

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ
DEPARTAMENTUL I**

ION VIRGIL CORLAN



TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDII EXPERIMENTALE ȘI STATISTICE PRIVIND
PATOLOGIA ORALĂ MALIGNĂ ȘI ROLUL PROFILACTIC
AL IGIENEI ORALE**

– R E Z U M A T –

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. RAMONA AMINA POPOVICI

**Timișoara
2021**

CUPRINS

Lista lucrărilor științifice publicate	VI
Lista cu abrevieri și simboluri	VII
Lista figurilor	IX
Lista tabelelor	XIII
Dedicatie.....	XIII
Mulțumiri	XIV
INTRODUCERE.....	XV
 PARTEA GENERALĂ	 1
CAPITOLUL 1. PATOLOGIA TUMORALĂ ORALĂ	1
1.1 Generalități – Introducere.....	1
1.2 Factori de risc	4
1.2.1 Tutunul	4
1.2.2 Alcoolul.....	6
1.2.3 Alți factori	8
1.3 Aspecte microscopice și macroscopice	14
1.3.1 Carcinogeneza	14
1.3.2 Micromediul tumoral	16
1.4 Rolul produselor de igienă în prevenirea unor afecțiuni cu potențial malign.....	17
CAPITOLUL 2. CERCETĂRI LEGATE DE EVALUAREA PATOLOGIEI TUMORALE ORALE ȘI A UNOR TERAPII PROFILACTICE	18
2.1 Introducere	18
2.2 Modele de cercetare.....	20
2.2.1 Model de gingie umană construit din keratinocite și fibroblaste imortalizate	21
2.2.2. Modele de șoarece actuale de carcinom cu celule scuamoase orale.....	26
2.3 Corelarea datelor experimentale cu evaluările clinice	32
2.4 Importanța strategiilor de prevenție	32
 PARTEA SPECIALĂ	 38
CAPITOLUL 3. STUDIILE <i>IN VITRO</i> – CULTURILE CELULARE	39
3.1 Introducere.....	39
3.2 Materiale și metode	40
3.2.1 Reactivi și celule.....	40
3.2.2 Cultivarea celulelor	41
3.3 Rezultate și discuții	41
3.4 Concluzii	60

CAPITOLUL 4. TESTAREA <i>IN VITRO</i> PE CELULE NORMALE ȘI TUMORALE A UNOR COMPUȘI CHIMICI/NATURALI FRECVENT ÎNTÂLNÎȚI LA CONTACTUL CU MUCOASA ORALĂ	62
4.1 Introducere	62
4.1.1 Îndulcitorii artificiali	63
4.1.2 Agenții de curățare	64
4.2 Materiale și metode	66
4.2.1 Reactivi	66
4.2.2 Culturile celulare.....	67
4.2.3 Analize statistice.....	67
4.3 Rezultate și discuții	68
4.3.1 Morfologia celulelor	68
4.3.2 Viabilitatea celulelor.....	77
4.4 Concluzii	88
CAPITOLUL 5. DATE STATISTICE LEGATE DE UTILIZAREA PRODUSELOR CU ROL PROFILACTIC ȘI IMPORTANȚA IGIENEI ORALE	90
5.1 Introducere	90
5.2 Material și metodă	91
5.3 Rezultate și discuții.....	92
5.4 Concluzii	99
CAPITOLUL 6. EFECTELE PLANTELOR MEDICINALE PENTRU CAVITATEA ORALĂ	101
6.1 Noțiuni introductive – compuși naturali cu acțiune benefică în cavitatea orală	101
6.2 Principalele clase de compuși biologic activi	103
6.3 Resursele naturale și mecanisme de acțiune corelate patologiei orale	106
6.4 Concluzii	108
CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	110
BIBLIOGRAFIA.....	115
ANEXA	I

