

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/03/2020.



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Mateus Machado Delfino

**Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex:
análises morfológica e imuno-histoquímica**

Araraquara

2018



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Mateus Machado Delfino

**Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex:
análises morfológica e imuno-histoquímica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**

Araraquara

2018

Delfino, Mateus Machado

Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex: análises morfológica e imuno-histoquímica / Mateus Machado Delfino. – Araraquara: [s.n.], 2018
75 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

1. Teste de materiais 2. Endodontia 3. Histologia I. Título

Mateus Machado Delfino

**Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex:
análises morfológica e imuno-histoquímica**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

3º Examinador: Prof. Dr. Walter Antônio de Almeida

Araraquara, 21 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Mateus Machado Delfino

NASCIMENTO: 06 de dezembro de 1993 – São José do Rio Preto – São Paulo

FILIAÇÃO: José Antônio Delfino

Silvana Cláudio Machado Delfino

2012-2015: Graduação em Odontologia pelo Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, Barretos-SP.

2016-2017: Especialização em Endodontia pela Faculdade do Centro Oeste Paulista - FACOP, Bauru-SP.

2016-2018: Mestrado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara-SP.

AGRADECIMENTOS

Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer a todos que me apoiaram, ajudaram e colaboraram para esta conquista, com o devido merecimento. Nunca estamos sozinhos na nossa caminhada do dia a dia, sempre precisamos de um ombro amigo, um amparo, um porto seguro, que nos conforte nos momentos difíceis e que possa celebrar nossas vitórias, sem sombra de dúvidas, não somos nada sem nossa família. Agradeço imensamente aos meus pais por todo apoio e confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, por ter me recebido inicialmente na Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela colaboração e atenção no decorrer desta pesquisa e por todos “puxões de orelha” nas disciplinas cursadas, sem dúvida todos os conselhos me ajudaram a crescer e evoluir profissionalmente.

A Prof. Dr^a Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru, que desde o início não mediu esforços, ajudando na manipulação dos materiais e também durante os procedimentos cirúrgicos, onde sempre esteve me apoiando, buscando sempre o melhor.

Aos técnicos Pedro Sérgio Simões e Luis Antonio Potenza por todo auxílio e colaboração nas atividades desenvolvidas no laboratório de Histologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão de auxílio financeiro em forma de bolsa de estudo.

Aos meus amigos da Pós-Graduação e do laboratório de Histologia e Embriologia que me acolheram com muito carinho. Obrigado, Tiago, Fabiane, Roberto, José Paulo e Flávia pela convivência, companheirismo e por todo ensinamento transmitido por vocês, aprendi e continuo aprendendo muito com vocês, afinal, eu sou o caçula do laboratório, o filho mais novo do Prof. Paulo e também o mais querido.

A Prof. Dr^a Estela Sasso-Cerri, pela atenção e essencial colaboração no desenvolvimento deste projeto.

E por fim, gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri, exemplo de ser humano e profissional, um professor que sem nenhuma dúvida sempre serei grato e irei lembrar com imenso carinho e alegria. Obrigado por toda sua dedicação, esforço, ética e amor pela pesquisa e pelos seus alunos. Precisamos cada vez mais de profissionais como o senhor, que é um exemplo no qual possamos nos espelhar e quem sabe um dia conseguir realizar metade do lindo trabalho desenvolvido pelo senhor. Obrigado por todos os conselhos, risadas, cafés compartilhados e por tudo que me ensinou e que continuará ensinando no Doutorado. Sem sua orientação e ajuda, nada disso ser tornaria possível. Muito obrigado!

