

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI

ȘCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ



***MODIFICĂRI BIOCHIMICE ASOCIATE PATOLOGIEI
PULPEI DENTARE***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. GREABU MARIA**

**Student-doctorand:
KRITIKOU KONSTANTINA**

2022

Cuprins

Introducere	7
I. Partea generală.....	13
1. Pulpa dentară	13
1.1. Generalități	13
1.2. Originea țesutului pulpar	14
1.3. Structura țesutului pulpar	15
1.3.1. Celulele pulpei dentare	15
1.3.2. Matricea extracelulară pulpară	18
1.4. Vascularizația țesutului pulpar	20
1.5. Inervația țesutului pulpar	22
1.6. Funcțiile pulpei dentare	24
2. Patologia pulpară de origine carioasă	28
2.1. Generalități	28
2.2. Rolul odontoblaștilor în apărarea pulpei dentare împotriva proceselor carioase ..	31
2.3. Răspunsul imun înăscut	33
2.4. Răspunsul imun adaptativ	35
2.5. Modificările macroscopice ale pulpei dentare inflamate	37
2.6. Simptomatologia și examenul clinic în inflamațiile pulpare	38
2.7. Reparația și regenerarea la nivelul complexului pulpo-dentinar	41
2.7.1. Formarea și depunerea dentinei de reacție	41
2.7.2. Formarea și depunerea dentinei de reparație	42
2.7.3. Regenerarea țesutului pulpar	43
3. Determinarea patologiei pulpei dentare cu ajutorul biomarkerilor	44
3.1. Biomarkeri-Generalități	44
3.2. Utilizarea biomarkerilor pentru detectarea unor afecțiuni orale locale și generale	47
3.3. Evaluarea statusului inflamator al pulpei dentare cu ajutorul biomarkerilor	49
3.3.1. Evaluarea inflamației pulpare cu ajutorul biomarkerilor în probe de fluid crevicular, sânge pulpar, fluid dentinar și fluid pulpar extracelular	51
3.3.2. Evaluarea inflamației pulpare cu ajutorul biomarkerilor în probe de țesut pulpar	55
II. Contribuții personale	69
4. Ipoteza de lucru și obiective generale	69
5. Metodologia generală a cercetării	71
6. Determinări biochimice în țesutul pulpar al dinților permanenți	81
6.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	81
6.2. Material și metodă	82
6.3. Rezultate	86
6.4. Discuții	94
7. Determinări biochimice în țesutul pulpar al dinților temporari	100

7.1. Introducere (Ipoteza de lucru și obiective specifice)	100
7.2. Material și metodă.....	101
7.3. Rezultate.....	105
7.4. Discuții	126
8. Determinări biochimice în pulpile acute ale dinților temporari și permanenți și stabilirea unor posibile corelații între diferitele tipuri de biomarkeri	134
8.1. Introducere (ipoteza de lucru și obiective specifice)	134
8.2. Material și metodă.....	135
8.3. Rezultate.....	137
8.4. Discuții	164
9. Concluzii și contribuții personale	171
9.1. Concluzii.....	171
9.2. Contribuții personale	177
Bibliografie	179
Anexe.....	190

Lista cu abrevieri și simboluri

BD – Beta-defensine	MPO – Mieloperoxidază
BMP – Proteine morfogenetice osoase	MSC – Celule stem mezenchimale
CNC – Creasta neurală craniană	NGF – Factorul de creștere a nervilor
CGRP – Polipeptidul asociat cu gena calcitoninei	NK – Celule Natural Killer
DC – Celule dendritice	NPY – Neuropeptid Y
DMP-1 – Proteina-1 a matricei dentinare	OMS – Organizației Mondiale a Sănătății
DP – Dinți permanenți	PAMP – Tipare moleculare asociate cu agenți patogeni
DPP – Dentin-fosfoproteina	PBS – Soluție salină tamponată cu fosfat
DS – Deviația standard	PDGF – Factor de creștere derivat din plachete
DSP – Dentin-sialoproteina	PG – Proteoglicani
DT – Dinți temporari	PMN – Polimorfonucleare neutrofile
ECM – Matrice extracelulară	RANKL – Factor pentru diferențierea și activarea osteoclastelor
FGF-2 – Factorul de creștere al fibroblaștilor	ROS – Specii reactive ale oxigenului
GM-CSF – Factor stimulator al coloniilor granulocite-macrofage	SNC – Sistem nervos central
Godeuri NSB – Godeuri fără specificitate de legare	SOD – Superoxid dismutaza
Godeuri QC – Godeuri control al calității	SP – Substanța P
GP – Glicoproteine	TGF- β 1 – Factor de creștere și transformare β 1
IFN- γ - Interferon- γ	Th – Celule T helper
IL – Interleukină	TLR – Receptori Toll-like
iTreg – Celule T cu reglare indusă	TMB – Tetrametilbenzidină
IQR – intervale interpercentile	TNF- α – Factor de necroză tumorală alpha
JSD – Joncțiunea smalț-dentină	TNL – Terminații nervoase libere
LPS – Lipopolizaharide	Treg – Celule T reglatoare
LTA – Acid lipoteicoic	Ts – Celule T supresoare
MHC – Complex major de histocompatibilitate	VEGF – Factor de creștere a endoteliului vascular
MMP – Metaloproteinaze matriceale	VIP – Polipeptidul intestinal vasoactiv

INTRODUCERE

Inflamația pulpară (pulpita dentară), atât în dentiția temporară cât și în cea permanentă, se desfășoară în 2 etape, reversibilă și ireversibilă, iar fiecare dintre ele beneficiază de tratament dentar diferit. În pulpitele reversibile este indicată prezervarea țesutului pulpar vital, în special în cazul dinților permanenți tineri, în timp ce inflamațiile pulpare ireversibile necesită îndepărtarea completă a țesutului infectat, sterilizarea și obturarea spațiului endodontic [1]. De multe ori formele de inflamație ireversibilă predomină celor reversibile, necesitând tratamente radicale.

Instalarea inflamației pulpare ca urmare a invaziei bacteriene este acompaniată de eliberarea a diverși mediatorii, mulți dintre ei cu rol sinergic sau antagonist, care determină modificări la nivel molecular și celular [3]. Literatura de specialitate este caracterizată printr-o lipsă de studii bazate pe determinări ale unor parametri biochimici în ceea ce privește țesuturile pulpare dentare recoltate de la copii și adolescenți.

În prezent, diagnosticul patologiei pulpare se realizează de obicei în stadii tardive, iar metodele clinice existente sunt de multe ori imprecise și subiective [5]. Dezvoltarea unor proceduri pentru abordarea minim invazivă și diagnosticul precis al patologiei pulpare reprezintă un element esențial în terapia endodontică, în special pentru diagnosticul diferențial între inflamația reversibilă și ireversibilă a dinților temporari și permanenți.

Motivația alegerii temei respective a fost reprezentată de perspectiva identificării prezenței și concentrației unor mediatorii (TNF- α , IL-2, IL-17, SOD-3, Catalaza, MMP-7, MMP-9, Osteocalcina și TGF- β 1) care participă în procesele inflamatorii ale dinților temporari și permanenți și înțelegerea mecanismelor de inflamație pulpară cu scopul de a pune bazele în vederea stabilirii unor protocoale pentru diagnostic precis care va deveni util în alegerea celor mai potrivite metode de tratament.

I. PARTEA GENERALĂ

În partea generală sunt cuprinse trei capitole care conțin informații relevante despre tema abordată în partea specială, precum și o analiză descriptivă a realizărilor până în prezent, pe baza literaturii de specialitate din România și străinătate.

În **primul capitol** s-a realizat o descriere amănunțită a țesutului pulpar dentar în ceea ce privește originea, structura, vascularizația, inervația și funcțiile lui.

Capitolul 2 cuprinde informații referitoare la inflamația pulpară de cauză bacteriană, rolul odontoblaștilor în procesele de apărare a pulpei dentare, și răspunsul imun înăscut și dobândit a țesutului pulpar. De asemenea, sunt descrise modificările macroscopice care apar la nivelul pulpei dentare în urma inflamației, simptomatologia și examinarea clinică în cazul pulpitelor dentare precum și mecanismele de reparație și regenerare ale complexului pulpo-dentinar.

În **capitolul 3** sunt incluse informații generale despre biomarkerii studiați și utilizarea lor în diverse patologii orale locale și sistemice. În plus, a avut loc o descriere amănunțită a diverselor studii realizate în antecedente care au evaluat prezența diversilor biomarkeri în condiții de inflamație pulpară.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

Capitolul 4. Ipoteza de lucru și obiective generale

Ipoteza de lucru pentru prezenta cercetare a fost reprezentată de posibilitatea determinării modificărilor biochimice din pulpa dentară inflamată cu ajutorul biomarkerilor. Pentru testarea acestei ipoteze au fost prelevate probe de țesuturi pulpare inflamate ireversibil (de tip acut și/sau cronic) și țesuturi pulpare sănătoase, atât de la dinți temporari cât și de la dinți permanenți.

Prin urmare, această cercetare este bazată pe trei studii ce își propun următoarele obiective generale:

1. Determinarea concentrației biomarkerilor inflamației, a stresului oxidativ, a degradării matricei extracelulare (ECM) și a mecanismelor de reparație și mineralizare a țesuturilor în pulpa dentară inflamată și analiza lor comparativ cu cele prelevate de la dinți sănătoși, atât temporari cât și permanenți.
2. Stabilirea unor corelații între diferitele tipuri de biomarkeri în dentiția primară și definitivă.
3. Compararea concentrației biomarkerilor în țesuturile pulpare inflamate de la dinții temporari *versus* dinții permanenți.

Capitolul 5. Metodologia generală a cercetării

Selectarea pacienților

În toate studiile cercetări au fost incluși copii și adolescenți cu vârstă cuprinsă între 6-18 ani care s-au prezentat pentru tratament la Disciplina de Pedodontie a Facultății de Medicină Dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București.

- *Criteriile generale de includere a pacienților:* pacienți fără afecțiuni generale (diabet, afecțiuni metabolice etc)/locale (afte, herpes, plăgi), pacienți sub medicație generală/locală (în ultimele 24 de ore), reprezentanți legali ai pacienților au semnat acordul informat, pacienți cooperanți, pacienți care acceptă anestezia locală și izolarea cu digă.
- *Criterii generale de excludere a pacienților:* afecțiuni generale/locale, medicație generală/locală, pacienți necooperanți, pacienți care nu acceptă anestezia locală și/sau izolarea cu digă.