REZUMAT

Tumorile din cavitatea orală au o incidență crescută de la un an la altul, conform datelor raportate de OMS. Medicamentele chimioterapeutice utilizate pentru tratarea cancerului s-au dovedit cu eficacitate limitată, din cauza problemelor de eliberare, penetrare și un grad moderat de selectivitate pentru celulele tumorale, iar în plus pot provoca daune severe țesuturilor sănătoase. În prezent, principalele variabile de prognostic ale patologiei tumorale sunt localizarea, dimensiunile tumorii și prezența metastazelor limfonodale cervicale și la distanță. Clasificarea actuală a tumorilor se bazează pe distribuția lor anatomică și morfologică, aspecte care conduc la aplicarea unei terapii comune, omogene pentru un grup heterogen de malignități. Informațiile limitate în acest moment, privind aspectele moleculare și celulare ale carcinogenezei la nivelul mucoasei orale privind heterogenitatea biologică acestor tumori impun dezvoltarea unor strategii de cercetare prin tehnici pe culturi celulare *in vitro*, cu aplicabilitate pentru studiile *in vivo*.

Patologia dentară și cea parodontală poate fi corelată cu factorii de risc în patologia tumorală. Obturațiile debordante, restaurări protetice neadaptate, incorecte, resturi dentare iritative asociate cu o alimentație nesănătoasă și igienă orală deficitară reprezintă factori de risc pentru instalarea patologiilor tumorale la nivelul cavității orale. Cariile dentare au o etiologie multifactorială în care există un joc de trei factori principali: gazda (saliva și dinții), microflora (placa) și substratul (dieta) și un al patrulea factor: timpul. Rolul zahărului (și al altor carbohidrați fermentabili, cum ar fi făina rafinată) ca factor de risc în inițierea și progresia cariilor dentare este copleșitor. Indiferent dacă această demineralizare inițială ajunge la carii detectabile clinic sau dacă leziunea este remineralizată de minerale de placă depinde de o serie de factori, dintre care cantitatea și frecvența consumului suplimentar de zaharuri sunt de maximă importanță. În lumea modernă produsele sunt foarte variate iar alimentația, igiena orală și controalele periodice profilactice de specialitate joacă un rol important. Acțiunile de conștientizare întreprinse de către specialiști sunt necesare a fi implementate, iar în prezent acestea sunt foarte rare.

Scopul acestei cercetări este de a studia în detaliu prin tehnici celulare *in vitro* o serie de compuși frecvent utilizați atât de medicii stomatologi cât și de populație în general. Cercetarea a avut patru obiective majore, care interferează și asigură o înțelegere mai detaliată a proceselor implicate în patologiile orale studiate. Primul obiectiv este reprezentat de studiile *in vitro* cu accent pe culturile celulare. Cel de-al doilea obiectiv a presupus testarea *in vitro* pe celule normale și tumorale a unor compuși frecvent întâlniți la contactul cu mucoasa orală. Obiectivul al treilea a vizat obținerea de date statistice legate de utilizarea produselor destinate igienei orale și importanța acestora, fiind evaluat nivelul de cunoaștere

a efectelor acestor compuși utilizați frecvent de către populație sau de către specialiști (de exemplu: (a) înlocuitorii de zahăr, de tipul aspartamului și xilitolului regăsiți în produsele marca "fără zahăr" și (b) compușii utilizați în cabinetele stomatologice frecvent, precum clorhexidina și bicarbonatul de sodiu, acesta din urmă cu utilizare frecventă simultan și de către populație în domeniul alimentar) în instalarea și prevenirea bolilor din cavitatea orală. Ultimul obiectiv s-a axat pe importanța utilizării și investigării compușilor de origine naturală cu acțiune benefică în patologia orală tumorală. Prin urmare, teza de doctorat este structurată pe două mari capitole, conform normelor de redactare, și anume partea generală, respectiv partea specială.

Partea generală, abordează într-un prim subcapitol cele mai noi aspecte legate de patologia orală tumorală – factorii de risc, aspecte macroscopice și microscopice, managementul cancerului oral, iar în cel de-al doilea subcapitol sunt prezentate posibilitățile experimentale legate de evaluarea patologiei orale și a unor terapii profilactice cu punerea accentului pe tehnicile de evaluare *in vitro* și *in vivo*.