Delfino MM. Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex: análises morfológica e imuno-histoquímica [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Modificações nos cimentos endodônticos tem sido frequentemente realizada a fim da obtenção de um material biocompatível e que favoreça a reparação dos tecidos periodontais. Assim, o GuttaFlow bioseal (GFB) foi lançado no mercado a partir de uma modificação do cimento à base de silicone GuttaFlow; no GFB foi adicionado ao cimento partículas de vidro cerâmico bioativo. Por outro lado, o MTA Fillapex (MTAF), um cimento à base de silicato tricálcico, também teve a substituição do agente radiopacificador óxido de bismuto pelo tungstato de cálcio. O nosso propósito foi avaliar a biocompatibilidade dos cimentos GFB e o MTAF (contendo tungstato de cálcio), em subcutâneo de ratos. Tubos de polietileno foram preenchidos com os respectivos materiais GFB (n=20), MTAF (n=20) e Endofill (EF; n=20) e implantados no subcutâneo de ratos. No grupo controle GC (n=20), foram implantados tubos vazios. Após 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos implantados com os tecidos circundantes foram removidos e incluídos em parafina. O número de células inflamatórias (CI) e a espessura das cápsulas foram obtidos a partir de cortes corados com HE. Alguns cortes foram corados com tricrômico de Masson para verificar a formação de colágeno nas cápsulas enquanto o método de von Kossa foi realizado para detectar depósitos de cálcio. A interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foram detectados por meio de reações imuno-histoquímicas. O número de células IL-6-imunopositivas foi estimado nas cápsulas. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). De 7 para 60 dias, todos os grupos apresentaram significativa redução no número de CI, células IL-6-imunopositivas e na espessura das cápsulas, além de aparente diminuição na imunoexpressão para VEGF. Em todos os períodos, os menores valores destes parâmetros foram observados nas cápsulas do GC. Aos 7, 15 e 30 dias, o número de CI foi significativamente menor no GFB em comparação aos MTAF ($p < 0,0001$) e EF ($p < 0,0001$), enquanto que, aos 60 dias, significantes diferenças não foram detectadas entre os grupos GFB e MTAF ($p = 0,58$). Em todos os períodos, o número de células imunopositivas à IL-6 e a espessura das cápsulas foram significativamente menores no GFB em comparação ao MTAF ($p < 0,0001$). No entanto, os valores de CI, células IL-6-imunopositivas e a espessura das cápsulas foram menores significativamente no grupo MTAF em comparação ao EF ($p < 0,0001$), em todos os períodos. Aos 60 dias, as cápsulas de GFB e MTAF mostraram poucas CI entre os fibroblastos e feixes de fibras colágenas. Estruturas positivas ao von Kossa foram observadas nas cápsulas de GFB e MTAF. Portanto, nossos resultados mostraram que a reação imuno-inflamatória induzida pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex regridem com o decorrer do tempo, possibilitando ao hospedeiro, a formação de cápsulas de colágeno, indicando que estes cimentos são biocompatíveis, enquanto no Endofill não houve reparo ao decorrer do tempo. Além disso, nossos achados sugerem que o GuttaFlow bioseal e o MTA Fillapex apresentam potencial bioativo.

Palavras-chave: Teste de materiais. Endodontia. Histologia.

Delfino MM. Tissue reaction promoted by GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex sealers: morphological and immunohistochemical analyses [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Endodontic cements have been often modified in attempt to obtain biocompatible materials, which are able to promote the repair of periodontal tissues. GuttaFlow bioseal (GFB) was launched on the market from a modification of GuttaFlow silicone cement, containing bioactive glass ceramic. In the MTA Fillapex (MTAF), a tricalcium silicate-based material, the bismuth oxide radiopacifying agent was replaced by calcium tungstate. The purpose of this study was to evaluate the tissue reactions promoted by GFB and MTAF in comparison with Endofill (EF), a zinc oxide eugenol-based root-filling material, which has a long clinical track record. Polyethylene tubes filled with GFB (n=20), MTAF (n=20) or EF (n=20) were implanted into rat subcutaneous. In the control group (CG; n=20), empty tubes were implanted. After 7, 15, 30 and 60 days, the implanted tubes surrounded by connective tissue were fixed and embedded in paraffin. The number of inflammatory cells (IC) and the capsule thickness were obtained in the HE-stained sections. Some sections were stained with Masson's trichrome for the collagen evaluation while the von Kossa method was performed for detection of calcium deposits. Interleukin-6 (IL-6), a pro-inflammatory cytokine, and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by immunohistochemical reactions. The number of IL-6-immunopositive cells was estimated in the capsules. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey post-test ($p \leq 0.05$). From 7 to 60 days, all groups showed a significant reduction in the capsule thickness, in the number of IC and IL-6-immunopositive cells as well as an apparent decrease in the VEGF immunorexpression. In all periods, the lowest values of these parameters were observed in the CG group. At 7, 15 and 30 days, the number of IC was reduced significantly in the GFB in comparison with MTAF ($p < 0.0001$) and EF ($p < 0.0001$). At 60 days, significant differences were not detected between the GFB and MTAF groups ($p = 0.58$). In all periods, the number of IL-6-immunopositive cells and the capsule thickness were significantly lower in GFB than MTAF ($p < 0.0001$). However, the values of IC, IL-6-immunopositive cells and capsule thickness were significantly lower in MTAF in comparison to EF ($p < 0.0001$), in all periods. At 60 days, the thin capsules of GFB and MTAF exhibited few IC among fibroblasts and collagen fibers bundles. In addition, von Kossa-positive structures were observed in the capsules of GFB and MTAF, in all periods. Therefore, the regression of the immune-inflammatory response associated to the formation of collagen-rich capsules indicates that GuttaFlow and MTAF are biocompatible while the tissue damaged by Endofill was not recovered over time. In addition, our findings suggest that GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex exhibit bioactive.

