

**„UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ  
ORTODONȚIE I**

**DANIEL BREBAN- SCHWARZKOPF**



# **REZUMAT**

**EVALUAREA FARMACOTOXICOLOGICĂ A  
COMPUSILOR CU POTENTIAL TERAPEUTIC ÎN  
PATOLOGIILE ORALE**

Coordonator științific

**PROF. UNIV. DR. SZUHANEK CAMELIA  
ALEXANDRINA**

**Timișoara  
2024**

## TABLE OF CONTENTS

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| LIST OF PUBLISHED SCIENTIFIC PAPERS .....                                   | <b>Error!</b>                       |
| <b>Bookmark not defined.</b>  |                                     |
| LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS .....                                     | <b>Error!</b>                       |
| <b>Bookmark not defined.</b>  |                                     |
| LIST OF FIGURES .....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| LIST OF TABLES .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| DEDICATION.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| INTRODUCTION.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| I. GENERAL PART .....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 1. Oral diseases: a public health challenge ....                            | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 1.1. General aspects .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 1.2. The oral diseases - multifactorial etiology                            | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 1.3. The main oral pathologies - classification                             | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 1.4. Effects of oral pathologies on society .....                           | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 2. Natural and synthetic compounds with applicability in oral diseases..... | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 2.1. Applications of synthetic compounds.....                               | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 2.2. Applications of natural compounds .....                                | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| II. SPECIAL PART .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 1. General aspects .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| 2. Methodology .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| Design .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 3. Equipment.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 4. Statistical analysis .....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 5. STUDY I. COMPREHENSIVE IN VITRO AND IN OVO<br>ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY: UNRAVELING THE IMPACT<br>OF SODIUM FLUORIDE, XYLITOL, AND THEIR SYNERGISTIC<br>ASSOCIATIONS IN DENTAL PRODUCTS.... | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 5.1. INTRODUCTION - AIM OF THE STUDY  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 5.2. MATERIALS AND METHODS.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 5.3. RESULTS.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 5.4. DISCUSSION .....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 5.5. CONCLUSIONS.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 6. STUDY II. EUGENOL - A NATURAL ALTERNATIVE IN<br>DENTISTRY: AN IN VITRO AND IN OVO BIOSAFETY<br>ASSESSMENT .....  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 6.1. INTRODUCTION - AIM OF THE STUDY  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 6.2. MATERIALS AND METHODS.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 6.3. RESULTS.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 6.4. DISCUSSION .....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| 6.5. CONCLUSIONS.....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| CONCLUSIONS .....   | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| Published articles <i>in extenso</i>  | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |

## REZUMAT

### INTRODUCERE

Prevalența globală a cariilor dentare, persistă ca o preocupare proeminentă și consecventă în domeniul sănătății publice. Caria dentară este una dintre cele mai răspândite afecțiuni cronice, afectând indivizii cu o predispoziție specială precum copii, adolescenți și vârstnici. Această incidență rezultă dintr-o interacțiune complexă de factori, cuprinzând în mod predominant interacțiunile dinamice dintre microorganismele orale, carbohidrații fermentabili și suprafețele dentare susceptibile.

Însoțită de practici inadecvate de igienă orală, o dietă caracterizată prin conținut ridicat de zahăr și factori determinanți socio-economici, predispoziția la carii dentare este sporită. În ciuda progreselor în strategiile preventive, cum ar fi introducerea apei fluorurate, a materialelor de etanșare dentare și a îmbunătățirii educației pentru sănătatea orală, cariile dentare continuă să afecteze un segment considerabil al populației, dând naștere disconfortului și durerii și impunând sarcini economice substanțiale sistemelor de sănătate. O abordare vigilentă a îngrijirii bucale, examinările dentare de rutină și inițiativele cuprinzătoare de sănătate publică trebuie să persiste ca eforturi esențiale în atenuarea incidenței patologiilor dentare, încurajând în același timp sănătatea orală generală. Datorită incidenței mari a reacțiilor adverse neplăcute la compușii sintetici, produsele naturale tind să înlocuiască treptat tratamentul convențional, deoarece pot fi la fel de puternice și

pot provoca mai puține efecte adverse, mai ușoare. Cercetătorii folosesc mai multe metode pentru a măsura eficacitatea și profilul de siguranță al acestor compuși, iar utilizarea tehnicilor standard contribuie, de asemenea, la progresul în toate disciplinele medicale.