Recoltarea probelor de țesut pulpar

În urma stabilirii diagnosticului clinic prin coroborarea datelor din anamneza pacientului, semnele clinice, examinarea radiografiilor și informațiilor obținute de la testele paraclinice s-a selectat tratamentul potrivit care a fost reprezentat de extracția dentare sau pulpectomii vitale. Toate tratamentele au fost realizate în condiții aseptice (igienizare profesională, toaleta dintelui, a celor vecini și a mucoasei în vederea realizării anesteziei). S-a efectuat anestezie locală prin infiltrație și/sau topică (dinți temporari cu mobilitate mare).

Grupul de studiu în toate cele trei studii a fost reprezentat de probe de țesut pulpar inflammat ireversibil (dinte temporar/dinte permanent) obținut prin pulpectomie vitală, iar grupul de control a fost reprezentat de probe de țesut pulpar sănătos (dinte temporar/dinte permanent) prelevate după extracția și secționarea dinților. De la fiecare participant s-a obținut o singură probă de țesut pulpar dentar.

Probele de pulpă dentară au fost congelate la $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ până la momentul procesării și obținerii lizatului pulpar. Prelucrarea probelor și analiza cu ajutorul metodei ELISA au fost efectuate în cadrul Disciplinei de Biochimie a Facultății de Medicină Dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București.

Obținerea lizatului pulpar

Probele au fost decongelate la temperatura camerei, în fiecare recipient cu probă de țesut pulpar s-a adăugat soluție salină tamponată cu fosfat și țesutul s-a mărunțit cu ajutorul unei tije din sticlă. Ulterior, au fost sonicate timp de 3 minute, urmate de centrifugare timp de 10 minute la 4000 rpm cu obținerea supernatantului.

Evaluarea nivelului biomarkerilor cu ajutorul metodei ELISA

Nivelul IL-2, IL-17, MMP-7, MMP-9, TNF- α , SOD-3, Catalazei, Osteocalcinei și TGF- β 1 a fost determinat prin metoda sandwich ELISA conform metodei larg cunoscute [7] utilizând kituri comerciale de la Elabscience (Houston, TX, SUA) și un analizor semiautomat ELISA STAT FAX 303-PLUS de la Awareness Technologies (Palm City, FL, SUA). Protocolul de lucru general al metodei sandwich ELISA este sintetizat în Figura 5.1.

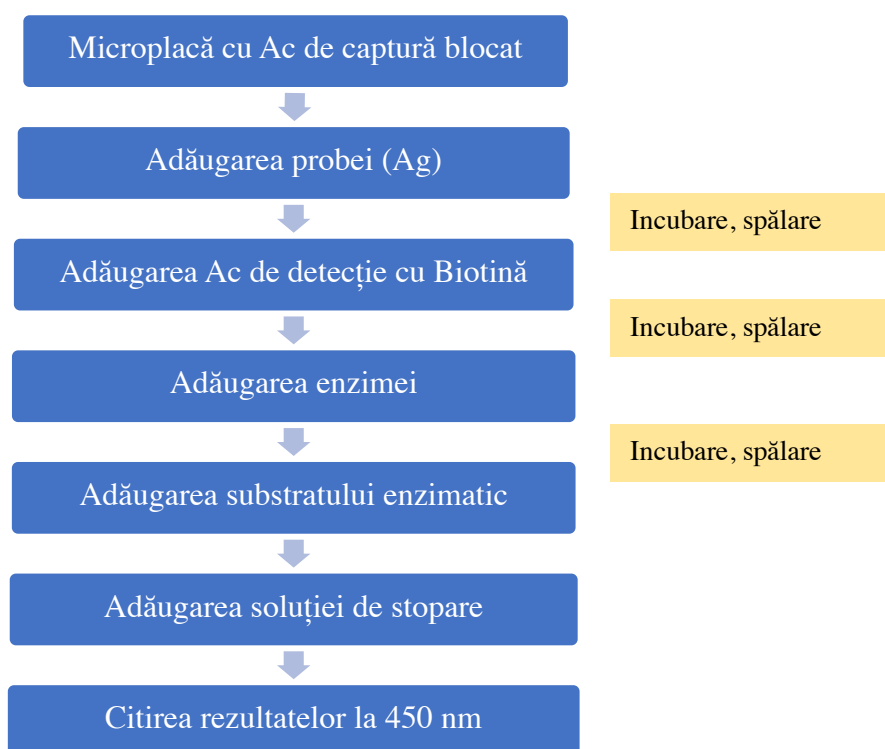


Figura 5.1. Protocolul general al metodei ELISA sandwich

Protocol de lucru general, clinic și de laborator

- Periaj, detartraj profesional, toaleta dinților și a mucoasei cu alcool.
- Realizarea anesteziei locale prin infiltrație/ doar topică în cazul extracției dT cu mobilitate mare.
- Izolare cu digă în cazul pulpectomiei vitale.
- Extracția și secționarea dP/dT pentru lotul control/ Îndepărtarea țesutului dentar cariat și accesarea spațiului endodontic a dP/dT pentru lotul de studiu.
- Colectarea blândă a pulpei dentare cu instrumentar steril, nou.
- Plasarea probelor în eprubete sterile cu soluție de ser fiziologic și congelare până la procesarea ulterioară.
- Obținerea lizatului pulpar.
- Determinarea concentrației diversilor biomarkeri utilizând metoda sandwich ELISA

Analiza statistică a rezultatelor experimentale

Analiza statistică a fost efectuată folosind IBM SPSS Statistics 25 și Microsoft Office Excel/Word 2013. Variabilele cantitative au fost testate pentru distribuție folosind testul Shapiro-Wilk și au fost exprimate sub formă de medii cu deviații standard (DS) sau mediane cu intervale interpercentile (IQR). Variabilele calitative au fost exprimate sub formă absolută sau ca procente.

Variabilele cantitative independente cu distribuție non-parametrică au fost testate folosind testul Mann-Whitney U. Variabilele cantitative independente cu distribuție parametrică au fost testate folosind testul Student/Welch. Aceste teste statistice au fost aplicate în toate cele trei studii. O valoare a $p \leq 0.05$ a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic.

Capitolul 6. Determinări biochimice în țesutul pulpar al dinților permanenți

6.1. Introducere

- **Scopul studiului** a fost identificarea diferențelor în ceea ce privește nivelul biomarkerilor TNF- α , IL-2, IL-17, SOD-3, Catalaza, MMP-7, MMP-9, Osteocalcina și TGF- β 1 în pulpitele acute totale comparativ cu țesuturile pulpare sănătoase în dentiția permanentă.
- **Obiectivele studiului** au fost reprezentate de determinarea concentrațiilor biomarkerilor inflamației (TNF- α , IL-2, IL-17), a stresului oxidativ (SOD-3, Catalaza), a degradării ECM (MMP-7, MMP-9) și a reparației și mineralizării (Osteocalcina, TGF- β 1) în țesuturile pulpare inflamate acut comparativ cu cele sănătoase ale dinților permanenți (dP).

6.2. Material și metodă

În studiul de față au fost incluși 42 de pacienți cu vârste cuprinse între 6-18 ani. Criteriile de includere și excludere a pacienților sunt descrise la capitolul „Metodologia generală a cercetării”.

- **Criterii de includere a dinților pentru obținerea țesutului pulpar:** dP cu simptomatologie de inflamație pulpară ireversibilă simptomatică (grup de studiu), dP sănătoși, indemni la carie, fără traumatisme asociate sau afecțiuni parodontală (grup control)
- **Criterii de excludere a dinților pentru obținerea țesutului pulpar:** dP cu inflamație pulpară ireversibilă parțială/ asimptomatică/ necroză/gangrenă, dP fără simptomatologie, dar cu prezența leziunilor carioase, traumatisme, afecțiuni parodontală, dP cu tratamente de canal, resorbții interne/externe, calcificări
- **Lotul de studiu** a constat în probe de țesuturi pulpare inflamate ireversibil prelevate prin pulpectomie vitală de la dP cu diagnostic clinic de pulpită acută totală ($n=23$) care au necesitat tratament de urgență.
- **Lotul control** a fost reprezentat de țesut pulpar sănătos recoltat de la dP ($n=19$) sănătoși care au fost extrași în scop ortodontic [33].

Protocolul de lucru general clinic și de laborator este descris în capitolul „Metodologia generală a cercetării”.

Analiza statistică a rezultatelor experimentale s-a realizat utilizând testele Shapiro-Wilk, Mann-Whitney U, Student/Welch în funcție de tipul și distribuția fiecărei variabile.

6.3. Rezultate

Vârsta medie \pm deviația standard (DS) pacienți lot total: 10.98 ± 3.65 ani, vârstă medie \pm DS pacienți lot control ($n=19$) 10.91 ± 3.18 ani, vârstă medie \pm DS pacienți ($n=23$) lot studiu 11.06 ± 4.25 ani.

Toți biomarkerii au fost detectați atât în lotul de studiu cât și în cel control. Valorile medii și comparația statistică tuturor biomarkerilor între cele 2 loturi sunt expuse în tabelul VI.1.

Tabel VI. 1. Valorile medii ale IL-2, IL-17, TNF- α , MMP-7, MMP-9, SOD-3, Catalazei, Osteocalcinei și TGF- β 1 în probe de țesuturi pulpare inflamate acut ireversibil versus sănătoase ale dP

Biomarker	Lot control ($n=19$), Valoare medie \pm DS	Lot studiu ($n=23$), Valoare medie \pm DS	SS (p)
IL-2 (pg/mg prot.)	22.23 ± 4.66	113.21 ± 29.14	<0.001*
IL-17 (pg/mg prot.)	18.2 ± 2.04	138.04 ± 16.54	<0.001*
TNF- α (pg/mg prot.)	6.342 ± 3.429	54.435 ± 11.195	<0.001*
MMP-7 (ng/mg prot.)	1.853 ± 0.59	2.3 ± 0.85	0.061**
MMP-9 (ng/mg prot.)	1.568 ± 0.44	1.496 ± 0.5	0.625**
SOD-3 (ng/mg prot.)	2.142 ± 0.97	26.32 ± 7.71	<0.001*
Catalaza (U/mg prot.)	2.258 ± 0.66	2.67 ± 0.74	0.064**
Osteocalcina (ng/mg prot.)	2.258 ± 0.66	7.97 ± 4	<0.001*
TGF- β 1 (pg/mg prot.)	12.12 ± 2.54	23.16 ± 11.79	<0.001***

(SS=Semnificație Statistică, prot.=proteine, * Welch T-Test, ** Student T-Test, *** Mann-Whitney U Test)

6.4. Discuții

IL-2, IL-17, TNF- α , SOD-3, Osteocalcina și TGF- β 1 prezintă concentrații crescute în probele de țesut pulpar inflammat ireversibil comparativ cu țesuturile pulpare sănătoase, diferențele dintre cele 2 loturi fiind semnificative ($p \leq 0.05$). Aceste rezultate sunt în concordanță cu majoritatea studiilor efectuate în antecedente cu toate că acestea au utilizat

probe de țesut pulpar prelevate de la pacienți adulți [76] [101] [142] [151] [152] [153] [155] [156][158] [159] [164,165].