Keywords: Materials testing. Endodontics. Histology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3 PROPOSIÇÃO.....	18
4 MATERIAL E MÉTODO.....	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Procedimentos Cirúrgicos.....	21
4.3 Processamento Histológico.....	25
4.4 Métodos de Análise.....	27
4.4.1 Descrição morfológica.....	27
4.4.2 Densidade numérica de células inflamatórias.....	28
4.4.3 Espessura das cápsulas adjacentes aos implantes.....	30
4.4.4 Detecção imuno-histoquímica de IL-6.....	31
4.4.5 Detecção imuno-histoquímica de VEGF.....	32
4.4.6 Reação histoquímica de von Kossa.....	33
4.5 Análise Estatística.....	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Análise Morfológica.....	35
5.2 Densidade Numérica de Células Inflamatórias.....	37
5.3 Espessura das Cápsulas Adjacentes aos Implantes.....	38
5.4 Detecção Imuno-Histoquímica para Il-6 e Densidade Numérica de Células Imunopositivas.....	47
5.5 Resultados da Reação Imuno-Histoquímica para Detecção de VEGF.....	50
5.6 Reação Histoquímica de von Kossa.....	53
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

O sucesso no tratamento endodôntico depende da obturação adequada do sistema de canais radiculares com um material estável e com propriedades físico-químicas e biocompatibilidade, uma vez que estes materiais podem ter contato direto com os tecidos periapicais^{3,37,32}. A biocompatibilidade é uma das características mais importantes dos cimentos endodônticos, pois os materiais liberam substâncias que interagem com os tecidos perirradiculares, promovendo uma resposta que interfere com a reparação dos tecidos periodontais e, portanto, influenciando o prognóstico do tratamento^{51,88}.

O cimento de óxido de zinco e eugenol é um cimento utilizado há muitos anos em Endodontia⁹⁵. De fato, o óxido de zinco e eugenol é o mais comum dos componentes dos materiais de preenchimento de canais, porém não apresenta biocompatibilidade quando os resultados em tecidos subcutâneos são comparados^{68,95,76}. Estudos atribuem a baixa tolerância tecidual, devido ao eugenol e sua liberação lenta e prolongada. Estudos sobre cimentos à base de óxido de zinco e eugenol atribuem a baixa tolerância tecidual, devido ao eugenol e sua liberação lenta e prolongada. Além disso, os íons de zinco causam uma atividade deletéria secundária, levando a um quadro de inflamação crônica^{26,71,8,76}. O cimento Endofill apresentou maior citotoxicidade quando adicionado a cultura de células de fibroblastos em comparação com os cimentos AH Plus, Sealapex e MTA Fillapex. O intenso efeito tóxico causado pelo Endofill foi confirmado por meio da avaliação morfológica, na qual induziu reação inflamatória intensa e persistente^{95,76}.