Relația dintre cariile dentare și carcinogeneza orală, în special neoplasmul osoase, a fost examinată riguros în literatura științifică. Cariile dentare influențează indirect etiologia cancerului oral prin mecanisme care implică inflamația cronică, perturbarea mucoasei bucale, modificările microbiomului oral și expunerea pe termen lung la potențialii cancerigeni. În timp ce inferențe cauzale directe asupra malignităților osoase din cavitatea bucală rămân rare, factorii de risc comportamentali împărtășiți, cum ar fi consumul de tutun și consumul de alcool, evidențiază importanța intervenției stomatologice timpurii și a adoptării unui stil de viață care să promoveze sănătatea. Aceste măsuri sunt cruciale pentru atenuarea riscurilor colective asociate patologiilor orale.

Prima parte a acestei teze prezintă informații din literatura de specialitate recentă despre patologiile bucale, cauzele care duc la apariția principalelor boli bucale și impactul acestor boli asupra societății. Ulterior, în al doilea capitol, au fost abordate o serie de compuși naturali și sintetici cu aplicabilitate în bolile bucale. Au fost sintetizate acțiunile terapeutice și efectele adverse ale celor mai cunoscuți compuși din medicina dentară.

Partea specială, cu contribuții personale, a inclus o analiză detaliată *in vitro* și *in ovo* a fluorurii de sodiu (NaF), xilitol (Xyl) și eugenol (EUG) privind comportamentul celular și efectele pe membrana corioalantoică de ou de găină.

## **SCOP**

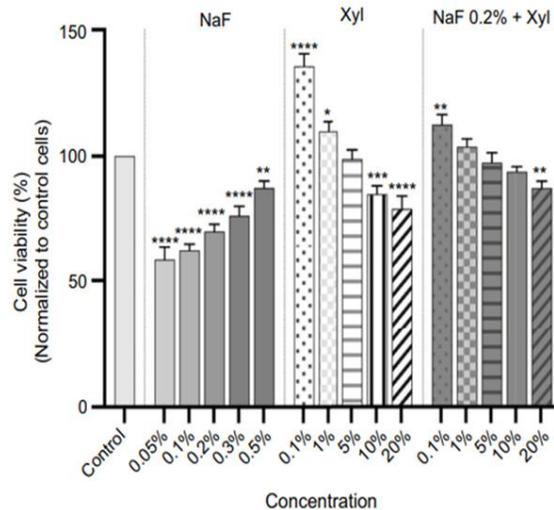
Studiile au evaluat cuprinzător diferiți parametri, inclusiv viabilitatea și morfologia celulară, efectele asupra confluenței și nucleilor pentru compusul natural EUG și, în plus, acțiunea asupra filamentelor de actină, precum și activitățile

enzimatice ale caspazelor 3/7 și 9 și nivelurile de expresie ale genelor anti-apoptotice și pro-apoptotice pentru NaF și Xyl. În plus, ambele studii au examinat efectele iritante ale acestor substanțe asupra membranei corioalantoice.

## **REZULTATE**

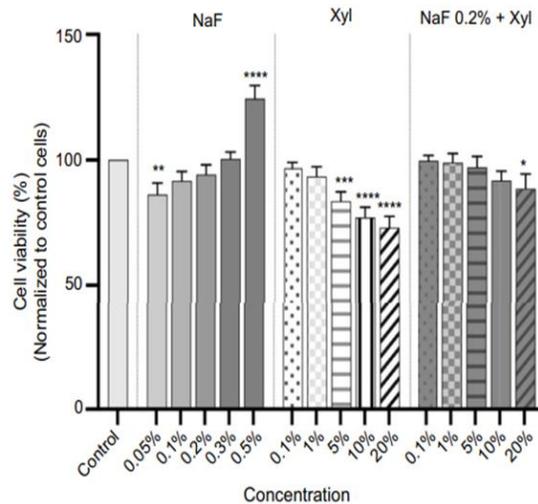
### **STUDIUL I. EVALUAREA *IN VITRO* ȘI *IN OVO* A CITOTOXICITĂȚII: IMPACTUL FLUORURII DE SODIU, XILITOLULUI ȘI AL ASOCIERII LOR ÎN PRODUSELE DENTARE**