În ceea ce privește nivelul IL-2, Anderson și colab. [143] și ElSalhy și colab. [76] au raportat absența unor diferențe semnificative din punct de vedere statistic ($p>0.05$) între țesuturile pulpare inflamate ireversibil și sănătoase.

Tulunoglu și colab. [8] nu au menționat diferențe semnificative privind activitatea totală a SOD în probe de țesut pulpar inflammat ireversibil *versus* țesuturi pulpare sănătoase prelevate de la dP ale copiilor, iar Varvara și colab. [160] au observat o activitate semnificativ scăzută ($p<0.001$) a Cu, Zn-SOD în inflamații pulpare ireversibile comparativ cu probe de pulpă dentară sănătoasă care se poate datora progresiei inflamației și distrucției enzimei.

În studiul nostru, enzimele MMP-7, MMP-9 și Catalaza nu au prezentat diferențe semnificative între lotul de studiu și control ($p>0.05$), rezultatele fiind în contradicție cu alte studii care au raportat concentrații crescute semnificativ în inflamațiile pulpare [7,103,108,112] [169]. Diferențele dintre rezultatele studiului de față și cercetările efectuate în antecedente se pot datora metodelor moleculare diagnostice utilizate, țintei lor de determinare (proteine, activitate enzimatică) sau variații ale intensității stimulului care determină producerea acestor enzime chiar și în cazul unor simptome clinice similare.

Nu a fost identificat niciun studiu care să evalueze prezența MMP-7 în țesutul pulpar. Concentrația și ARNm al MMP-7 au fost determinate în leziuni tisulare inflamatorii recoltate din abcese apicale cronice și în probe de ligament parodontal sănătos, cu rezultate semnificativ crescute în ceea ce privește probele patologice [171].

În inflamația pulpară ireversibilă tratamentul are ca scop îndepărtarea în totalitate a țesutului pulpar infectat, sterilizarea și obturația spațiului endodontic, dP cu astfel de tratament pot deveni mai fragili, casanți, cu risc crescut de fractură. În cazul dP tineri cu apex deschis, o astfel de patologie ar trebui urmată de inițierea procedurii de apexificare cu scopul de a forma o barieră dură apicală în lipsa creșterii în grosime și lungime a rădăcinii, cu riscul de a fi urmate de aceleași consecințe ca și în cazul dP maturi.

Procedurile moleculare pot deveni utile în stabilirea cu precizie a diagnosticului pulpar, ideal cât mai precoce într-o etapă reversibilă, pentru efectuarea tratamentelor vitale și cât mai puțin invazive, în special în cazul dP imaturi, urmate de continuarea formării rădăcinii și închiderea apexului.

Capitolul 7. Determinări biochimice în țesutul pulpar al dinților temporari

7.1. Introducere

Scopul studiului a fost evaluarea comparativă a nivelului IL-2, IL-17, TNF- α , MMP-7, MMP-9, SOD-3, Catalazei, Osteocalcinei și TGF- β 1 în pulpitele acute, pulpitele cronice și pulpa dentară sănătoasă în dentiția temporară.

- **Obiectiv specific #1:** Determinarea concentrației IL-2, IL-17, TNF- α , MMP-7, MMP-9, SOD-3, Catalazei, Osteocalcinei și TGF- β 1 în țesuturile pulpare inflamate acut *versus* țesuturi pulpare sănătoase ale dT.
- **Obiectiv specific #2:** Evaluarea nivelului IL-2, IL-17, TNF- α , MMP-7, MMP-9, SOD-3, Catalazei, Osteocalcinei și TGF- β 1 în țesuturile pulpare inflamate cronic *versus* cele sănătoase ale dT.
- **Obiectiv specific #3:** Evaluarea comparativă a concentrației IL-2, IL-17, TNF- α , MMP-7, MMP-9, SOD-3, Catalazei, Osteocalcinei și TGF- β 1 în pulpitele acute și cronice ale dT.

7.2. Material și metodă

Acest studiu a inclus un număr de 46 de subiecți cu vârste cuprinse între 6-12 ani. Criteriile de includere și excludere a pacienților sunt descrise la capitolul „Metodologia generală a cercetării”.

- **Criterii de includere a dT pentru obținerea țesutului pulpar:** dT cu pulpită acută totală, dT cu pulpită cronică închisă totală, dT care au necesitat extracție în urma exfolierii fiziologice/retenției suplimentare pe arcada dentară, dT cu rizaliză fiziologică
- **Criterii de excludere a dT pentru obținerea țesutului pulpar:** dT cu pulpită acută parțială, dT cu pulpită cronică parțială/deschisă, dT cu necroză/gangrenă simplă/complicată, dT cu perforații/ resorbții patologice (interne/externe), dT cu leziuni periapicale acute/cronice
- **Lotul de studiu 1** a fost reprezentat de țesuturi pulpare inflamate acut ($n=18$) obținute prin pulpectomie vitală de la dT cu diagnostic clinic de pulpită acută (simptomatică) ireversibilă. Pacienții de la care s-au recoltat aceste probe au necesitat tratament de urgență.

- **Lotul de studiu 2** a constat în țesuturi pulpare inflamate cronic ($n=15$) prelevate prin pulpectomie vitală de la dT cu diagnostic clinic de pulpită cronică (asimptomatică) închisă. Pacienții de la care s-au recoltat aceste probe s-au prezentat pentru tratamentul unor presupuse carii simple, care în urma examinării obiective s-au dovedit a fi complicate, ele având afectare pulpară.
- **Lotul control** a inclus probe de țesuturi pulpare sănătoase ($n=13$) obținute de la dT sănătoși clinic cu resorbție fiziologică în stadiul final sau cu exfoliere întârziată și retenție prelungită pe arcadele dentare care au necesitat extracție.

Protocol de lucru general clinic și de laborator este descris în capitolul „Metodologia generală a cercetării”. Analiza statistică a rezultatelor experimentale s-a realizat utilizând testele Shapiro-Wilk, Mann-Whitney U, Student/Welch în funcție de tipul și distribuția fiecărei variabile.

7.3. Rezultate

Vârsta medie ± DS a pacienților: Cei 46 de pacienți care au fost incluși în al doilea studiu au avut 8.58 ± 1.39 ani. Lotul control a fost reprezentat de 13 probe de țesuturi pulpare sănătoase obținute de la 13 pacienți de 8.35 ± 1.46 ani. Lotul cu pulpită acută a fost obținut de la 18 pacienți având 8.8 ± 1.06 ani, în timp ce probele cu inflamație cronică închisă au fost prelevate de la 15 pacienți 8.52 ± 1.68 ani.

Proteine ale tuturor biomarkerilor au fost detectate prin metoda ELISA în toate probele de țesut pulpar analizat (Tabel VII.28.-VII.30.).

Tabel VII. 28. Valorile medii ale IL-2, IL-17, TNF- α , MMP-7, MMP-9, SOD-3, Catalazei, Osteocalcinei și TGF- β 1 în pulpilele acute ireversibile versus țesuturi pulpare sănătoase ale

dT

Biomarker	Lot control ($n=13$), Valoare medie \pm DS	Lot pulpită acută ($n=18$), Valoare medie \pm DS	SS (p)
IL-2 (pg/mg prot.)	21.44 ± 5	108 ± 32.77	<0.001*
IL-17 (pg/mg prot.)	18.14 ± 2.6	130.71 ± 12.38	<0.001*
TNF- α (pg/mg prot.)	6.75 ± 3.15	57.71 ± 10.78	<0.001***
MMP-7 (ng/mg prot.)	1.63 ± 0.78	2.25 ± 0.69	0.071***
MMP-9 (ng/mg prot.)	1.59 ± 0.32	1.44 ± 0.53	0.464**
SOD-3 (ng/mg prot.)	1.56 ± 0.44	27.45 ± 8.31	<0.001*
Catalaza (U/mg prot.)	2.35 ± 0.6	2.59 ± 0.75	0.187**
Osteocalcina (ng/mg prot.)	2.51 ± 1	5.87 ± 3	0.002*
TGF- β 1 (pg/mg prot.)	13.24 ± 1.48	18.07 ± 4.5	<0.001*

Tabel VII. 29. Valorile medii ale IL-2, IL-17, TNF- α , MMP-7, MMP-9, SOD-3, Catalazei, Osteocalcinei și TGF- β 1 în pulpите cronice închise ireversibile versus țesuturi pulpare sănătoase ale dT

Biomarker	Lot control (n=13), Valoare medie \pm DS	Lot pulpită cronică (n=15), Valoare medie \pm DS	SS (p)
IL-2 (pg/mg prot.)	21.44 \pm 5	121.33 \pm 21.67	<0.001*
IL-17 (pg/mg prot.)	18.14 \pm 2.6	149.44 \pm 16.21	<0.0018
TNF- α (pg/mg prot.)	6.75 \pm 3.15	49.33 \pm 10.38	<0.0018
MMP-7 (ng/mg prot.)	1.63 \pm 0.78	2.36 \pm 1.1	0.120**
MMP-9 (ng/mg prot.)	1.59 \pm 0.32	1.57 \pm 0.47	0.960**
SOD-3 (ng/mg prot.)	1.56 \pm 0.44	26.29 \pm 7.16	<0.001*
Catalaza (U/mg prot.)	2.35 \pm 0.6	2.81 \pm 0.75	0.060**
Osteocalcina (ng/mg prot.)	2.51 \pm 1	11.23 \pm 3.13	<0.001*
TGF- β 1 (pg/mg prot.)	13.24 \pm 1.48	31.06 \pm 15.3	0.006*

