystrophic calcification in the connective tissue adjacent to the Biodentine® and ProRoot MTA. The bioactivity of both materials was also confirmed by alkaline pH, capacity to release calcium ions and precipitation of apatite crystalline structures over cement and dentin substrates (45). These results together provide a solid foundation for the capacity of the Biodentine® and ProRoot MTA to induce the formation of high-quality mineralized tissue for regeneration of the dentin-pulp complex.

In general, the results of the present study allow elucidating the repair inducing mechanisms stimulated by Biodentine™ and Pro-Root MTA. Knowledge gained from studying the cytokine interactions and influences provides a better understanding of the complex orchestrated events involved in dentin bridge formation by both biomaterials. However, direct extrapolations to clinical conditions must be exercised with caution because of obvious limitations of preclinical animal studies. Although these materials have been previously studied, new researches must be performed regarding the mechanism of Biodentine™ and Pro-Root MTA during the repair process. More precise molecular biology techniques could be adopted in order to evaluate molecular aspects. These studies would favor the improvement of these materials, and may increase the effectiveness and specificity.

According to the results obtained, it was concluded that, in general, the evaluated materials, Pro-Root MTA and Biodentine™, showed tissue compatibility, mediated inflammation, with increased fibrous tissue and production of pro- and anti-inflammatory cytokines.

Acknowledgements

Supported by *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (grant no.2014/25692-5). The authors would like to thank Marco Antonio dos Santos for the excellent technical assistance. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

Resumo

Objetivo: Avaliar a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos expostos à Biodentine™ e ao Trióxido Mineral Agregado (MTA). Métodos: Um total de 120 camundongos foram divididos em 4 grupos e 3 períodos experimentais diferentes (7, 21 e 63 dias): Biodentine™ (Septodont, Saint Maur des Fosses, França); Pro-Root MTA (Dentsply, Tulsa, EUA); óxido de zinco eugenol (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA., Ibiaporã, PR - Brasil); e controle negativo - Sham. Após os períodos experimentais, análises microscópicas descritivas, semiquantitativas e quantitativas do processo inflamatório foram analisadas nos cortes de H&E e ainda, foi realizada a avaliação da expressão gênica de *Il10*, *Infg*, *Il6*, *Il1r1* e *Tnf* (qRT-PCR). Os dados obtidos foram analisados por meio do teste do qui-quadrado e da análise de variância (ANOVA) two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni (nível de significância de 5%). Resultados: Na análise microscópica observou-se discreto infiltrado inflamatório, com predomínio de macrófagos esparsos e polimorfonucleares, leve fibrose tecidual, cápsula fibrosa regular e com calcificações distróficas, em todos os grupos que receberam os materiais (Biodentine™ e Pro-Root MTA). Paralelamente, todos os materiais modulam a expressão gênica das diferentes citocinas e receptores avaliados. Conclusão: Pro-Root MTA e Biodentine™ mostraram compatibilidade tecidual, inflamação mediada, com aumento do tecido fibroso e produção de citocinas pró- e antiinflamatórias.

References

1. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. *Pediatr Dent* 2015;37:244-252.
2. Paula AB, Laranjo M, Marto CM, Paulo S, Abrantes AM, Fernandes B, et al. Evaluation of dentinogenesis inducer biomaterials: an in vivo study. *J Appl Oral Sci* 2019;28:e20190023.
3. Oliveira TM, Moretti AB, Sakai VT, Lourenço Neto N, Santos CF, Machado MA, et al. Clinical, radiographic and histologic analysis of the effects of pulp capping materials used in pulpotomies of human primary teeth. *Eur Arch Paediatr Dent* 2013;14:65-71.
4. Paula AB, Laranjo M, Marto CM, Paulo S, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, et al. Direct Pulp Capping: What is the Most Effective Therapy? - Systematic Review and Meta-Analysis. *J Evid Based Dent Pract* 2018;18:298-314.