Datele au arătat că cea mai scăzută concentrație de NaF de 0,05% a redus semnificativ viabilitatea celulară, atingând o scădere maximă de 58%. Pe măsură ce concentrațiile au crescut, efectul citotoxic a scăzut, rămânând vizibil, cu viabilitatea celulară de aproximativ 87% la concentrația de 0,5%. În schimb, Xyl a demonstrat un efect opus asupra viabilității celulelor HaCaT. Cea mai scăzută concentrație evaluată de Xyl (0,1%) a crescut semnificativ viabilitatea celulară la aproximativ 136%, iar la 1%, creșterea a fost de aproximativ 109% (Figura 1).



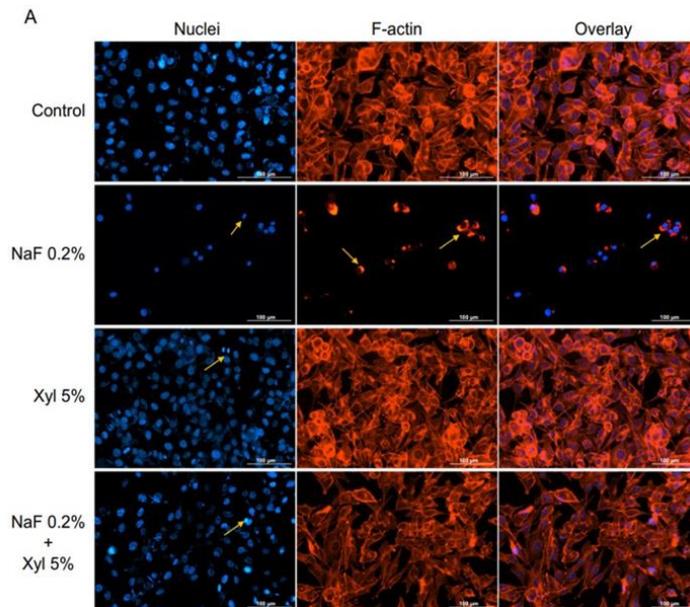
**Figura 1.** Efectele citotoxice ale NaF la diferite concentrații, Xyl la diferite concentrații și o combinație de 0,2% NaF cu diferite concentrații de Xyl pe celulele HaCaT după o perioadă de tratament de 24 de ore.

Un model comparabil manifestat în contextul liniei celulare de osteosarcom, SAOS-2. Tratamentul cu NaF la acest nivel celular a dus la o creștere a viabilității celulare corespunzătoare creșterii concentrației. Mai exact, la cea mai mare concentrație de 0,5%, a fost observată o creștere notabilă a capacității celulare, de aproximativ 124%. În același timp, Xyl a prezentat o reducere dependentă de doză a viabilității celulare. Cele două concentrații inițiale de Xyl examinate nu au produs o scădere demnă de remarcat a procentului de celule viabile (Figura 2).



