



## “Análise Quantitativa de Proteínas Totais, LPS, LTA e Citocinas em Dentes Necrosados em Diferentes Estágios do Tratamento Endodôntico”

**Palavras-Chave: Necrose, Citocinas, Dente Desvitalizado.**

**Autores:**

**Leonardo Correa Bueno [Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP]**

**Dr.<sup>a</sup> Juliana Delatorre Bronzato [Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP]**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes (orientadora) [Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP]**

### **INTRODUÇÃO:**

A necrose pulpar, como consequência da falta de suprimento sanguíneo na polpa, participa de uma cascata de reação que começa com a cárie dental e avança até atingir a polpa, causando pulpíte, necrose e doenças periapicais (Lima et al., 2021). A necrose assintomática, quando resulta de uma pulpíte irreversível não tratada, é caracterizada pela ausência de nervos pulpareis funcionais e vira um sítio de crescimento bacteriano, podendo se tornar sintomática a partir do momento em que há o envolvimento dos tecidos periodontais e periradiculares (periodontite apical sintomática ou abscesso periapical agudo), respondendo positivamente aos testes de percussão e/ou palpação (Hargreaves, 2007).

Canais radiculares infectados contêm uma população polimicrobiana composta em sua grande maioria por bactérias Gram-positivas anaeróbicas facultativas (e.g. *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*) e estritas (e.g. *Parvimonas micra*, *Filifactor alocis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*), bactérias Gram-negativas anaeróbicas facultativas (e.g. *Neisseria* spp., *Escherichia coli*) e estritas (e.g. *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister pneumosintes*, *Treponema* spp.). Todavia fungos, vírus, e protozoários também podem fazer parte desta comunidade (Gomes et al., 2019).

O LPS (endotoxina), o LTA e os peptidoglicanos são componentes bacterianos presentes na infecção endodôntica capazes de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Henderson et al., 1996), que têm a função de sinalização, mediando o recebimento de respostas à infecção, inflamação e trauma (Parolia et al., 2014), sendo as mais relevantes: fator necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) entre outras (Elsalhy et al., 2013).

O padrão de resposta imune/inflamatória gerada frente aos microrganismos da infecção endodôntica é determinado pela rede de citocinas estabelecidas que, por sua vez, depende da complexidade das vias celulares ativadas diante determinado estímulo externo. Neste sentido, o conhecimento do conteúdo infeccioso presente nos canais radiculares, incluindo seu conteúdo proteico, pode favorecer estratégias para sua eliminação e contribuir para o sucesso da terapia endodôntica (Martinho et al., 2014).

### **OBJETIVO GERAL**

O presente estudo teve como objetivos quantificar os níveis de proteínas totais nas amostras iniciais e os níveis de LPS, LTA e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) nas amostras coletadas de canais radiculares e tecidos periapicais de dentes necrosados sintomáticos e assintomáticos nas diferentes fases do tratamento endodôntico e verificar possíveis associações entre esses moduladores inflamatórios.

### **METODOLOGIA:**

Nesse estudo foram utilizadas amostras clínicas previamente coletadas e armazenadas em freezer de -80°C, por alunos do programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica, área de Endodontia, durante as diferentes fases do tratamento endodôntico (após a abertura coronária - inicial, após o preparo químico-mecânico - PQM, e após a medicação intracanal - MIC) de pacientes com dentes necrosados sintomáticos (n=10) e assintomáticos (n=10).

#### **1. Quantificação das proteínas totais**

Esse estudo usou o "Micro BCA Protein Assay Kit" (Thermo, Rockford, IL, EUA), que contém 240ml do reagente A (tampão tartarato-carbonato), 240ml do reagente B (ácido bincinônico, vulgo BCA), 12ml do reagente C (sulfato de cobre) e ampolas de albumina de soro bovino 2mg/ml.

### 1.1 Preparo do reagente

Os reagentes A, B e C foram misturados em um tubo de ensaio, nas proporções 25 para 24 para 1, respectivamente, a fim de obter um reagente final único, que foi misturado com as amostras.

### 1.2 Diluições da albumina (amostra controle)

A fim de obter um grupo controle, uma ampola de albumina foi diluída várias vezes em água destilada (diluinte), obtendo 8 amostras com concentrações diferentes (0,2mg/ml, 0,04mg/ml, 0,02mg/ml, 0,01mg/ml, 0,005mg/ml, 0,0025mg/ml, 0,001mg/ml, 0,0005mg/ml).