Tabel VII. 30. Valorile medii ale IL-2, IL-17, TNF- α , MMP-7, MMP-9, SOD-3, Catalazei, Osteocalcinei și TGF- β 1 în pulpите acute ireversibile versus pulpите cronice închise ireversibile ale dT

Biomarker	Lot pulpită acută (n=18), Valoare medie \pm DS	Lot pulpită cronică (n=15), Valoare medie \pm DS	SS (p)
IL-2 (pg/mg prot.)	108 \pm 32.77	121.33 \pm 21.67	0.295**
IL-17 (pg/mg prot.)	130.71 \pm 12.38	149.44 \pm 16.21	0.005**
TNF- α (pg/mg prot.)	57.71 \pm 10.78	49.33 \pm 10.38	0.159***
MMP-7 (ng/mg prot.)	2.25 \pm 0.69	2.36 \pm 1.1	0.926***
MMP-9 (ng/mg prot.)	1.44 \pm 0.53	1.57 \pm 0.47	0.543**
SOD-3 (ng/mg prot.)	27.45 \pm 8.31	26.29 \pm 7.16	0.986**
Catalaza (U/mg prot.)	2.59 \pm 0.75	2.81 \pm 0.75	0.506**
Osteocalcina (ng/mg prot.)	5.87 \pm 3	11.23 \pm 3.13	0.001**
TGF- β 1 (pg/mg prot.)	18.07 \pm 4.5	31.06 \pm 15.3	0.035*

(SS=Semnificație Statistică, prot.=proteine, * Welch T-Test, ** Student T-Test, *** Mann-Whitney U Test)

7.4. Discuții

O parte din biomarkerii studiați au fost incluși anterior în alte cercetări cu diferența că acestea au utilizat ca și probe țesuturi pulpare recoltate de la dP, majoritatea fiind de la pacienți adulți. În consecință, rezultatele studiului prezent au fost comparate cu studii care au determinat parametrii moleculari în țesuturi pulpare inflamate obținute de la dP.

TNF- α , IL-2, IL-17, SOD-3, Osteocalcina și TGF- β 1 au prezentat niveluri ridicate în grupurile de studiu comparativ cu lotul control al dT, diferențele fiind semnificative din

punct de vedere statistic ($p < 0.05$). Rezultatele studiului de față sunt similare cu cele ale lui Pezelj-Ribaric și colab. [155], Kokkas și colab. [153] și Abd-Elmeguid și colab. [101], care au utilizat ELISA, RT-PCR, Multiplex respectiv, și au demonstrat creșterea semnificativă a TNF- α în țesuturile pulpare inflamate acut comparativ cu cele sănătoase. Rauschenberger și colab. [142] au raportat concentrații crescute semnificativ a IL-2 în țesuturi pulpare inflamate simptomatice, în contrast Anderson și colab. [143] nu au observat diferențe semnificative între pulpitele simptomatice și dinții sănătoși.

Liu și colab. [152] și Xiong și colab. [151] au determinat prezența IL-17 în inflamații pulpare ireversibile simptomatice cu diferențe semnificative față de dinții sănătoși. În ceea ce privește SOD-3, constatările noastre sunt similare cu Bodor și colab. [156], Davis și colab. [158] și în contrast cu Tulunoglu și colab. [8], Varvara și colab. [160] care au observat o creștere semnificativă a SOD în dinți sănătoși *versus* cei cu inflamații pulpare. Abd-Elmeguid și colab. [101] au determinat prezența Osteocalcinei cu ajutorul metodei Multiplex și au concluzionat că există o concentrație semnificativ mai mare în pulpitele reversibile și ireversibile simptomatice în raport cu țesuturile pulpare sănătoase. Și în ceea ce privește determinarea TGF- β 1, rezultatele noastre sunt în concordanță cu Piattelli și colab. [165].

Singurul studiu efectuat pe probe de țesut pulpar recoltat de la dT a fost cel a lui Suwanchai și colab. [7] care au determinat cu ajutorul metodei Western-Blot prezența MMP-9 în țesuturi pulpare inflamate reversibil și ireversibil (fără diferența între cele 2 tipuri de inflamații) comparativ cu țesuturi pulpare sănătoase, cu niveluri semnificativ crescute în lotul de studiu ($p < 0.05$).

MMP-7, MMP-9 și Catalaza nu au prezentat diferențe semnificative în țesuturile pulpare acut și cronic inflamate comparativ cu cele sănătoase. Rezultatele studiului de față în ceea ce privește concentrațiile Catalazei și MMP-9 vin în contradicție cu alte studii care indiferent de metoda moleculară de diagnostic (Zimografie, RT-PCR, Western-Blot, spectrofotometrie) au raportat nivel semnificativ crescut ($p < 0.05$) al acestor enzime în grupul de studiu reprezentat de țesut pulpar inflammat comparativ cu țesuturi pulpare sănătoase [7,103,108,112]. Similar cu primul studiu, după cunoștințele noastre nivelul MMP-7 nu a mai fost determinat în inflamații pulpare.

Osteocalcina, TGF- β 1 și IL-17 au prezentat concentrații crescute în pulpitele cronice închise comparativ cu cele acute ($p = 0.001/p = 0.035/p = 0.005$ respectiv). În leziuni periapicale cronice au fost observate niveluri crescute de IL-17 și TGF- β , semnalizarea TGF- β fiind esențială pentru formarea IL-17 de către celulele Th17 [144][145]. Mecanisme similare pot explica și nivelurile crescute ale acestor parametri în pulpitele cronice. Osteocalcina a

fost asociată cu prezența biomarkerilor angiogenezei și a putut fi detectată în zone de fibroză tisulară, aceste fenomene caracterizând inflamația cronică tisulară [101]. Se poate specula că și în pulpita cronică Osteocalcina prezintă mecanisme asemănătoare.

Și în cazul dT determinarea unor parametri moleculari și corelația cu simptomatologia clinică pot deveni utile în diagnosticarea precisă a stadiului de inflamație pulpară. În acest scop, prezentarea pacientului la tratament cât mai rapid este esențială în vederea îndepărtării țesutului pulpar într-o cantitate cât mai redusă și interceptarea inflamației într-o etapă reversibilă urmată de tratamente vitale în scopul menținerii vitalității și prevenirea pierderii dintelui cu toate consecințele nedorite.

Capitolul 8. Determinări biochimice în pulpitele acute ale dinților temporari și permanenți și stabilirea unor posibile corelații între diferitele tipuri de biomarkeri

8.1. Introducere

Scopul studiului a fost de a identifica dacă există diferențe la nivel molecular în ceea ce privește inflamația pulpară acută în cazul dinților temporari și permanenți. De asemenea, a fost evaluată prezența unor corelații între biomarkerii inflamației, a stresului oxidativ, a degradării ECM și a reparației și mineralizării țesuturilor dure dentare în condiții de sănătate și inflamație în dentiția temporară și permanentă.

- **Obiectiv specific #1:** Determinarea concentrației TNF- α , IL-2, IL-17, SOD-3, Catalazei, MMP-7, MMP-9, Osteocalcinei și TGF- β 1 în țesuturile pulpare acute inflamate recoltate de la dinții temporari *versus* cele obținute de la dinții permanenți și compararea lor.
- **Obiectiv specific #2:** Stabilirea unor eventuale corelații în ceea ce privește biomarkerii care iau parte în mecanismele inflamației (TNF- α , IL-2, IL-17), stresului oxidativ (SOD-3, Catalaza), degradării ECM (MMP-7, MMP-9) și reparației și mineralizării țesuturilor dure (Osteocalcina, TGF- β 1) în inflamația pulpară ireversibilă a dentiției temporare și permanente.
- **Obiectiv specific #3:** Determinarea unor posibile corelații între TNF- α , IL-2, IL-17, SOD-3, Catalaza, MMP-7, MMP-9, Osteocalcina și TGF- β 1 în stările fiziologice și patologice pulpare ale dinților temporari și permanenți.

8.2. Material și metodă

Studiul a inclus țesuturile pulpare sănătoase și inflamate ireversibil recoltate de la dinții temporari și permanenți ale copiilor și adolescenților, cu vârstă cuprinsă între 6-18 ani, care s-au prezentat pentru tratament în cadrul catedrei de Pedodonție, a Universității de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București. Criteriile de includere și excludere a pacienților sunt descrise la metodologia generală a cercetării.

În scopul atingerii primului obiectiv s-au stabilit 2 grupuri de studiu cu diagnostic clinic de pulpită acută totală. Lotul de studiu 1 a inclus 18 țesuturi pulpare inflamate acut obținute de la dT în timp ce al 2a lot de studiu a fost reprezentat de țesuturi pulpare inflamate acut de la dP ($n=23$).

Pentru îndeplinirea obiectivului 2 au fost stabilite 2 grupuri de studiu reprezentate de țesuturile pulpare inflamate ireversibil de la dT și dP. Lotul de studiu 1 a constat în țesuturi pulpare inflamate acut și cronic ($n=33$) de la dT iar lotul de studiu 2 a conținut 23 de țesuturi pulpare inflamate acut de la dP.

Pentru atingerea obiectivului 3, lotul total al dT a fost reprezentat de 46 probe de țesut pulpar ($n=13$ sănătoși, $n=18$ cu pulpită acută, $n=15$ cu pulpită cronică închisă) iar lotul total pentru dP a conținut 42 de probe de țesut pulpar ($n=19$ sănătoși, $n=23$ cu pulpită acută).

Criteriile de includere și excludere a pacienților sunt descrise la metodologia generală a cercetării.

Criterii de excludere dinți: dT/dP cu pulpită acută parțială, dT/dP cu necroză/gangrenă simplă/gangrenă complicată, dT/dP cu resorbție patologică/perforații/leziuni periapicale

Recoltarea țesuturilor pulpare, procesarea pentru obținerea lizatelor pulpare și analiza ELISA sandwich sunt descrise în „Metodologia generală a cercetării” și pentru fiecare dentiție în parte în studiile 1 și 2.

În ceea ce privește analiza statistică, pentru obiectivul 1 au fost utilizate testele Shapiro-Wilk, Mann-Whitney U, Student/Welch în funcție de tipul și distribuția fiecărei variabile conform descrierii din partea generală a cercetării, pentru stabilirea corelațiilor cu variabilele cantitative independente și distribuție parametrică a fost utilizat coeficientul de corelație Pearson, în timp ce corelațiile stabilite între variabilele cantitative independente cu distribuție non-parametrică au fost determinate folosind coeficientul de corelație Spearman's rho.