Partea specială cuprinde patru direcții principale: (1) Studiile *in vitro* – culturile celulare, (2) Testarea *in vitro* pe celule normale și tumorale a unor compuși chimici/naturali frecvent întâlniți la contactul cu mucoasa orală, (3) Date statistice legate de patologia orală malignă și importanța igienei orale și (4) Importanța utilizării și investigării compușilor de origine naturală cu acțiune benefică în patologia tumorală orală. În fiecare dintre cele patru capitole de cercetare originală se pune accentul pe importanța proceselor care au loc în cavitatea orală: (i) modificări care au loc la nivel de keratinocite și fibroblaste, la nivel de celule tumorale (carcinom cu celule scuamoase), (ii) acțiunea diferiților compuși utilizați frecvent sau care fac parte din tratamentul terapeutic al celor mai frecvente boli de la nivelul cavității orale, care au un prim contact cu mucoasa orală – clorhexidina (antiseptic utilizat atât în cabinetul stomatologic cât și în produsele de igienă orală de tipul apelor de gură), aspartam și xilitol (îndulcitori artificiali/de proveniență naturală) și bicarbonatul de sodiu (agent de curățare, utilizat pentru alcalinizare) asupra celulelor orale, (iii) date statistice legate de importanța igienei orale, utilizarea produselor de igienă orală, vizita la cabinetul dentar și alți factori care contribuie la prevenirea leziunilor cu potențial malign sau chiar maligne, dar și a leziunilor carioase și parodontale (iv) tipurile de clase de compuși de origine naturală care prezintă acțiune farmacologică recunoscută în abordarea preventivă și curativă a afecțiunilor din cavitatea orală.

Culturile celulare joacă un rol important în evaluarea compușilor chimici, atât de origine naturală, cât și de sinteză, și, de asemenea, ajută la elucidarea parțială a

mecanismelor activității biologice exercitată de ei. În mare parte, pe baza tehnicii de cultură celulară, compușii chimici sunt investigați pentru a evalua potențialul benefic (de ex. extracte din plante medicinale, uleiuri volatile, infuzii de diferite ceaiuri, polifenoli, etc.) sau pentru a evalua toxicitatea (de ex. agenți utilizați pentru retracția gingivală, agenți chimici din produse de igienă orală etc.). Liniile celulare utilizate în studiul de față au fost: keratinocitele gingivale primare (PGK-ATCC® PCS-200-014 TM), fibroblastele primare gingivale (HGF-ATCC® PCS-201-018 TM) și carcinomul cu celule scuamoase (SCC4 - ATCC® CRL-1624 TM) achiziționate de la firma ATCC (American Type Cell Collection) sub formă de mostre înghețate. Acestea au fost urmărite pentru a evalua dezvoltarea în cultură la diferite pasaje cu scopul de a face o caracterizare corectă a comportamentului acestora (în funcție de tip și proveniență) pentru ulterioare testări. Keratinocitele gingivale (figura 1) s-au dovedit a avea o confluență scăzută după prima săptămână de stat în cultură, ulterior formând colonii care prezintă legături puternice între ele, o caracteristică a fenotipului epitelial. Aceste modificări influențează decisiv selectarea unor anumite tipuri de celule în vederea studiilor de siguranță, toxicitate, eficacitate dar și pe cele care vizează crearea de modele corelate ulterior cu experimentele *in vivo*.