### 1.3 Mistura dos reagentes com as amostras

Em um eppendorf separado, foi misturado 10uL do reagente final com 10uL de uma amostra, sendo ela albumina ou do paciente em sí, totalizando 20uL em cada recipiente, obtendo uma amostra final.

É nessa parte que se inicia a reação de Biureto, como citado anteriormente, em que, quando associado à uma proteína, os Cu<sup>2+</sup> na solução são reduzidos em Cu<sup>+</sup>, que se ligam ao complexo de reagente do BCA, gerando uma tonalidade cada vez mais escura conforme maior quantidade de proteínas na amostra.

### 1.4 Incubação das amostras finais

Todas as amostras finais foram colocadas na incubadora por 60 minutos a uma temperatura de 60°C.

### 1.5 Uso do NanoDrop

Após o término da incubação, foi utilizado o NanoDrop, um espectrofotômetro que registra os valores de absorvância das amostras, lendo elas à 562nm.

Com isso, foram pipetados 2µL de cada amostra final no leitor da máquina, começando pelas de albumina, a fim de obter os valores do grupo controle. Após isso, as amostras de todos os pacientes foram registradas no software da máquina, obtendo a concentração de proteínas totais delas, em mg/ml, e depois transferidas para uma tabela.

## 2. Quantificação de Endotoxinas (LPS) (monitoramento infeccioso nas diferentes etapas do tratamento endodôntico)

### 2.1 Teste *Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Pyrogen-5000 (Lonza, Walkersville, MD, EUA)*

Todos os materiais estavam apirogênicos [calor seco (estufa) a 250°C por 30 minutos ou por energia ionizante (EMBRARAD, Cotia, SP)]. Outros materiais já se apresentavam apirogênicos e esterilizados oriundos de fábrica (Lonza, Walkersville, MD, EUA). Foi estabelecida uma curva-padrão com quantidades conhecidas de endotoxina (*Escherichia coli*). Esta foi preparada utilizando soluções com concentrações 0,01 EU/mL, 0,10 EU/mL, 1 EU/mL, 10 EU/mL, 100 EU/mL como descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Diluição da solução de endotoxina de *E. coli* para a determinação da curva padrão.

Tubos apirogênicos	Concentração de Endotoxina (EU/mL)	Volume de água reagente LAL
1	10	0,9 mL
2	1	0,9 mL
3	0,1	0,9 mL
4	0,01	0,9 mL

Os valores da absorvância das soluções de endotoxina foram espectrofotometricamente medidos a 340 nm no leitor Biotek (ELX 808, Winooski, VT, EUA), sendo a absorvância a 340 nm linear com os intervalos de concentração usados.

### 2.2 Procedimentos para execução do teste

Foi impresso um esboço com o posicionamento da água apirogênica, da curva padrão, das amostras e do controle positivo do produto (PPC) na microplaca de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, EUA). Em seguida, foi dispensado cuidadosamente no interior dos poços da microplaca: 100 µl das amostras e 100 µl dos controles positivos das mesmas, ambas em duplicata. Nas amostras controles foram dispensados 10 µl da endotoxina na concentração de 10 EU/mL, evitando formação de bolha. Após o preenchimento das amostras e dos respectivos controles previamente contaminados com *E. coli*, foi dispensado cuidadosamente no interior dos poços da microplaca: 100 µl de água apirogênica (branco), padrões de endotoxina (100 µl da concentração de 0,01 EU/mL; 0,1 EU/mL; 1 EU/mL; 10 EU/mL e 100 EU/mL). A placa foi pré-incubada por ≥ 10 minutos a 37°C+1 °C, no leitor Biotek. Próximo ao final do período de pré-incubação, cada frasco de reagente Pyrogen- 5000 foi reconstituído com 5,2 mL de tampão de reconstituição Pyrogen- 5000. Após isso, foi dispensado rapidamente 100 µL do reagente reconstituído de Pyrogen-5000 dentro de

todos os poços da microplaca, iniciando pela primeira coluna (A1-H1) e procedendo em sequência até a última coluna utilizada. Com a tampa da microplaca removida foi iniciada a leitura.