8.3. Rezultate

Între țesuturile pulpare inflamate acut ale dT și dP nu au fost observate diferențe semnificative din punct de vedere statistic (Tabel VIII.14.)

Tabel VIII.14. Comparația biomarkerilor în inflamațiile acute ale dT și dP

Biomarker	Lot pulpită acută dT (n=18), Valoare medie ± DS	Lot pulpită acută dP (n=23), Valoare medie ± DS	SS (p)
IL-2 (pg/mg prot.)	108 ± 32.77	113.21 ± 29.14	0.973**
IL-17 (pg/mg prot.)	130.71 ± 12.38	138.04 ± 16.54	0.167**
TNF-α (pg/mg prot.)	57.71 ± 10.78	54.435 ± 11.195	0.125***
MMP-7 (ng/mg prot.)	2.25 ± 0.69	2.3 ± 0.85	0.867***
MMP-9 (ng/mg prot.)	1.44 ± 0.53	1.496 ± 0.5	0.763**
SOD-3 (ng/mg prot.)	27.45 ± 8.31	26.32 ± 7.71	0.750**
Catalaza (U/mg prot.)	2.59 ± 0.75	2.67 ± 0.74	0.466**
Osteocalcina (ng/mg prot.)	5.87 ± 3	7.97 ± 4	0.305**
TGF-β1 (pg/mg prot.)	18.07 ± 4.5	23.16 ± 11.79	0.185***

(SS=Semnificație Statistică, prot.=proteine, * Welch T-Test, ** Student T-Test, *** Mann-Whitney U Test)

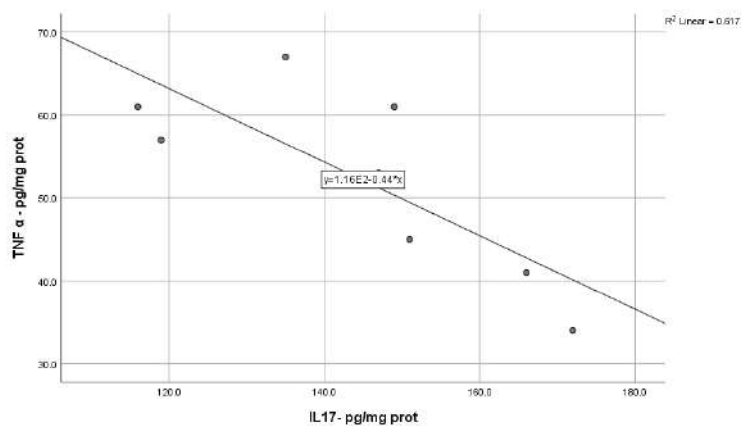


Figura 8.10. Corelația dintre TNF- α și IL-17 în lotul cu inflamație pulpară acută și cronică a dT

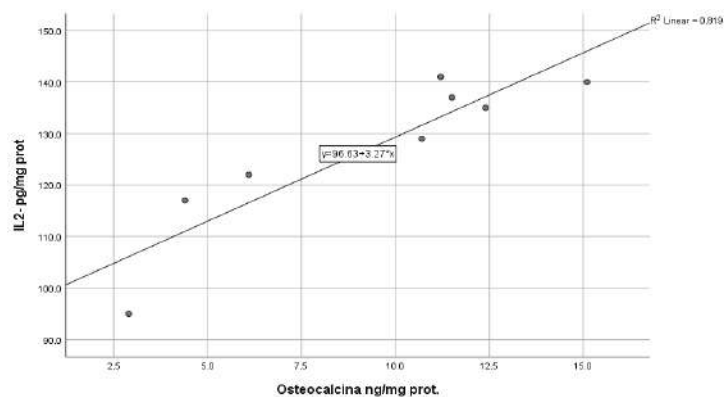


Figura 8.11. Corelația dintre IL-2 și Osteocalcina în lotul cu inflamație pulpară acută și cronică a dT

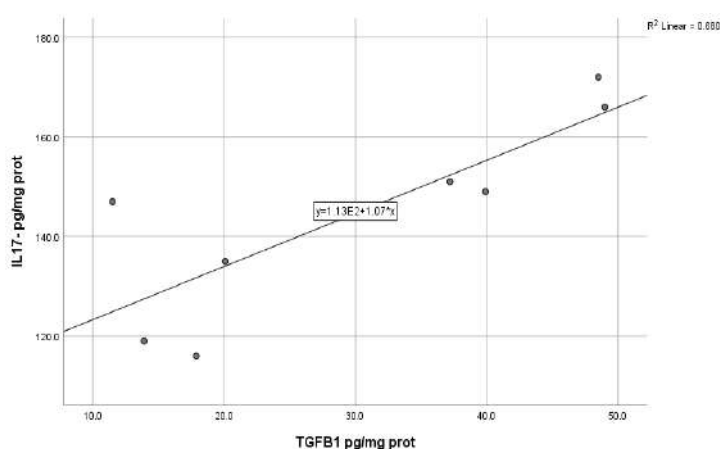


Figura 8.12. Corelația dintre IL-17 și TGF-β1 în lotul cu inflamație pulpară acută și cronică a dT

Figurile 8.10.-8.12. reprezintă corelațiile analizate între biomarkeri în probele pulpare cu inflamație ireversibilă acută și cronică a dT. Distribuția variabilelor este normală conform testului Shapiro-Wilk ($p > 0.05$). Majoritatea corelațiilor analizate sunt ne semnificative cu excepția următoarelor corelații:

- Corelația dintre TNF- α și IL-17 este semnificativă și negativă de grad înalt ($p = 0.021$, $R = -0.786$). Această arată că valorile mai mari de TNF- α s-au asociat mai frecvent cu valori mai mici de IL-17 și viceversa.
- Corelația dintre IL-2 și Osteocalcina este semnificativă și pozitivă de grad foarte înalt ($p = 0.002$, $R = 0.905$). Această reflectă faptul că valorile mai mari de IL-2 s-au asociat mai frecvent cu valori mai mari de Osteocalcină și viceversa.
- Corelația dintre IL-17 și TGF- $\beta 1$ este semnificativă și pozitivă de grad foarte înalt ($p = 0.012$, $R = 0.825$). Această indică că valorile mai mari de IL-17 s-au asociat mai frecvent cu valori mai mari de TGF- $\beta 1$ și viceversa.

În ceea ce privește corelațiile analizate între biomarkeri în lotul total al dT, distribuția variabilelor este non-parametrică în majoritatea variabilelor conform testului Shapiro-Wilk ($p < 0.05$). Au fost observate corelații semnificative în următoarele situații:

- Corelațiile observate între TNF- α și IL-2 ($p < 0.001$, $R = 0.811$), TNF- α și IL-17 ($p = 0.020$, $R = 0.544$), TNF- α și SOD-3 ($p < 0.001$, $R = 0.819$), TNF- α și Osteocalcina ($p = 0.012$, $R = 0.579$) și între TNF- α și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.008$, $R = 0.602$) sunt semnificative și pozitive de grad înalt sau foarte înalt. Această sugerează că valorile mai mari de TNF- α s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de IL-2, IL-17, SOD-3, osteocalcină și TGF- $\beta 1$.
- Corelațiile observate între IL-2 și IL-17 ($p = 0.001$, $R = 0.707$), IL-2 și SOD-3 ($p < 0.001$, $R = 0.806$), IL-2 și osteocalcină ($p = 0.001$, $R = 0.721$) și între IL-2 și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.016$, $R = 0.558$) sunt semnificative și pozitive de grad înalt sau foarte înalt. Această reflectă faptul că valorile mai mari de IL-2 s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de IL-17, SOD-3, osteocalcină și TGF- $\beta 1$.
- Corelațiile observate între IL-17 și SOD-3 ($p = 0.004$, $R = 0.639$), IL-17 și Osteocalcină ($p = 0.006$, $R = 0.624$) și între IL-17 și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.037$, $R = 0.494$) sunt semnificative și pozitive de grad moderat sau înalt. Această sugerează că valorile mai mari de IL-17 s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de SOD-3, Osteocalcină și TGF- $\beta 1$.
- Corelațiile observate între SOD-3 și osteocalcină ($p = 0.015$, $R = 0.562$) și între SOD-3 și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.025$, $R = 0.526$) sunt semnificative și pozitive de grad înalt. Această indică că valorile mai mari de SOD-3 s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de Osteocalcină și TGF- $\beta 1$.
- Corelația observată între Catalază și Osteocalcină ($p = 0.014$, $R = 0.567$) este semnificativă și pozitivă de grad înalt. Această arată că valorile mai mari de catalază s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de Osteocalcină.
- Corelația observată între Osteocalcină și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.005$, $R = 0.636$) este semnificativă și pozitivă de grad înalt. Această sugerează că valorile mai mari de osteocalcină s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de TGF- $\beta 1$.

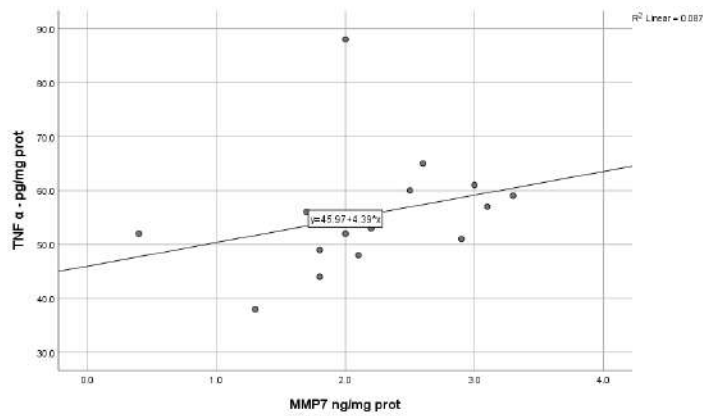


Figura 8.29. Corelația dintre TNF- α și MMP-7 în lotul cu inflamație pulpară ireversibilă simptomatică a dP

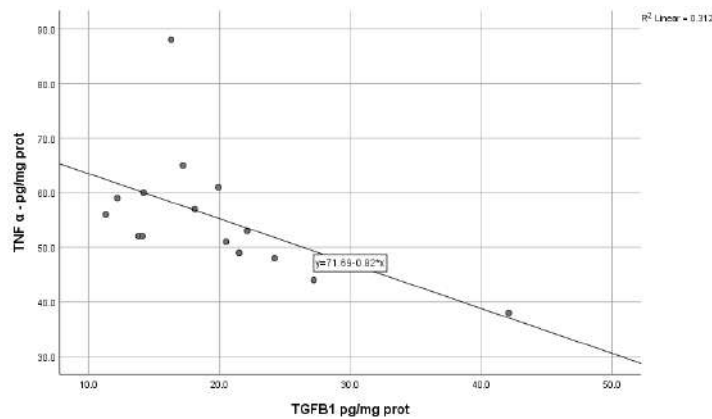


Figura 8.30. Corelația dintre TNF- α și TGF- β 1 în lotul cu inflamație pulpară ireversibilă simptomatică a dP

Figurile 8.29. - 8.30. reprezintă corelațiile analizate între biomarkeri în inflamațiile pulpare acute a dP. Distribuția variabilelor este normală conform testului Shapiro-Wilk ($p > 0.05$) cu excepția parametrilor TNF- α și TGF- β 1 ($p < 0.05$). Majoritatea corelațiilor analizate sunt ne semnificative cu excepția următoarelor corelații:

- Corelația dintre TNF- α și MMP-7 este semnificativă și pozitivă de grad moderat ($p = 0.045$, $R = 0.524$) ceea ce sugerează că valorile mai mari de TNF- α s-au asociat mai frecvent cu valori mai mari de MMP-7 și viceversa.
- Corelația dintre TNF- α și TGF- β 1 este semnificativă și negativă de grad moderat ($p = 0.019$, $R = -0.595$) care ne indică că valorile mai mari de TNF- α s-au asociat mai frecvent cu valori mai mici de TGF- β 1 și viceversa.