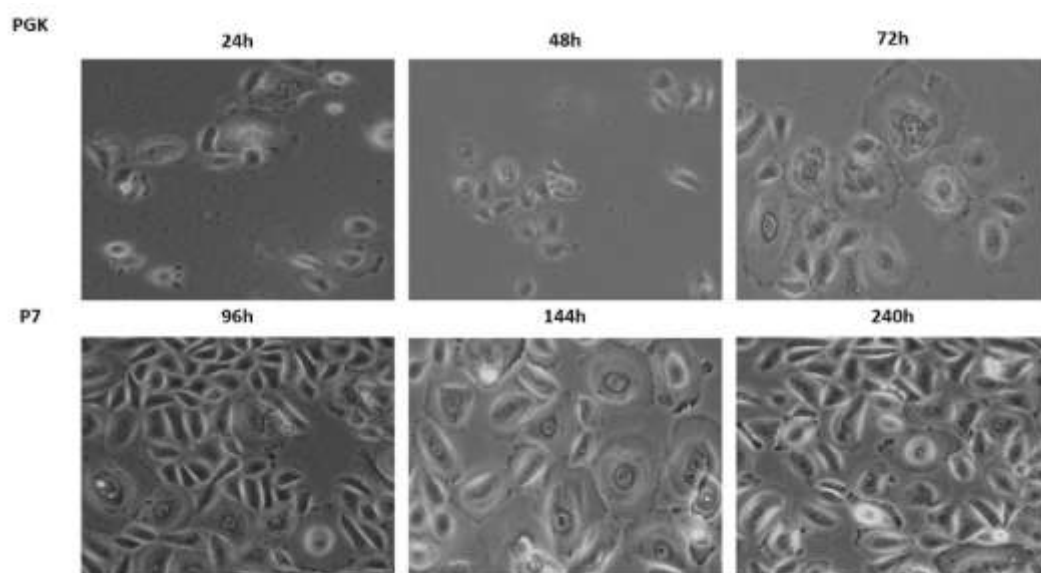


Figura 1. Aspectul keratinocitelor gingivale primare (pasajul 7) în cultură la intervale de timp diferite (10x)

Fibroblastele gingivale umane primare (figura 2), odată cu creșterea numărului pasajului denotă o confluență care nu suferă diferențe la fel de semnificative ca și în cazul keratinocitelor gingivale umane primare.

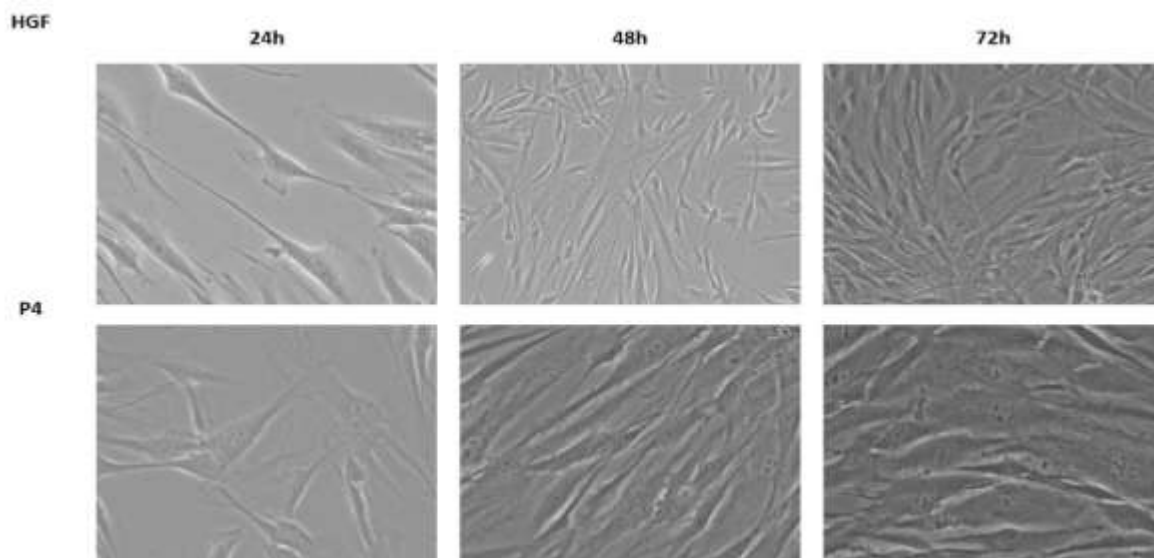


Figura 2. Aspectul fibroblastelor primare gingivale (pasajul 4) în cultură la diferite interval de timp (10x rândul de sus, 20x rândul de jos)

La pasaje mici creșterea celulelor și morfologia nu sunt influențate de timp, confluența fiind atinsă chiar și după câteva zile, iar la pasajele mai mari acestea ating confluența rapid comparativ cu keratinocitele, viabilitatea nefiind decisiv influențată. Celulele tumorale (figura 3) prezintă diferență evidentă legată de dezvoltarea în cultură. Acestea necesită un timp foarte îndelungat pentru a ajunge la o confluență suficientă pentru derularea de experimente.