Na busca por materiais menos irritantes aos tecidos perirradiculares e que promovam uma melhor reparação, diversas pesquisas têm procurado o melhor cimento biologicamente compatível aos tecidos periapicais^{8,32}. Os cimentos à base de silicato tricálcico e silicone foram desenvolvidos a fim de aprimorar as características físicas dos cimentos endodônticos, como a porosidade, o escoamento e a adesão às paredes do canal radicular⁵. Cimentos de silicato de cálcio possuem comportamento bioativo, são biointerativos, capazes de liberarem íons para nucleação dos depósitos de apatita na superfície em um curto período de indução, sendo fundamentais para induzir a remineralização^{35,36}.

O MTA Fillapex surgiu numa tentativa de combinar as propriedades físico-químicas de um cimento endodôntico, com as propriedades do MTA (mineral trióxido agregado), conhecido por sua biocompatibilidade e bom selamento^{79,89}. De acordo com o fabricante, o novo MTA Fillapex apresenta em sua composição salicilato de resina, tungstato de cálcio,

resinas diluídas, resina natural, resina nanoparticulada, sílica nanoparticulada e MTA. No entanto, tem sido sugerido que este cimento não apresenta boa resposta quando avaliado *in vitro* e reação tecidual quando implantado no subcutâneo de ratos^{107,60,94,12}. A nova fórmula deste cimento, apresenta a troca do radiopacificador, sendo o óxido de bismuto substituído pelo tungstato de cálcio, devido ao escurecimento coronário, provocado pelo radiopacificador. O novo MTA Fillapex apresenta propriedades físico-químicas satisfatórias, tais como tempo de presa, escoamento, radiopacidade e pH alcalino⁵⁹.

GuttaFlow bioseal, é um cimento bioativo, a base de silicone, que associa gutta-percha em pó, polidimetilsiloxano, catalisador de platina, dióxido de zircônio, prata (conservante), corante e vidro cerâmico bioativo. Este cimento foi lançado no mercado na tentativa de oferecer melhores propriedades físicas e biológicas. O GuttaFlow bioseal foi desenvolvido para melhorar a bioatividade de GuttaFlow favorecendo a regeneração de tecidos periodontais da região do periápice. O GuttaFlow bioseal apresenta pouca solubilidade e porosidade, capacidade de alcalinização em comparação a outros cimentos endodônticos^{2,36,17,93}. De acordo com o fabricante, ao entrar em contato com fluidos periapicais, o material bioativo disponibiliza alguns constituintes tais como cálcio e silicatos que apresentam um papel importante no processo de reparação¹⁸. Portanto, a resposta tecidual dos cimentos endodônticos é um dos parâmetros para o sucesso endodôntico. Devido as alterações na composição do GuttaFlow bioseal, com o acréscimo do vidro bioativo e no MTA Fillapex, onde o radiopacificador foi alterado, torna-se oportuno investigar a reação tecidual provocada por estes cimentos no tecido subcutâneo de ratos, devido estes materiais serem novos e não existir estudos *in vivo* do Guttaflow bioseal e do novo MTA Fillapex.

7 CONCLUSÃO

- A redução significativa do processo inflamatório acompanhada pela formação de fibras colágenas nas cápsulas do GuttaFlow bioseal e do MTA Fillapex indica que esses cimentos são biocompatíveis.
- A redução do número de células imunopositivas à IL-6 e ao VEGF nas cápsulas do GuttaFlow Bioseal e do MTA Fillapex indica que estes cimentos permitem a formação de delgadas cápsulas fibrosas. Assim, estes cimentos devem possibilitar a regeneração e/ou reparação dos tecidos conjuntivos.
- A presença de depósitos de cálcio nas cápsulas do GuttaFlow bioseal e do MTA Fillapex sugere que estes exibem potencial de mineralização, baseado na análise através do teste de von Kossa.
- O Endofill induz a formação de infiltrado inflamatório crônico e não apresenta bioatividade.