Corelațiile analizate între biomarkeri în lotul total al țesuturilor pulpare a dP arată că distribuția variabilelor este non-parametrică în majoritatea variabilelor conform testului

Shapiro-Wilk ($p < 0.05$) cu excepția parametrilor MMP-9, MMP-7 și Catalazei ($p > 0.05$).

Corelațiile semnificative observate sunt:

- Corelațiile observate între TNF- α și IL-2 ($p < 0.001$, $R = 0.715$), TNF- α și IL-17 ($p = 0.001$, $R = 0.651$), TNF- α și MMP-7 ($p < 0.001$, $R = 0.670$), TNF- α și SOD-3 ($p = 0.001$, $R = 0.624$), TNF- α și osteocalcină ($p = 0.006$, $R = 0.543$) și între TNF- α și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.038$, $R = 0.426$) sunt semnificative și pozitive de grad moderat sau înalt. Această indică faptul că valorile mai mari de TNF- α s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de IL-2, IL-17, MMP-7, SOD-3, osteocalcină și TGF- $\beta 1$;
- Corelațiile observate între IL-2 și IL-17 ($p < 0.001$, $R = 0.704$), IL-2 și SOD-3 ($p = 0.001$, $R = 0.638$), IL-2 și osteocalcină ($p < 0.001$, $R = 0.664$) și între IL-2 și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.002$, $R = 0.590$) sunt semnificative și pozitive de grad înalt. Această sugerează că valorile mai mari de IL-2 s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de IL-17, SOD-3, osteocalcină și TGF- $\beta 1$;
- Corelațiile observate între IL-17 și MMP-7 ($p = 0.010$, $R = 0.513$), IL-17 și SOD-3 ($p < 0.001$, $R = 0.823$), IL-17 și catalază ($p = 0.028$, $R = 0.448$), IL-17 și osteocalcină ($p = 0.001$, $R = 0.620$) și între IL-17 și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.002$, $R = 0.604$) sunt semnificative și pozitive de grad moderat sau înalt. Această indică că valorile mai mari de IL-17 s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de MMP-7, SOD-3, catalază, osteocalcină și TGF- $\beta 1$;
- Corelația observată între MMP-9 și catalază ($p = 0.034$, $R = 0.435$) este semnificativă și pozitivă de grad moderat. Această sugerează că valorile mai mari de MMP-9 s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de catalază;
- Corelațiile observate între MMP-7 și SOD-3 ($p = 0.008$, $R = 0.531$), MMP-7 și catalază ($p = 0.044$, $R = 0.415$) sunt semnificative și pozitive de grad moderat ceea ce indică, că valorile mai mari de MMP-7 s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de SOD-3 și Catalază;
- Corelațiile observate între SOD-3 și Osteocalcină ($p = 0.001$, $R = 0.628$) și între SOD-3 și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.001$, $R = 0.647$) sunt semnificative și pozitive de grad înalt. Această arată că valorile mai mari de SOD-3 s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de Osteocalcină și TGF- $\beta 1$;
- Corelația observată între Osteocalcină și TGF- $\beta 1$ ($p = 0.015$, $R = 0.492$) este semnificativă și pozitivă de grad moderat. Această indică, că valorile mai mari

de Osteocalcină s-au asociat semnificativ mai frecvent cu valori mai mari de TGF- β 1.

8.4. Discuții

Cu toate că între dT și dP există particularități cu diverse implicații clinice și terapeutice [177], pe baza acestor rezultate putem specula că la nivel molecular procesul inflamator ireversibil simptomatic ai pulpei dentare nu diferă în cele 2 dentiții.

În inflamația pulpară ireversibilă a dT a fost observată o relație invers proporțională între citokinele proinflamatorii, TNF- α și IL-17 ceea ce poate sugera un rol antagonist în inflamația pulpară ireversibilă a dT, rezultatele fiind în contrast cu alte studii care susțin existența unui rol sinergic între cele 2 citokine [146]. Corelațiile intens pozitive ale IL-2 cu Osteocalcina și IL-17 cu TGF- β 1 pot sugera tendința țesutului pulpar de a limita inflamația pulpară accentuată prin acțiunea IL, prin eliberarea concomitentă a Osteocalcinei și TGF- β 1 care pot participa la vindecarea țesutului pulpar prin formarea matricei dentinei terțiare.

În inflamațiile pulpare acute ireversibile ale dP, TNF- α a fost corelată pozitiv cu MMP-7 ceea ce confirmă rolul important al citokinelor în reglarea expresiei MMP. Concentrația ridicată a TNF- α poate influența activitatea crescută a MMP-7 în pulpitele dentare, MMP-7 putând avea la rândul ei un impact asupra procesului inflamator prin eliberarea unor cantități crescute de TNF- α . O relație invers proporțională a fost remarcată între TNF- α și TGF- β 1 în pulpitele acute ale dP, TNF- α fiind o citokină proinflamatorie care mediază și susține inflamația pulpară, în schimb TGF- β 1 este un factor de creștere care poate fi eliberat din dentină și are rol în sinteza proteinelor ECM participând la procesele de dentinogeneză. Astfel, concentrațiile reduse ale TNF- α și creșterea sintezei TGF- β 1 sugerează o tendință de reducere a inflamației pulpare și posibilitatea de vindecare și reparație pulpară (și viceversa).

În ceea ce privește corelațiile biomarkerilor în condiții de sănătate și patologie inflamatorie a dinților temporari și permanenți, majoritatea au prezentat corelații pozitive între ele care sugerează o interconecțiune a biomoleculelor care participă în mecanismele inflamației, a stresului oxidativ, a degradării ECM și reparației și mineralizării țesuturilor dure dentare, atât în pulpa dentară sănătoasă cât și în cea inflamată ireversibil în ambele dentiții.

În cazul dP sănătoși și cu pulpită acută au fost raportate corelații pozitive și între TNF- α cu MMP-7, IL-17 cu MMP-7, IL-17 cu Catalaza, MMP-7 cu SOD-3, MMP-7 cu Catalaza și SOD-3 cu TGF- β 1. Se poate observa o activitate enzimatică mai intensă în pulpitele acute

irreversibile ale dP și dinții sănătoși care ar putea fi explicată prin stabilirea unui diagnostic clinic mai precis (vârstă mai mare a pacienților incluși în studiu, informații concrete și corecte legate de simptomatologia, testele de vitalitate și percuția dintelui în ax mai concludente, maturitate SNC) comparativ cu dT (vârstă mai mică, limbaj și SNC insuficient dezvoltate, grad mai mare de frică). La dT țesutul pulpar la nivel molecular ar putea fi deja într-o etapă foarte avansată de inflamație comparativ cu observațiile clinice, eventual cu evoluție spre necroză, influențată și de modificările regresive care apar în mod fiziologic și care pot fi asociate cu distrucția sau depleția anumitor enzime.