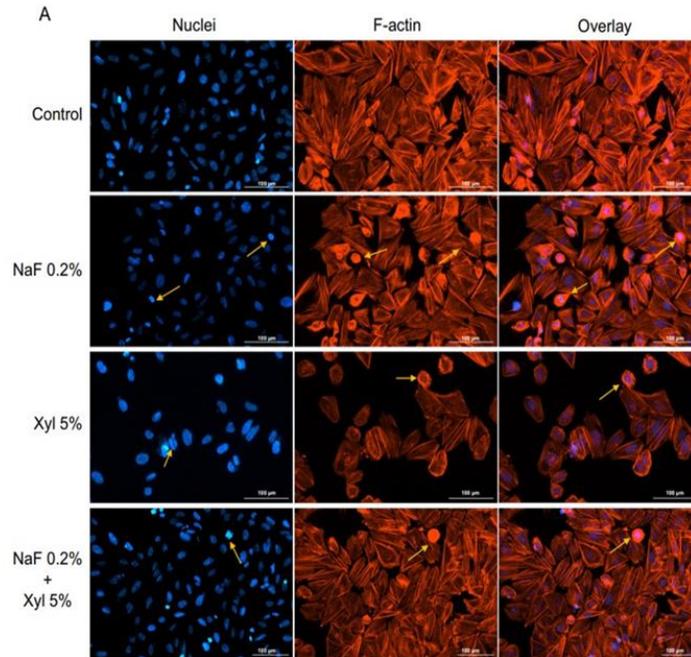
**Figura 2.** Efectele citotoxice ale NaF la diferite concentrații, Xyl la diferite concentrații și o combinație de 0,2% NaF cu diferite concentrații de Xyl pe celulele SaOS-2 după o perioadă de tratament de 24 de ore.

În celulele HaCaT, NaF a provocat modificări semnificative în structura nucleară, ducând la o reducere a dimensiunii și a numărului de nuclee și la condensarea cromatinei. NaF a declanșat, de asemenea, reorganizarea și condensarea puternică a filamentelor de actină. În schimb, Xyl la 5% nu a afectat în mod semnificativ structura filamentului nuclear sau de actină, cu excepția unei anumite fragmentări nucleare. Combinația de NaF și Xyl a condus doar la o condensare minoră a cromatinei, organele celulare rămânând similare cu cele din celulele netratate (Figura 3).



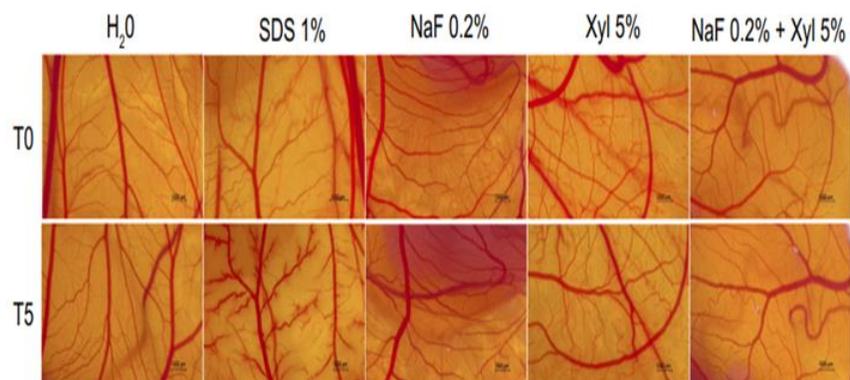
**Figura 3.** Examinarea modificărilor structurilor filamentelor nucleare și de actină prin imunofluorescență în celulele HaCaT, în urma tratamentului cu concentrații sub-citotoxice de NaF, Xyl și combinația lor.

În celulele SAOS-2, NaF la 0,2% a provocat o ușoară condensare a cromatinei și reorganizarea filamentelor de actină, dar aceste modificări nu au fost semnificativ diferite de celulele de control. În schimb, Xyl a indus modificări mai pronunțate, inclusiv condensarea cromatinei, fragmentarea nucleară, formarea de corpuri apoptotice și reorganizarea filamentelor de actină într-un inel periferic. Când NaF și Xyl au fost combinate, au provocat o condensare ușoară a nucleelor și a filamentelor de actină, dar efectele au fost mai puțin intense în comparație cu Xyl singur (Figura 4).



**Figura 4.** Examinarea modificărilor structurilor filamentelor nucleare și de actină prin imunofluorescență în celulele SaOS-2, în urma tratamentului cu concentrații sub-citotoxice de NaF, Xyl și combinația lor.