REFERÊNCIAS*

1. Accardo C, Himel VT, Lallier TE. A novel guttaflow sealer supports cell survival and attachment. *J Endod.* 2014; 40(2): 231-4.
2. Akcay M, Arslan H, Durmus N, Mese M, Capar ID. Dentinal tubule penetration of AH Plus, iRoot SP, MTA fillapex, and guttaflow bioseal root canal sealers after diferente final irrigation procedures: a confocal microscopic study. *Lasers Surg Med.* 2016; 48(1): 70-6.
3. Almeida WA, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Silva LAB. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. *Int Endod J.* 2000; 33(1): 25-7.
4. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LTA. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J.* 2014; 47(7): 615-21.
5. Baldasso FER. Resposta tecidual frente ao cimento endodôntico guttaflow: avaliação em tecido conjuntivo de ratos [trabalho de conclusão de curso de especialização em endodontia]. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia UFRGS; 2014.
6. Baldasso FER, Kopper PMP, Morgental RDM, Steier L, Figueiredo JAP, Scarparo RK. Biological tissue response to a new formulation of a silicone based endodontic sealer. *Braz Dent J.* 2016; 27(6): 657-63.
7. Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1999; 15(1):26-7.
8. Batista RFC, Hidalgo MM, Hernandez L, Consolaro A, Velloso TRG, Cuman RKN, et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 81(1): 171-7.
9. Bernabé PFE, Holland R, Morandi R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, et al. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. *Baz Dent J.* 2005; 16(2): 149-55.
10. Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012; 38(4): 495-50.
11. Blackman RB, Gross M, Seltzer S. An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. *J Endod.* 1989; 15(2): 76-9.
12. Bósio CC, Bortoluzzi FEA, Felipe MCS, Felipe WT, Rivero ERC. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *Int Endod J.* 2014; 47(7): 667-74.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

13. Bouillaguet S, Shaw L, Barthelemy J, Krejci I, Wataha JC. Long-term sealing ability of Pulp Canal Sealer, AH-Plus, Guttaflow and Epiphany. *Int Endod J.* 2008; 41(3): 219-26.
14. Camargo RV, Silva-Sousa YTC, Rosa RPF, Mazzi-Chaves JF, Lopes FC, Steier L, et al. Evaluation of the physicochemical properties of silicone-and epoxy resin-based root canal sealers. *Braz Oral Res.* 2017; 31: e72.
15. Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *J Endod.* 2009; 35(10): 1412-7.
16. Camilleri J, Formosa L, Damidot D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J.* 2013; 46(9): 831-40.
17. Collado-González M, Tomás-Catalá CJ, Oñate-Sánchez RE, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. Cytotoxicity of Guttaflow Bioseal, GuttaFlow 2, MTA Fillapex, and AH Plus on human periodontal ligament stem cells. *J Endod.* 2017; 43(5): 816-22.
18. Coltene [homepage na internet]. Langenau: Coltene; [acesso em 2017 abr 10]. Disponível em: https://www.coltene.com/fileadmin/Data/EN/Products/Endodontics/Root_Canal_Obturation/GuttaFlow_bioseal/60019782_04-16_GuttaFlow_bioseal_PT.pdf
19. da Fonseca TS, Da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response na IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J.* 2016; 49(2):145-53.
20. da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanoamaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J.* 2011; 44(2): 100-10.
21. da Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Pedrosa AC, Granjeiro JM, Zaia AA. Long-term cytotoxicity, ph and dissolution rate of AH Plus and MTA Fillapex. *Braz Dent J.* 2016; 27(4): 419-23.
22. Daming WU, Tang Z, Zhang G, Liu W. The sealing ability of a new silicone-based root canal filling material (guttaflow): an in vitro study using the percentage of gutta-percha-filled area. *Dent Mater J.* 2011; 30(5): 569-75.
23. de Mayo T, Conget P, Becerra-Bayona S, Sossa CL, Galvis V, Arango-Rodriguez ML. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0177533.
24. de Oliveira PA, de Pizzol-Júnior JP, Longhini R, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine Reduces Interleukin-6, Matrix Metalloproteinases-1 and -9 Immunoexpression in the gingival mucosa of rat molars with induced periodontal disease. *J Periodontol.* 2017; 88(1): 100-11.