9. Concluzii și contribuții personale

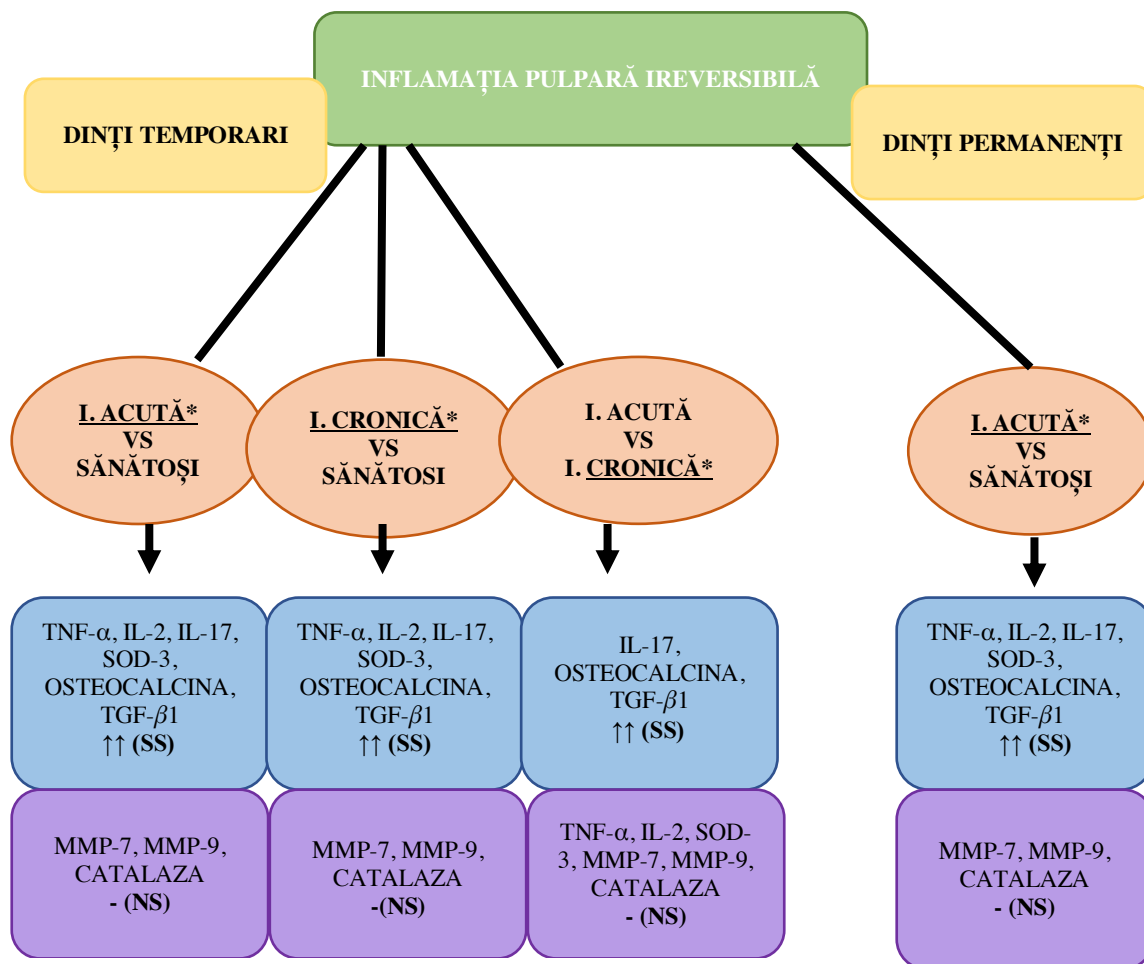
9.1. Concluzii

- În țesuturile pulpare inflamate ireversibil a dinților permanenți și temporari există o creștere a nivelului biomarkerilor TNF- α , IL-2, IL-17, SOD-3, Osteocalcinei și TGF- β 1 (Figura 9.1.1.).
- Biomarkeri cu nivel crescut pot avea un rol important în procesele inflamatorii pulpare ale dinților temporari și permanenți a copiilor și adolescenților.
- IL-17, Osteocalcina și TGF- β 1 au prezentat nivele crescute în pulpitele cronice comparativ cu cele acute ale dinților temporari și pot fi considerați parametri candidați în diferențierea celor două tipuri de inflamație (Figura 9.1.1.).
- Lipsa modificărilor semnificative ale MMP-7, MMP-9 și Catalazei între loturile de control și de studiu, atât la dinții temporari cât și la cei permanenți, pot sugera existența unei faze avansate a inflamației pulpare ireversibile spre stadiul de necroză asociată cu scăderea producției/distrucției enzimelor respective.
- Corelațiile semnificative reduse în loturile de studiu cu inflamație pulpară ireversibilă în ambele dentiții indică necesitatea cercetării suplimentării în domeniu pentru evidențierea cu exactitate a rolului și mecanismelor biomarkerilor în condiții de inflamație pulpară.
- Evidențierea prezenței tuturor biomarkerilor în toate probele de țesut pulpar recoltate (sănătoase și cu inflamație ireversibilă) și corelațiile semnificative între majoritatea biomoleculilor în condiții generale de sănătate și patologie sugerează rolul major și implicarea lor atât în mecanismele de menținerea a homeostaziei țesuturilor pulpare, cât și în cazul agresiunii bacteriene cu instalarea inflamației.

- Se poate confirma lipsa neconcordanței între simptomatologia clinică și mecanismele moleculare, aspect întâlnit frecvent în special în cazul dentiției temporare.
- Absența diferențelor semnificative în cazul determinării biomarkerilor în pulpitele acute ale dinților temporari comparativ cu cei permanenți indică prezența unor mecanisme moleculare similare în cele 2 dentiții cu toate că există particularități morfo-structurale între dinții temporari și permanenți.
- Gradul de cooperare a pacienților pediatrici, comunicarea și exprimarea mai dificilă, dar și rezultatele incerte ale testelor clinice și paraclinice reprezintă un factor esențial în crearea condițiilor pentru recoltarea probelor de țesut pulpar și o posibilă cauză a lipsei cercetărilor care studiază prezența biomarkerilor în pulpitele dinților temporari și permanenți a copiilor și adolescenților.
- Testele clinice diagnostice tradiționale utilizate pentru determinarea prezenței inflamației pulpare sunt strict subiective și pot avea interpretări variabile, iar nivelul expertizei profesionale variază și pot apărea discrepanțe în interpretarea lor în special în cazul copiilor și adolescenților.
- Constatările studiilor sugerează necesitatea unor modalități de diagnostic moleculare care ar putea fi asociate cu datele clinice pentru elaborarea diagnosticului de certitudine, ideal cât mai precoce.
- Este imperioasă punerea în practică a metodelor moleculare de diagnostic cu stabilirea unor valori prag a biomarkerilor în funcție de tipul inflamației (reversibilă/irreversibilă) precum și găsirea unor instrumente fezabile de utilizat în practica zilnică.
- Numărul mic de probe de țesut pulpar utilizate, dar și dinamica proprie a procesului inflamator pulpar pot fi factori cauzali în diversitatea rezultatelor față de alte studii.
- Identificarea unor noi parametri de evaluare mai precisă a diagnosticului și realizarea unor tratamente mai puțin invazive trebuie luate în calcul în special în cazul proceselor inflamatorii la copii și adolescenți.
- Găsirea unor noi modalități de determinare inflamației pulpare la nivel molecular prin metode mai puțin invaziv, precum recoltarea salivei de la pacienți cu pulpite și asocierea cu datele clinice.
- Amânarea tratamentelor și controalelor stomatologice și prezentarea tardivă în fazele avansate ale inflamației conduc la necesitatea realizării unor tratamente radicale precum îndepărtarea în totalitate a țesutului pulpar cu multiple consecințe în ambele

dențiții (dinți casanți, fragili cu risc de fractură, pierderea precoce, malpoziții, malocluzii).

- Stabilirea unor diagnostice cât mai precoce și realizarea unor tratamente pulpare vitale reprezintă standardul de aur în special în cazul dinților permanenți tineri în scopul continuării apexogenezei.



(*semnificativ statistic (SS), NS=fără semnificație statistică, I=inflamație)

Figura 9.1.1. Concluzii

Literatura de specialitate este caracterizată prin lipsă de studii în ceea ce privește diagnosticul molecular al inflamației pulpare la copii și adolescenți, astfel aceste determinări, precum și pacienți de la care au fost obținute probele de țesut pulpar, conferă lucrări de față un caracter inovativ și original.

Contribuțiile personale ale prezentei cercetări sunt reprezentate de:

Rezultatele **capitolului 6** care arată nivelurile crescute a biomarkerilor TNF- α , IL-2, IL-17, SOD-3, Osteocalcina și TGF- β 1 în pulpile ireversibile acute ale dP obținute de la copii și adolescenți ceea ce nu s-a studiat până acum după cunoștințele noastre (cu excepția SOD, dar cu rezultate incerte). De asemenea, în acest studiu a fost determinată pentru prima

dată prezența și concentrația MMP-7 în inflamații pulpare ireversibile ale copiilor și adolescenților. În plus, au fost determinați biomarkeri, precum Osteocalcina și TGF- β 1, care în trecut au fost evaluați într-un număr foarte limitat de cercetări. Diagnosticul molecular unor astfel de parametri poate deveni util prin asociere cu simptomatologia și semnele clinice ale pacientului-copil în vederea stabilirii un diagnostic precoce a patologiei pulpare în stadiile reversibile urmat de tratamente vitale mai puțin invazive cu îndepărtarea parțială a țesutului pulpar, menținerea vitalității pulpare și continuarea apexogenezei în cazul dP tineri.

Studiul din **capitolul 7** s-a bazat pe evaluarea concentrației diversilor biomarkeri în pulpите acute, pulpите cronice și țesuturi pulpare sănătoase prelevate de la dT ai copiilor și adolescenților, ceea ce nu a reprezentat până acum o temă studiată în literatura de specialitate după cunoștințele noastre. Studiul de față și-a propus să arate importanța aplicării metodelor moleculare și în cazul inflamației dT iar rezultatele arată că TNF- α , IL-2, IL-17, SOD-3, Osteocalcina și TGF- β 1 pot fi utilizați ca biomarkeri de bază în diagnosticul pulpitelor acute și cronice ale dT. De asemenea, pentru prima dată au fost studiați comparativ diverși biomarkeri în pulpите acute și cronice în dentiția temporară, iar constatările studiului nostru sugerează un rol major al IL-17, Osteocalcinei și TGF- β 1 în pulpитеle cronice. Și în acest studiu se observă importanța stabilirii unor metode moleculare de diagnostic precoce pentru evitarea tratamentelor radicale urmate de multe ori de pierderea dinților.

Capitolul 8 a urmărit să determine existența unor diferențe în ceea ce privește nivelul TNF- α , IL-2, IL-17, SOD-3, Catalazei, MMP-7, MMP-9, Osteocalcinei și TGF- β 1 în pulpитеle acute ale dT și dP. Și acest aspect nu a fost studiat până acum după cunoștințele noastre, iar rezultatele studiului sugerează mecanisme similare în ceea ce privește inflamația, stresul oxidativ, degradarea ECM și mineralizarea și reparația țesuturilor în ambele dentiții. Nu au fost găsite studii cu temă asemănătoare, nici studii care să determine prezența corelațiilor în țesuturile pulpare inflamate și sănătoase ale copiilor și adolescenților. Corelațiile pozitive între diverși biomarkeri în țesuturile pulpare sănătoase și în inflamația pulpară arată existența unor interconecțiuni în ceea ce privește parametrii studiați în ambele dentiții. Corelațiile negative observate în inflamațiile pulpare ireversibile ale dT și dP pot sugera existența unor roluri antagoniste între anumiți biomarkeri și uneori roluri de sinergism cu reducerea inflamației și accentuarea proceselor reparatorii.

Deși studiile din prezenta cercetare au avut la bază determinări efectuate pentru prima dată, fie cazul unor biomarkeri, precum MMP-7, fie tipul de dentiție de la care s-au obținut țesuturile pulpare, mai multe cercetări sunt necesare pentru elucidarea rolului exact a biomarkerilor studiați, dar și a altor parametrii în vederea punerii în practică.