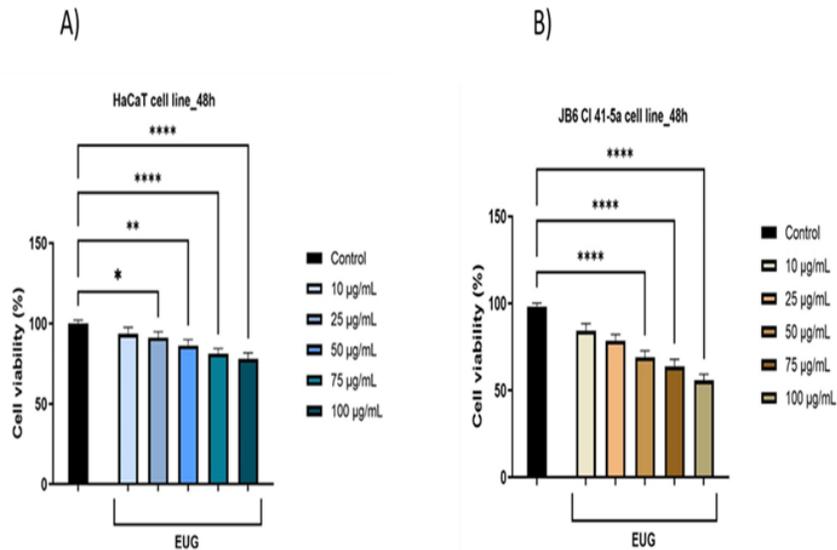
Aplicarea NaF la nivelul plexului vascular a provocat manifestări de iritație vasculară, caracterizată prin liză vasculară și microhemoragie. În schimb, Xyl nu a indus modificări substanțiale, ci mai degrabă a indus o dilatare ușoară a vaselor de sânge (Figura 5).



**Figura 5.** Evaluarea potențialului iritant al NaF, Xyl și al combinației lor (NaF + Xyl) utilizând testul HET-CAM.

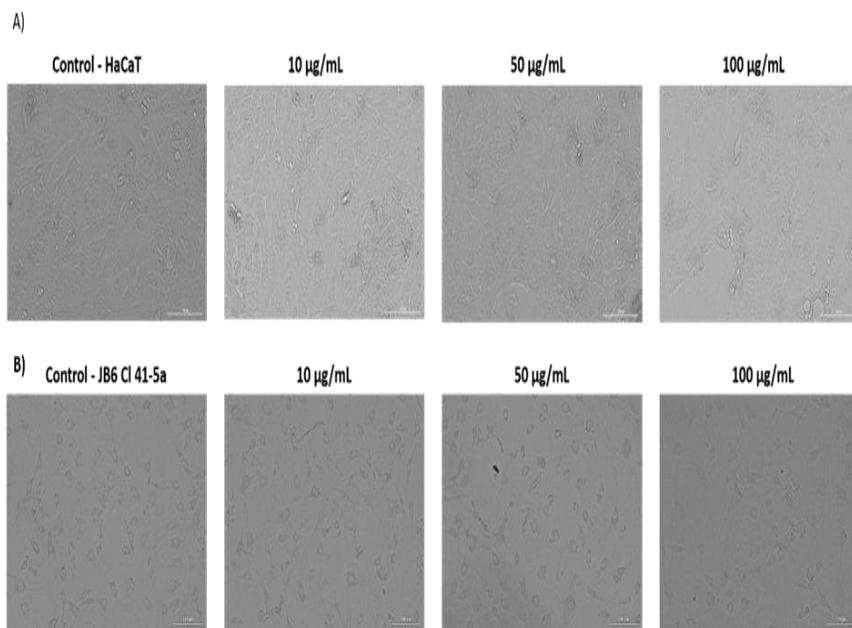
## **STUDIUL II. EUGENOL - O ALTERNATIVĂ NATURALĂ ÎN STOMATOLOGIE: O EVALUARE *IN VITRO* ȘI *IN OVO* A BIOSIGURANȚEI**

EUG a acționat mai intens asupra celulelor JB6 Cl 41-5a arătând că acestea sunt mai sensibile la compus în comparație cu celulele HaCaT, astfel la cea mai mare concentrație testată (100 μg/ml) rezultatele au arătat un procent de 55% de celule viabile pentru JB6 Cl 41-5a, în timp ce pentru HaCaT viabilitatea celulelor nu a scăzut sub 78% (Figura 6).