### 3. Quantificação de ácido lipoteicóico (LTA) (monitoramento infeccioso nas diferentes etapas do tratamento endodôntico)

#### 3.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

As amostras da região periapical foram eluídas em 600 µl de solução tampão (PBS – phosphate buffered saline) contendo 0,1% de solução Tween 20 e 1 µl de coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Os tubos foram agitados por 30 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos.

Os níveis de LTA foram avaliados através do uso de kits laboratoriais específicos (Human Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, EUA). Todos os reagentes foram levados a temperatura ambiente e a solução diluente foi adicionada em cada poço contendo o anticorpo monoclonal específico contra o LTA.

Os padrões e as amostras foram adicionados aos poços permitindo a ligação do LTA ao anticorpo imobilizado.

Após um período de incubação específico os poços foram lavados com solução tampão e um segundo anticorpo policlonal específico e conjugado a fosfatase alcalina foi adicionado. As placas foram novamente incubadas e lavadas.

Foi adicionado em todos os poços o substrato (NADPH), que inicia a reação colorimétrica catalisada pela fosfatase alcalina, seguido de incubação e adição da solução amplificadora da reação colorimétrica. Após novo período de incubação, a solução de parada foi adicionada.

O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados utilizando um leitor de placas para ELISA. A curva padrão foi feita com os padrões fornecidos no kit pelo fabricante.

### 4. Quantificação de Citocinas (nas diferentes etapas do tratamento endodôntico)

As amostras da região periapical foram eluídas em 600 µl de solução tampão (PBS – phosphate buffered saline) contendo 0,1% de solução Tween 20 e 1 µl de coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA). Os tubos foram agitados por 30 minutos e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos.

As citocinas avaliadas foram a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, através do uso de kits laboratoriais específicos (Human Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, EUA). Também foram avaliados os níveis de PGE2 e Substancia P. Todos os reagentes foram levados a temperatura ambiente e a solução diluente foi adicionada em cada poço contendo o anticorpo monoclonal específico contra a citocina a ser quantificada.

Os padrões e as amostras foram adicionados aos poços, permitindo a ligação da citocina ao anticorpo imobilizado. Após um período de incubação específico, os poços foram lavados com solução tampão e um segundo anticorpo policlonal específico e conjugado a fosfatase alcalina foi adicionado. As placas foram novamente incubadas e lavadas.

Foi adicionado em todos os poços o substrato (NADPH), que iniciou a reação colorimétrica catalisada pela fosfatase alcalina, seguido de incubação e adição da solução amplificadora da reação colorimétrica. Após novo período de incubação, a solução de parada foi adicionada.

O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados utilizando um leitor de placas para ELISA. A curva padrão foi feita com os padrões fornecidos no kit pelo fabricante.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 1. Quantificação das proteínas totais

A avaliação das amostras no espectrofotômetro mostrou que os dentes com necrose sintomática possuíam maior quantidade de proteínas totais (tabela 2) em relação aos dentes com necrose assintomática (tabela 3).

Tabela 2. Média e Desvio Padrão das amostras na análise proteínas totais de dentes com necrose **sintomática**

Média entre amostras (mg/ml)	Desvio padrão
58,39	84,69

Tabela 3. Média e Desvio Padrão das amostras na análise proteínas totais de dentes com necrose **assintomática**

Média entre amostras (mg/ml)	Desvio padrão
34,01	25,52

Devido ao fato de que nas proteínas totais podem estar incluídas citocinas pró-inflamatórias, interleucinas, LPS e LTA, nosso estudo sugere que dentes com necrose sintomática possuem mais resquícios de componentes bacterianos e, conseqüentemente, de células pró-inflamatórias quando comparados aos dentes com necrose assintomática, obtendo uma diferença entre a média das amostras.

## 2. Quantificação de Endotoxinas (LPS) (monitoramento infeccioso nas diferentes etapas do tratamento endodôntico)

Tabela 4: Concentração (EU/ml) de LPS nas diferentes etapas do tratamento endodôntico.