Bibliografie (selectivă)

1. **Kritikou, K.;** Imre, M.; Tanase, M.; Vinereanu, A.; Ripszky Totan, A.; Spinu, T.-C.; Miricescu, D.; Stanescu-Spinu, I.-I.; Bordea, M.; Greabu, M. Assessment of Mineralization, Oxidative Stress, and Inflammation Mechanisms in the Pulp of Primary Teeth. *Applied Sciences* **2022**, *12*, doi:10.3390/app12031554.
3. **Kritikou, K.;** Greabu, M.; Imre, M.; Miricescu, D.; Ripszky Totan, A.; Burcea, M.; Stanescu-Spinu, I.-I.; Spinu, T. ILs and MMPs Levels in Inflamed Human Dental Pulp: A Systematic Review. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26144129.
5. Zanini, M.; Meyer, E.; Simon, S. Pulp Inflammation Diagnosis from Clinical to Inflammatory Mediators: A Systematic Review. *J Endod* **2017**, *43*, 1033-1051, doi:10.1016/j.joen.2017.02.009.
7. Suwanchai, A.; Theerapiboon, U.; Chattipakorn, N.; Chattipakorn, S.C. NaV 1.8, but not NaV 1.9, is upregulated in the inflamed dental pulp tissue of human primary teeth. *Int Endod J* **2012**, *45*, 372-378, doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01986.x.
8. Tulunoglu, O.; Alacam, A.; Bastug, M.; Yavuzer, S. Superoxide dismutase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in children. *J Clin Pediatr Dent* **1998**, *22*, 341-345.
33. **Kritikou, K.;** Imre, M.; Tanase, M.; Vinereanu, A.; Totan, A.R.; Spinu, C.T.; Ilinca, R.; Miricescu, D.; Stanescu-Spinu, I.-I.; Greabu, M. Biochemical Mapping of the Inflamed Human Dental Pulp. *Applied Sciences* **2021**, *11*, doi:10.3390/app112110395.
76. Elsalhy, M.; Azizieh, F.; Raghupathy, R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J* **2013**, *46*, 573-580, doi:10.1111/iej.12030.
101. Abd-Elmeguid, A.; Abdeldayem, M.; Kline, L.W.; Moqbel, R.; Vliagoftis, H.; Yu, D.C. Osteocalcin expression in pulp inflammation. *J Endod* **2013**, *39*, 865-872, doi:10.1016/j.joen.2012.12.035.
103. Gusman, H.; Santana, R.B.; Zehnder, M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci* **2002**, *110*, 353-357, doi:10.1034/j.1600-0722.2002.21347.x.
108. Tsai, C.H.; Chen, Y.J.; Huang, F.M.; Su, Y.F.; Chang, Y.C. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *J Endod* **2005**, *31*, 860-862, doi:10.1097/01.don.0000164851.55389.4e.
112. Accorsi-Mendonca, T.; Silva, E.J.; Marcaccini, A.M.; Gerlach, R.F.; Duarte, K.M.; Pardo, A.P.; Line, S.R.; Zaia, A.A. Evaluation of gelatinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, and myeloperoxidase protein in healthy and inflamed human dental pulp tissue. *J Endod* **2013**, *39*, 879-882, doi:10.1016/j.joen.2012.11.011.
142. Rauschenberger, C.R.; Bailey, J.C.; Cootauco, C.J. Detection of human IL-2 in normal and inflamed dental pulps. *J Endod* **1997**, *23*, 366-370, doi:10.1016/S0099-2399(97)80184-7.
143. Anderson, L.M.; Dumsha, T.C.; McDonald, N.J.; Spitznagel, J.K., Jr. Evaluating IL-2 levels in human pulp tissue. *J Endod* **2002**, *28*, 651-655, doi:10.1097/00004770-200209000-00006.
144. Wei, L.; Liu, M.; Xiong, H.; Peng, B. Up-regulation of IL-23 expression in human dental pulp fibroblasts by IL-17 via activation of the NF-kappaB and MAPK pathways. *Int Endod J* **2018**, *51*, 622-631, doi:10.1111/iej.12871.
145. Cardoso, C.R.; Garlet, G.P.; Crippa, G.E.; Rosa, A.L.; Junior, W.M.; Rossi, M.A.; Silva, J.S. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of

- human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* **2009**, *24*, 1-6, doi:10.1111/j.1399-302X.2008.00463.x.
146. Yu, J.J.; Gaffen, S.L. Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci* **2008**, *13*, 170-177, doi:10.2741/2667.
151. Xiong, H.; Wei, L.; Peng, B. IL-17 stimulates the production of the inflammatory chemokines IL-6 and IL-8 in human dental pulp fibroblasts. *Int Endod J* **2015**, *48*, 505-511, doi:10.1111/iej.12339.
152. Liu, M.; Zhao, Y.; Wang, C.; Luo, H.; A, P.; Ye, L. Interleukin-17 plays a role in pulp inflammation partly by WNT5A protein induction. *Arch Oral Biol* **2019**, *103*, 33-39, doi:10.1016/j.archoralbio.2019.05.003.
153. Kokkas, A.B.; Goulas, A.; Varsamidis, K.; Mirtsou, V.; Tziafas, D. Irreversible but not reversible pulpitis is associated with up-regulation of tumour necrosis factor-alpha gene expression in human pulp. *Int Endod J* **2007**, *40*, 198-203, doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01215.x.
155. Pezelj-Ribaric, S.; Anic, I.; Brekalo, I.; Miletic, I.; Hasan, M.; Simunovic-Soskic, M. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res* **2002**, *33*, 482-484, doi:10.1016/s0188-4409(02)00396-x.
156. Bodor, C.; Matolcsy, A.; Bernath, M. Elevated expression of Cu, Zn-SOD and Mn-SOD mRNA in inflamed dental pulp tissue. *Int Endod J* **2007**, *40*, 128-132, doi:10.1111/j.1365-2591.2006.01196.x.
158. Davis, W.L.; Jacoby, B.H.; Craig, K.R.; Wagner, G.; Harrison, J.W. Copper-zinc superoxide dismutase activity in normal and inflamed human dental pulp tissue. *J Endod* **1991**, *17*, 316-318, doi:10.1016/S0099-2399(06)81698-5.
159. Baumgardner, K.R.; Sulfaro, M.A. The anti-inflammatory effects of human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on pulp inflammation. *J Endod* **2001**, *27*, 190-195, doi:10.1097/00004770-200103000-00014.
160. Varvara, G.; Traini, T.; Esposito, P.; Caputi, S.; Perinetti, G. Copper-zinc superoxide dismutase activity in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J* **2005**, *38*, 195-199, doi:10.1111/j.1365-2591.2005.00936.x.
164. Sloan, A.J.; Perry, H.; Matthews, J.B.; Smith, A.J. Transforming growth factor-beta isoform expression in mature human healthy and carious molar teeth. *Histochem J* **2000**, *32*, 247-252, doi:10.1023/a:1004007202404.
165. Piattelli, A.; Rubini, C.; Fioroni, M.; Tripodi, D.; Strocchi, R. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) expression in normal healthy pulps and in those with irreversible pulpitis. *Int Endod J* **2004**, *37*, 114-119, doi:10.1111/j.0143-2885.2004.00758.x.
169. Esposito, P.; Varvara, G.; Caputi, S.; Perinetti, G. Catalase activity in human healthy and inflamed dental pulps. *Int Endod J* **2003**, *36*, 599-603, doi:10.1046/j.1365-2591.2003.00692.x.
171. Letra, A.; Ghaneh, G.; Zhao, M.; Ray, H., Jr.; Francisconi, C.F.; Garlet, G.P.; Silva, R.M. MMP-7 and TIMP-1, new targets in predicting poor wound healing in apical periodontitis. *J Endod* **2013**, *39*, 1141-1146, doi:10.1016/j.joen.2013.06.015.

Lista cu lucrările științifice publicate

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

- **Kritikou, K.;** Greabu, M.; Imre, M.; Miricescu, D.; Ripszky Totan, A.; Burcea, M.; Stanescu-Spinu, I.-I.; Spinu, T. ILs and MMPs Levels in Inflamed Human Dental Pulp: A Systematic Review. *Molecules* 2021, 26, 4129.
<https://doi.org/10.3390/molecules26144129>
<https://www.mdpi.com/1420-3049/26/14/4129/htm>
FI al revistei în momentul publicării: 4.411
- **Kritikou, K.;** Imre, M.; Tanase, M.; Vinereanu, A.; Totan, A.R.; Spinu, T.-C.; Ilinca, R.; Miricescu, D.; Stanescu-Spinu, I.-I.; Greabu, M. Biochemical Mapping of the Inflamed Human Dental Pulp. *Appl. Sci.* 2021, 11, 10395.
<https://doi.org/10.3390/app112110395>
<https://www.mdpi.com/2076-3417/11/21/10395/htm>
FI al revistei în momentul publicării: 2.679
- **Kritikou, K.;** Imre, M.; Tanase, M.; Vinereanu, A.; Ripszky Totan, A.; Spinu, T.-C.; Miricescu, D.; Stanescu-Spinu, I.-I.; Bordea, M.; Greabu, M. Assessment of Mineralization, Oxidative Stress, and Inflammation Mechanisms in the Pulp of Primary Teeth. *Appl. Sci.* 2022, 12, 1554.
<https://doi.org/10.3390/app12031554>
<https://www.mdpi.com/2076-3417/12/3/1554/htm>
FI al revistei în momentul publicării: 2.679

Participări la manifestări științifice

- **Kritikou, K.;** Ripzky Totan, A.; Imre, M.; Spinu, T.-C.; Tanase, M.; Greabu, M. A correlation study applied to biochemical biomarkers of inflammation, oxidative stress and extracellular matrix in human dental pulp. Congresul Universității de Medicină și Farmacie “Carol Davila”, București, 25-27 Noiembrie 2021- Diplomă de Excelență în cadrul sesiunii tânărului cercetător-Medicină Dentară

- **Kritikou, K.;** Greabu, M.; Ripzky Totan, A.; Miricescu, D.; Tanase, M. Assessment of biochemical markers in young human dental pulp tissue. 16th EAPD Congress. Lisabona, 15-18 Iunie 2022.
- Enasescu, D.; Ripzky Totan, A.; **Kritikou, K.;** Miricescu, D.; Stanescu, I.; Greabu, M. Assessment of mineralization, oxidative stress, and inflammation mechanisms in primary teeth's pulp. IADR Congress, 100th General Session & Exhibition. 20-25 Iunie 2022, online.

Alte distincții

- Competiția PRECISI2021: Premiera articolului „ILs and MMPs levels in inflamed human dental pulp: A systematic review”, publicat în revista Molecules (eISSN: 1420-3049), cu F.I. la data publicării: 4.411, Premiul corespunzător articolului: 2000 Lei