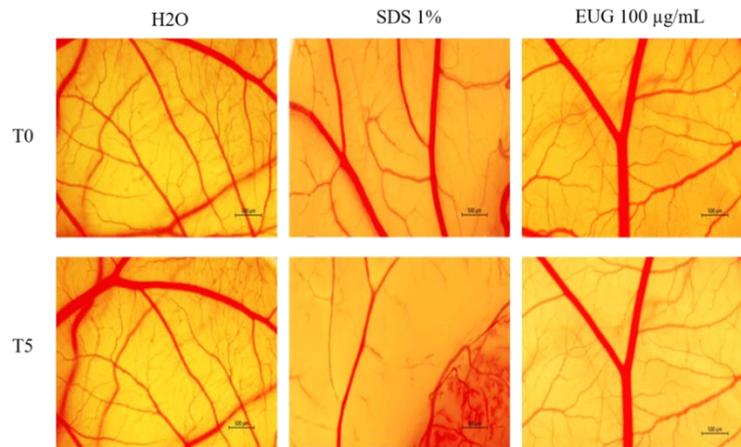
**Figura 6.** Evaluarea in vitro a impactului EUG (10, 25, 50, 75 și 100 ug/mL) asupra viabilității celulelor HaCaT și JB6 CI 41-5a după 24 de ore de tratament prin aplicarea testului MTT.

După cum se poate vedea în Figura 7, pentru celulele HaCaT, la cea mai mare concentrație testată se poate observa o micșorare a celulelor pe alocuri, dar aspectul morfologic nu este afectat considerabil. Pentru celulele JB6 CI 41-5a, acțiunea mai intensă a EUG poate fi observată prin prezența resturilor, a contracției celulare sau alungirea formei celulei la cele mai mari concentrații. Mai mult, pentru celulele JB6 CI 41-5a, o reducere a confluenței poate fi de asemenea observată la creșterea dozelor.



**Figura 7.** Aspectul morfologic al celulelor HaCaT și JB6 Cl 41-5a după 24 de ore de tratament cu EUG (10, 50 și 100 µg/mL).

Conform rezultatelor obținute prin testul HET-CAM (Figura 8), EUG este inclus în categoria probelor neiritante. Așa cum era de așteptat pentru controalele utilizate în experiment, SDS 1% a cauzat daune severe și este clasificată ca o probă sever iritantă, în timp ce H<sub>2</sub>O nu este iritant.



**Figura 8.** Imagini stereoscopice ale metodei HET-CAM care ilustrează efectul inițial (T0) și la 5 min (T5) după aplicarea probelor: control negativ (H<sub>2</sub>O), control pozitiv (SDS 1%) și EUG 100 ug/mL.

## CONCLUZII

În ultimele decenii, produsele de sănătate dentară care conțin fluor au fost utilizate pe scară largă pentru a preveni cariile și pentru a promova igiena orală. Cu toate acestea, preocupările legate de potențialele efecte toxice ale expunerii la fluor au condus la cercetări.

Primul studiu a examinat efectele NaF și Xyl asupra celulelor HaCaT și SAOS-2. În celulele HaCaT, NaF a redus proliferarea celulară și a indus modificări morfologice legate de apoptoză la concentrații scăzute, în timp ce Xyl a prezentat efecte citotoxice dependente de doză. Combinația de NaF și Xyl a scăzut viabilitatea celulară, iar NaF a afectat activitatea caspazei și expresia genei pro-apoptotice. În celulele SAOS-2, NaF a crescut proliferarea la concentrații mari, în timp ce Xyl a avut efecte citotoxice. În experimentele pe membrana corioalantoică, NaF a provocat efecte iritante, sugerând riscuri vasculare.

Al doilea studiu a investigat EUG, care nu a provocat citotoxicitate în celulele HaCaT, dar a sensibilizat celulele JB6 Cl 41-5a într-o manieră dependentă de doză. În testul HET-CAM, EUG a fost clasificat ca neiritant.

Sunt necesare mai multe cercetări pentru a evalua siguranța și eficacitatea compușilor naturali și sintetici în stomatologie.