Grupo	Coleção Purulenta	Inicial	Após o PQM	Após o MIC
<b>Sintomático</b>	120.00 (73.5-393.00) $\alpha$	59.5(25.60-78.2)Aa $\beta$	0.10 (0.10-0.80) Ba	0.01 (0.01-0.01) Ca
<b>Assintomático</b>	120.00 (73.5-393.00) $\alpha$	24.15(15.34-47.10)Ab	0.12 (0.04-0.50) Ba	0.01 (0.01-0.10) Ca

Os níveis de LPS observados na coleção purulenta no AAA foram 120,00 (73,5-393,00) EU/mL, não diferindo significativamente dos observados no grupo sintomático antes do PQM ( $P > 0,05$ ).

No grupo sintomático, os níveis iniciais de LPS foram 59,5 (25,60-78,2) EU/mL e apresentaram correlação positiva com a presença de dor espontânea e sensibilidade à percussão ( $P < 0,05$ ).

No grupo assintomático, os níveis de LPS foram 24,15 (15,34-47,10) EU/mL. Após PQM, houve redução significativa (99,0%) em ambos os grupos. No entanto, após o uso da MIC à base de hidróxido de cálcio por 30 dias, níveis ainda mais baixos de LPS foram detectados nos canais radiculares de ambos os grupos.

Antes do PQM, LPS foi detectado em níveis mais elevados nos canais radiculares de dentes sintomáticos em comparação com os assintomáticos ( $P < 0,05$ ). Uma redução significativa de LPS foi detectada em dentes sintomáticos ou assintomáticos após PQM e MIC ( $P < 0,05$ ).

## 3. Quantificação de ácido lipoteicoico (LTA) (monitoramento infeccioso nas diferentes etapas do tratamento endodôntico)

Tabela 5: Concentração (pg/ml) de LTA nas diferentes etapas do tratamento endodôntico.

Grupo	Coleção Purulenta	Inicial	Após o PQM	Após o MIC
<b>Sintomático</b>	554.0 (447.0-655.0) $\alpha$	459.5 (335.0-566.0) Ab $\beta$	386.0 (226.0-633.0) Aa	228.0 (112.0-351.0) Ba
<b>Assintomático</b>	554.0 (447.0-655.0) $\alpha$	569.5 (469.0-609.0) Aa	438.0 (395.0-529.0) Ba	267.0 (180.0-460.0) Ca

Os níveis de LTA observados na coleção purulenta no AAA foram [554,0 (447,0-655,0) pg/mL], diferindo significativamente daqueles encontrados nos canais radiculares dos grupos sintomáticos antes do PQM ( $P > 0,05$ ).

No grupo sintomático, os níveis iniciais de LTA foram [459,5 (335,0-566,0) pg/mL] e diminuiram significativamente após MIC ( $P < 0,05$ ).

No grupo assintomático, os níveis iniciais de LTA foram [569,5 (469,0-609,0) pg/mL] e também diminuiram significativamente após PQM ( $P < 0,05$ ).

## 4. Quantificação de Citocinas (nas diferentes etapas do tratamento endodôntico)

Tabela 6. Concentração de diferentes citocinas em pacientes sintomáticos nas diferentes etapas do tratamento endodôntico.

Grupo Sintomático	IL-1b	TNF-alpha	IL-1 alpha	IL-6
<b>Inicial</b>	1,43	0.20	2.89	0.99
<b>Após o PQM</b>	1.43	0.20	2.89	0.99
<b>Após o MIC</b>	7.57	0.20	6,42	2,33

Tabela 7. Concentração de diferentes citocinas em pacientes assintomáticos nas diferentes etapas do tratamento endodôntico.

Grupo Assintomático	IL-1b	TNF-alpha	IL-1 alpha	IL-6
<b>Inicial</b>	0.01	0.20	0.40	0.33
<b>Após o PQM</b>	0.01	0.20	0.40	0.33
<b>Após o MIC</b>	0.01	0.20	0.40	0.99

Os níveis de IL-1b, IL-1 $\alpha$  e IL-6 foram menores no grupo assintomático em relação ao grupo sintomático, os níveis de TNF-  $\alpha$  se mantiveram.

No grupo **sintomático**, os níveis de IL-1b, IL-1 $\alpha$  e IL-6 se mantiveram após o PQM e aumentaram após a MIC, os níveis de TNF-  $\alpha$  se mantiveram.

No grupo **assintomático**, todos os níveis de citocinas se mantiveram após o PQM, sendo a IL-6 a única que aumentou após a MIC.