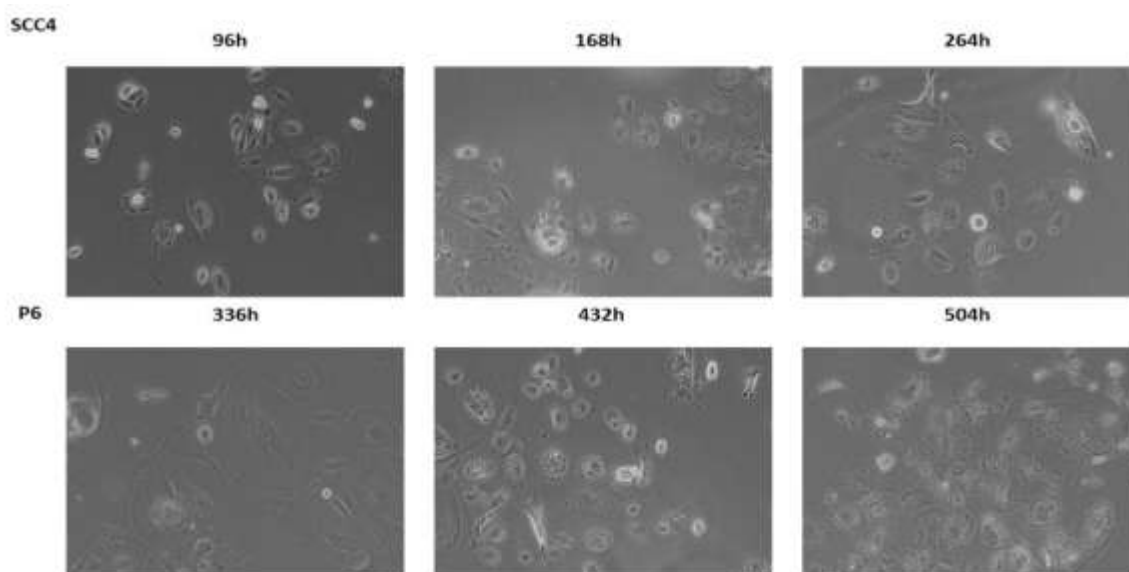


Figura 3. Aspectul celulelor de carcinom cu celule scuamoase ale limbii (pasaj 6) în cultură la diferite interval de timp (10x)

În timpul experimentelor conduse și pentru a monitoriza confluența celor trei tipuri de celule, s-au observat următoarele: la pasaje mici se obține o confluență de peste 80% după o perioadă de aproximativ două săptămâni în cazul keratinocitelor gingivale umane și a carcinomului cu celule scuamoase în timp ce, pentru fibroblastele gingivale, este necesară o perioadă de aproximativ 3 ori mai mică pentru a ajunge la aceeași confluență; la pasaje intermediare, celulele tumorale surprinzător, necesită un timp mai lung pentru a ajunge la confluența optimă pentru a începe dezvoltarea unor experimente specifice, în timp ce celulele normale prezintă o creștere mai rapidă direct proporțională cu obținerea confluenței optime într-un timp mai scurt. Nu s-au efectuat studii ample privind procentul de confluență bazat pe pasaje comparative între liniile celulare normale și cele tumorale orale.