25. Dimmeler S, Zeiher AM. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res.* 2000; 87(6): 434-9.
26. Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod.* 1995; 21(3): 122-7.
27. Efflandt SE, Magne P, Douglas WH, Francis LF. Interaction between bioactive glasses and human dentin. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13(6): 557-65.
28. Elayouti A, Achleithner C, Lost C, Weiger R. Homogeneity and adaptation of a new gutta-percha paste to root canal walls. *J Endod.* 2005; 31(9): 687-90.
29. Endofill [bula]. Petrópolis: Dentsply; 2016.
30. Faraoni G, Finger MS, Masson MC, Victorino FR. Avaliação comparativa do escoamento e tempo de presa do cimento MTA fillapex. *RFO.* 2013; 18(2): 180-4.
31. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FLCV, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013; 46(8): 755-62.
32. Fathia E, Abu-bakr NH, Yahia I. A comparative study of the microleakage of Resilon/Epiphany and Gutta-Percha/AH-Plus obturating systems. *Iran Endod J.* 2012; 7(3): 139-43.
33. FDI. Fédération Dentaire Internationale. Recommended standard practices for the biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980; 30(2):140-88.
34. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 421746.
35. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Stefano ED, Prati C. Biomimetic remineralization of human dentin using promising innovative calcium-silicated hybrid “smart” materials. *Dent Mater.* 2011; 27(11): 1055-69.
36. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Properties of a novel polysiloxane-guttapercha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dent Mater.* 2016; 32(5):e113-26.
37. Gencoglu N, Sener G, Omurtag GZ, Tozan A, Uslu B, Arbak S, et al. Comparison of biocompatibility and cytotoxicity of two new root canal sealers. *Acta Histochem.* 2009; 112(6):567-75.
38. Ghanaati S, Willershausen I, Barbeck M, Unger RE, Joergens M, Sader RA, et al. Tissue reaction to sealing materials: different view at biocompatibility. *Eur J Med Res.* 2010; 25(15): 483-92.

39. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury. Care.* 2005; 36(3): s20-7.
40. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LTA, Mauro MJ, Otoboni Filho JA, et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX®. *Dent Traumatol.* 2012; 28(6): 452-6.
41. Guinesi AS, Faria G, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho I. Influence of sealer placement technique on the quality of root canal filling by lateral compaction or single cone. *Braz Dent J.* 2014; 25(2): 117-22.
42. Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; 1(94): 3-12.
43. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest.* 1994; 93(6): 2490-6.
44. Hashizume M, Mihara M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis.* 2011; 2011:765624.
45. Herbert J, Bruder M, Braunsteiner J, Altenburguer MJ, Karl-Thomas W. Apical quality and adaptation of Resilon, EndoREZ, and Guttaflow root canal fillings in combination with a noncompaction technique. *J Endod.* 2009; 35(2): 261-4.
46. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25(3): 161-6.
47. Kala M, Torvi SJ. An in vitro comparison of apical leakage in immediate versus delayed post space preparation using EndoREZ and RoekoSeal root canal sealers. *J Int Clin Dent Res Organ.* 2015; 7(1): 30-4.
48. Kangarlou A, Dianat O, Esfahrood ZR, Asharaf H, Zandi B, Eslami G. Bacterial leakage of Guttaflow-filled root canals compared with Resilon/Epiphany and Gutta-percha/AH 26-filled root canals. *Aust Endod J.* 2012; 38(1): 10-3.
49. Kilkis BT, Kursat ER, Tasdemir T, Yildirim M, Taskesen F, Tumkaya L, et al. Neurotoxicity of various root canal sealers on rat sciatic nerve: an electrophysiologic and histopathologic study. *Clin Oral Invest.* 2015; 19(8): 2091-100.
50. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010; 22(5): 347-52.
51. Konjhdzic-Prcic A, Gorduysus O, Kucukkaya S, Atila B, Muftuoglu S, Zeybek D. In vitro comparison of cytotoxicity of four root canal sealers on human gingival fibroblasts. *Med Arh.* 2015; 69(1): 24-7.

52. Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *J Oral Sci.* 2008; 50(4): 397-2.
53. Lee SK, Lorenzo JA. Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase a pathway in murine bone marrow cultures. *Bone.* 2002; 31(1): 252-9.
54. Leonardo MR, Almeida WA, Silva LAB, Utrilla LS. Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14(6): 257-61.
55. Leonardo MR, Almeida WA, Silva LAB, Utrilla LS. Tissue response to na epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol.* 1999; 15(1): 28-32.
56. Li Y, Chi L, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Microvasc Res* 2001; 61(3): 253-2.
57. Longhini R, de Oliveira PA, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *J Periodontol* 2014; 85(8): 1115-25.
58. Mandal P, Zhao J, Sab SK, Huang Y, Liu J. In vitro cytotoxicity of guttaflow 2 on human gingival fibroblastos. *J Endod.* 2014; 40(8): 1156-9.
59. Marins FC, Ronconi CT, Saavedra FM, Lima ABM, Zaia AA, Moreira EJM, et al. Avaliação da citotoxicidade de dois cimentos à base de MTA: um estudo in vitro. *Rev Bras Odontol.* 2017; 74(1): 27-30.
60. Marques NCT, Neto NL, Fernandes AP, Rondini CO, Duarte MAH, Oliveira TM. Rat subcutaneous tissue response to MTA Fillapex® and Portland cement. *Braz Dent J.* 2013; 24(1): 10-4.
61. Martins VJM, Lins RX, Berlinck TCA, Fidel RAS. Cytotoxicity of root canal sealers on endothelial cell cultures. *Braz Dent J.* 2013; 24(1): 15-20.
62. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MAH, Grizzo LT, Buzalaf MAR, et al. pH, calcium ion release, and setting time of an experimental MTA-based root canal sealer. *J Endod* 2011;37(6):844–6.
63. MTA Fillapex [bula]. Londrina: Angelus; 2017.
64. Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Naik A, Rao NR. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. *Int Endod J.* 2011; 44(4): 307-13.
65. Oliveira ACM, Duque C. Atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos. *Rev Odontol Univ Cid.* 2013; 25(1): 58-7.

66. Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981; 7(8): 355-67.
67. Ozcan E, Eldeniz AU, Aydinbelge HA. Assessment of the sealing abilities of several root canal sealers and filing methods. *Acta Odontol Scand.* 2017; 71(6):1362-9.
68. Panzarini SR, Trevisan CL, Brandini DA, Poi WR, Sonoda CK, Luvizito ER, et al. Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: a literature review. *Dent Traumatol.* 2012; 28(1): 42-8.
69. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9(4): 574-8.
70. Puchtler H, Meloan SN. Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry.* 1978; 56(4): 177-85.
71. Ranade MP, Kamra AI. A comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic materials. *Endodontology.* 2003; 15(1): 7-13.
72. Reyes-Carmona JF, Santos ARS, Figueiredo CP, Felipe MS, Felipe WT, Cordeiro MM. In vivo host interactions with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide: inflammatory molecular signaling assessment. *J Endod.* 2011; 37(9): 1225-35.
73. Ricucci D, Langeland K. Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study. *Int Endod J.* 31(6): 394-9.
74. Rincon M. Special issue on interleukin-6 (IL-6). *Int J Biol Sci.* 2012; 8(9): 1225-6.
75. Rungby J, Kassem M, Eriksen EF, Danscher G. The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background. *Histochem J.* 1993; 25(6): 446-51.
76. Saraiva JA, da Fonseca TS, Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, et al. Reduced interleukin-6 immunexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater.* 2018; 13(3): 1-12.
77. Savariz A, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Long-term sealing ability of Guttaflow versus Ah Plus using different obturation techniques. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15(6): 936-41.
78. Saygili G, Saygili S, Tuglu I, Capar ID. In vitro cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, AH-Plus and MTA Fillapex. *Iran Endod J.* 2017; 12(3): 354-9.
79. Scelza MZ, Coil J, Alves GG. Effect of time extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts. *Braz Oral Res.* 2012; 26(5): 424-30.