## 5. Discussão

O fato de que o PQM foi capaz de reduzir os níveis de LPS, mas não de LTA no grupo sintomático, pode ser explicado devido a interação das bactérias Gram-positivas com a matriz extracelular, dificultando a remoção das bactérias Gram-positivas e seus resíduos (Hammerschmidt et al., 2019).

Devido a maior presença de LPS no grupo sintomático, há níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias, pois as citocinas têm sua produção estimulada pela presença de endotoxinas (Henderson et al., 1996).

Além disso, o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6 após a MIC no grupo sintomático pode indicar uma resposta inflamatória desencadeada pelo tratamento, que pode ser explicado pelo fato de que a medicação intracanal não é 100% biocompatível (Hauman 2003), estimulando ainda mais a liberação de células imunológicas. Além de tudo, alguns agentes medicamentosos utilizados na medicação intracanal podem levar a um aumento temporário do estresse oxidativo no tecido pulpar e periapical desencadeando uma maior resposta inflamatória como parte do processo de reparo e remoção de detritos celulares danificados (Tepel et al., 1994).

O fato dos níveis especificamente de IL-6 aumentar após a MIC pode ser explicada devida a sua função específica de modulação da resposta inflamatória, em que ela modula a resposta inflamatória de outras citocinas e regula o equilíbrio entre a resposta pró e anti-inflamatória do organismo (Tanaka and Kishimoto 2014), tentando conter um agravamento da inflamação possivelmente provocada, por exemplo, pelo estresse oxidativo devido à MIC.

## CONCLUSÕES:

Dentes com necrose sintomática possuem maior quantidade de proteínas totais, LPS, LTA e citocinas do que os dentes com necrose assintomática.

PQM foi capaz de reduzir os níveis de LPS, mas não de LTA no grupo sintomático.

A MIC pode estimular mais a resposta inflamatória como parte do processo de reparo e remoção de detritos celulares danificados.

## APOIO:

Apoio: FAPESP 2015/23479-5, 2021/13871-6, 2017/25090-3 e 2022/07799-3, CNPq 303852/2019-4, 421801/2021-2, CAPES Finance Code 001, PIBIC.

## BIBLIOGRAFIA:

Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. **Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation**. Int Endod J. 2013 Jun;46(6):573-80.

Gomes BPF, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Endodontic infections and therapeutical approaches. Chapter 18, p 419-434. In: Lamont RJ; Hajishengallis G; Hyun (Michel) Koo; Jenkinson HF, eds. Microbiology and Immunology. 3rd ed. Washington, DC; ASM Press. 2019. ISBN-13: 9781555819989 or ISBN-10: 1555819982. 536 p. 2019.

Hammerschmidt S, Rohde M, Preissner KT. Extracellular Matrix Interactions with Gram-Positive Pathogens. Microbiol Spectr. 2019 Mar;7(2).

Hargreaves, KM, Berman LH. **Cohen Caminhos da polpa**. 36 ed. Rio de Janeiro, RJ, GEN Guanabara Koogan. 2017.

Hauman CH, Love RM. **Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1**. Intracanal drugs and substances. Int Endod J. 2003 Feb;36(2):75-85.

Henderson B, Wilson M. **Cytokine induction by bacteria: beyond lipopolysaccharide**. Cytokine. 1996 Apr;8(4):269-82.

Lima AR, Herrera DR, Francisco PA, Pereira AC, Lemos J, Abranches J, Gomes BPF. Detection of Streptococcus mutans in symptomatic and asymptomatic infected root canals. Clin Oral Investig. 2021 Jun;25(6):3535-3542.

Martinho FC, Leite FR, Chiesa WM, Nascimento GG, Feres M, Gomes BP. Signaling pathways activation by primary endodontic infectious contents and production of inflammatory mediators. J Endod. 2014 Apr;40(4):484-9.

Parolia A, Gee LS, de Moraes Porto ICC, Mohan M (2014) Role of Cytokines, Endotoxins (LPS), and Lipoteichoic Acid (LTA) in Endodontic Infection. J Dent Oral Disord Ther 2(4): 1-5.

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Sep 4;6(10):a016295.

Tepel J, Darwisch el Sawaf M, Hoppe W. Reaction of inflamed periapical tissue to intracanal medicaments and root canal sealers. Endod Dent Traumatol. 1994 Oct;10(5):233-8.