5. Paula A, Carrilho E, Laranjo M, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Botelho MF, et al. Direct Pulp Capping: Which is the Most Effective Biomaterial? A Retrospective Clinical Study. *Materials (Basel)* 2019;12:3382.
6. Bakland LK, Andreasen JO. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review. *Dent Traumatol* 2012;28(1):25-32.
7. Pérard M, Le Clerc J, Watrin T, Meary F, Pérez F, Tricot-Doleux S, et al. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med* 2013;24:1527-1534.
8. Walker LA, Sanders BJ, Jones JE, Williamson CA, Dean JA, Legan JJ, et al. Current trends in pulp therapy: a survey analyzing pulpotomy techniques taught in pediatric dental residency programs. *J Dent Child (Chic)* 2013;80:31-5.
9. Awawdeh L, Al-Qudah A, Hamouri H, Chakra RJ. Outcomes of Vital Pulp Therapy Using Mineral Trioxide Aggregate or Biodentine: A Prospective Randomized Clinical Trial. *J Endod* 2018;44:1603-1609.
10. Ricucci D, Grande NM, Plotino G, Tay FR. Histologic Response of Human Pulp and Periapical Tissues to Tricalcium Silicate-based Materials: A Series of Successfully Treated Cases. *J Endod* 2020;46:307-317.
11. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2013;39:743-747.
12. Vallées M, Mercade M, Duran-Sindreu F, Bourdelande JL, Roig M. Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate-based materials. *J Endod* 2013;39:525-528.
13. About I. Biodentine: from biochemical and bioactive properties to clinical applications. *G Ital Endod* 2016;30:81-88.
14. Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Gonçalves LO, Prado ASD, Piazza FA, Viola NV, et al. Hypertension affects the biocompatibility and biomineralization of MTA, High-plasticity MTA, and Biodentine®. *Braz Oral Res* 2019;33:e060.
15. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997;77:509-528.
16. Nosenko MA, Ambaryan SG, Drutskaia MS. *Mol Biol (Mosk)* 2019;53:741-754.
17. Hamidzadeh K, Christensen SM, Dalby E, Chandrasekaran P, Mosser DM. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation. *Annu Rev Physiol* 2017;79:567-592.
18. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* 2019;50:871-891.
19. Steen EH, Wang X, Balaji S, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2020;9:184-198.
20. Pucinelli CM, Silva RABD, Borges LL, Borges ATDN, Nelson-Filho P, Consolaro A, et al. Tissue Response after Subcutaneous Implantation of Different Glass Ionomer-Based Cements. *Braz Dent J* 2019;30:599-606.
21. Giraud T, Jeanneau C, Rombouts C, Bakhtiar H, Laurent P, About I. Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dent Mater* 2019;35:24-35.
22. Paula A, Laranjo M, Marto CM, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Gonçalves AC, et al. Biodentine™ Boosts, WhiteProRoot® MTA Increases and Life® Suppresses Odontoblast Activity. *Materials (Basel)* 2019;12:1184.
23. Karabulut B, Dönmez N, Göret CC, Atas Ç, Kuzu Ö. Reactions of Subcutaneous Connective Tissue to Mineral Trioxide Aggregate, Biodentine®, and a Newly Developed BioACTIVE Base/Liner. *Scanning* 2020;2020:6570159.
24. Kim SY, Nair MG. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol* 2019;97:258-267.
25. Silveira CM, Pinto SC, Zedebski Rde A, Santos FA, Pilatti GL. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J* 2011;22:21-27.
26. da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J* 2018;51:829-846.
27. Têclès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, et al. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol* 2005;50:103-108.
28. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis* 2007;13:151-157.
29. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843:2563-2582.
30. da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoreactivity promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J* 2016;49:145-153.
31. Sanders JE, Rochefort JR. Fibrous encapsulation of single polymer microfibers depends on their vertical dimension in subcutaneous tissue. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:1181-1187.
32. Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod* 2012;38:1233-1238.
33. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:878-888.

34. Cintra LT, Ribeiro TA, Gomes-Filho JE, Bernabé PF, Watanabe S, Facundo AC, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. *Dent Traumatol* 2013;29:145-150.
35. Giraud T, Jeanneau C, Bergmann M, Laurent P, About I. Tricalcium Silicate Capping Materials Modulate Pulp Healing and Inflammatory Activity In Vitro. *J Endod* 2018;44:1686-1691.
36. Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J* 2013;46:573-580.
37. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm* 2015;2015:230251.
38. Andrade AS, Silva GF, Camilleri J, Cerri ES, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS, et al. Tissue Response and Immunoeexpression of Interleukin 6 Promoted by Tricalcium Silicate-based Repair Materials after Subcutaneous Implantation in Rats. *J Endod* 2018;44:458-463.
39. Song A, Zhu L, Gorantla G, Berdysz O, Amici SA, Guerau-de-Arellano M, et al. Salient type 1 interleukin 1 receptor expression in peripheral non-immune cells. *Sci Rep* 2018;8:723.
40. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 2013;39:1003-1018.
41. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:647-675.
42. Linu S, Lekshmi MS, Varunkumar VS, Sam Joseph VG. Treatment Outcome Following Direct Pulp Capping Using Bioceramic Materials in Mature Permanent Teeth with Carious Exposure: A Pilot Retrospective Study. *J Endod* 2017;43:1635-1639.
43. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: A review of the constituents and biological properties of the material. *Int. Endod J* 2006;39:747-754.
44. Daltoé MO, Paula-Silva FW, Faccioli LH, Gatón-Hernández PM, De Rossi A, Bezerra Silva LA. Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2016;42:596-603.
45. Talabani RM, Garib BT, Masaeli R. Bioactivity and Physicochemical Properties of Three Calcium Silicate-Based Cements: An In Vitro Study. *Biomed Res Int* 2020;2020:9576930.

Received: 07/04/2020
Accepted: 20/11/2020