80. 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(5): 878-88.
81. Senne MI, Lemos N, Fidel SR, Fidel RAS. Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares. *RSBO*. 2009; 6(1): 71-6.
82. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM, et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *J Endod*. 2010; 35(5): 899-903.
83. Shvero DK, Abramovitz I, Zaltsman N, Davidi MP, Weiss EI, Beyth N. Towards antibacterial endodontic sealers using quaternary ammonium nanoparticles. *Int Endod J*. 2013; 46(8): 747-54.
84. Siew K, Lee AHC, Cheung GSP. Treatment outcome of repaired root perforation: a systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2015; 41(11): 1795-804.
85. Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod*. 2013; 39(2): 274-7.
86. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(12): 4336-45.
87. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(8): 2015-25.
88. Simsek N, Akinci L, Gecor O, Alan H, Ahmetoglu F, Taslidere E. Biocompatibility of a new epoxy resin-based root canal sealer in subcutaneous tissue of rat. *Eur J Dent*. 2015; 9(1): 31-5.
89. Sonu KR, Girish TN, Ponnappa, KC, Kishan KV, Thameem PK. Comparative evaluation of dentinal penetration of three different endodontic sealers with and without smear layer removal – scanning electron microscopic study. *Saudi Endod J*. 2016; 6(1):16-20.
90. Souza JRM, Oliveira RT, Blotta MHSL, Coelho OR. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18(IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnívelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. *Arq Bras Cardiol* 2008; 90(2): 94-9.
91. Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int Endod J*. 1998; 31(2): 85-9.

92. Tanomaru-Filho M, Faleiros FBC, Saçaki JN, Duarte MAH, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2009; 35(10): 1418-21.
93. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, de Almeida M, Navarro LG, Steier L et al. Physicochemical properties and volumetric change of silicone/bioactive glass and calcium silicated-based endodontic sealers. *J Endod.* 2017; 43(12): 2097-101.
94. Tavares CO, Bottcher DE, Assman E, Kopper PMP, de Figueiredo JAP, Grecca FS, et al. Tissue reactions to a new mineral trioxide aggregate-containing endodontic sealer. *J Endod.* 2013; 39(5): 653-7.
95. Teixeira L, Basso FG, Hebling J, Costa CAS, Mori GG, Silva-Sousa YTC, et al. Cytotoxicity evaluation of root canal sealers using an in vitro experimental model with roots. *Braz Dent J.* 2017; 28(2): 165-71.
96. Vasiliadis L, Kodonas K, Economides N, Gocos C, Stavrianos C. Short-and long-term sealing ability off Gutta-flow and AH-Plus using an ex vivo fluid transport model. *Int Endod J.* 2010; 43(5): 377-81.
97. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100(7): 1773-81.
98. Vitti RP, Prati C, Silva EJNL, Sinhoreti MAC, Zanchi CH, Silva MGS et al. Physical properties of MTA Fillapex sealer. *J Endod.* 2013; 39(7): 915-8.
99. Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998; 83(8): 832-40.
100. Wastein M, Morgental RD, Waltrick SBG, Oliveira SD, Vier-Pelisser FV, Figueiredo JAP et al. In vitro antibacterial activity of a silicone-based endodontic sealer and two conventional sealers. *Braz Oral Res.* 2016; 30(1): 1-5.
101. Willershausen I, Callaway A, Briseño B, Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med.* 2011; 7(15): 1-9.
102. Yang Y, Tan Y, Wong R, Wenden A, Zhang L, Rabie ABM. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* 2012; 4(2): 64-8.
103. Yesilsoy C, Koren LZ, Morse DR, Kobayashi C. A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 65(4): 459-67.
104. Yigiti DH, Gencoglu N. Evaluation of resin/silicone-based root canal sealers. Part I: physical properties. *Dig J Nanomater Biostruct.* 2012; 7(1): 107-15.

105. Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Zheng Y, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod.* 2013; 39(10): 1281-6.
106. Zielinsk TM, Baumgartner C, Marshall G. An evaluation of Guttaflow and gutta-percha in the filling of lateral grooves and depressions. *J Endod.* 2008; 34(3): 295-8.
107. Zmener O, Lalis RM, 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.
108. Zoufan K, Jiang J, Komabayashi T, Wang Y, Safavi, KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(5): 657-61.