Cercetările au continuat cu evaluarea activității citotoxice a aspartamului (Asp), clorhexidinei (Chx), xilitolului (Xyl) și bicarbonatului de sodiu (NaB) asupra keratinocitelor și fibroblastelor gingivale umane primare dar și asupra celulelor scuamoase de carcinom. Astfel, s-a studiat morfologia celulelor și viabilitatea acestora în prezența a diferite concentrații ale compușilor de testat. Keratinocitele umane gingivale primare prezintă o morfologie intactă și o dimensiune și o formă asemănătoare ca și controalele netratate până la o concentrație de compuși chimici de aproximativ 25 μM ; modificări morfologice clare observate la microscopul cu contrast de fază apar după expunerea la compuși cu concentrații mari (50 μM), după 24 h post-stimulare. Fibroblastele umane gingivale primare, în prezența aspartamului și xilitolului la concentrațiile cele mai mari, 50 μM , au suferit modificări importante legate de forma celulară, desprinderea de pe placa de cultură și afectarea viabilității. Celulele tumorale în prezența clorhexidinei s-au modificat relativ în prima perioadă de la expunerea la compus, după care, la 24 de ore, celulele aflate în prezența clorhexidinei 50 μM suferă modificări de formă și dezvoltare dar nu semnificative; aceleași observații pot fi făcute și în cazul utilizării aspartamului, xilitolului și bicarbonatului de sodiu. Modificările apărute sunt remarcate la concentrații mari utilizate, 50 μM , în timp ce la concentrații mici celulele nu par a fi afectate. Toți cei patru compuși testați au provocat o scădere a viabilității celulelor tumorale într-o manieră de tip concentrație-timp. După 24 h de incubare, nu s-au putut detecta diferențe semnificative statistic între următorii compuși, clorhexidină, aspartam și xitolol la 5 și 10 μM , dar concentrațiile compușilor testați peste 10 μM au determinat o scădere a viabilității celulare într-o manieră dependentă de doză în special la celulele de carcinom cu celule scuamoase.

Prin prevenirea apariției problemelor medicale legate de cavitatea orală, se aduce o contribuție majoră la îmbunătățirea stării de sănătate a populației precum și la

reducerea costurilor legate de abordarea anumitor probleme socio-economice din sfera medicală. Pe de altă parte, în zonele urbane comparativ cu zonele rurale, importanța igienei orale și a produselor destinate acestora este mai cunoscută în mediul rural decât în mediul rural. De asemenea, în funcție de produsele de igienă orală utilizate și existența diferitelor patologii se pot semna și unele efecte secundare, în special în cazurile în care se administrează medicație fără recomandare medicală de specialitate. Datele înregistrate scot în evidență aspecte importante în abordarea problemei legate de conștientizarea populației în menținerea sănătății orale. O mare parte dintre participanți nu se prezintă la cabinetul stomatologic în timp util, nu cunosc foarte bine sau nu dau importanță compoziției produselor destinate igienei orale, nu fac diferența între prevenție și tratament, nu sunt suficient informați în ceea ce privește posibila apariție a unor boli grave. Aceste informații trebuie diseminate prin campanii de conștientizare pentru toate segmentele de populație, chiar pe grupe de vârstă, pentru a preveni boli grave, luând în vedere și aspectele socio-economice corelate acestor patologii.

Sursele vegetale sunt multiple și reprezintă în continuare un teren incomplet explorat în ceea ce privește utilizarea lor în abordarea terapeutică a bolilor din cavitatea orală. Plantele și compușii de origine naturală reprezintă o importantă alternativă datorită eficacității lor ridicate și toxicității reduse. Una dintre cele mai importante activități biologice prezentate de fitocompuși este acțiunea antibacteriană, utilă în tratamentul majorității problemelor de sănătate orală. Un avantaj al plantelor medicinale este că au un mecanism complex de acțiune antibacterian, motiv pentru care rezistența bacteriilor este diminuată. Avantajul utilizării extractelor naturale decurge din efectul sinergic al compușilor existenți în plante care le potențează activitatea determinând un efect terapeutic îmbunătățit. Compușii naturali ar trebui analizați în combinație cu alți fitocompuși, precum și cu medicamentele convenționale utilizate în prezent în diferite scheme terapeutice pentru a observa mai detaliat efectul sinergic dintre ei și mecanismul de acțiune asupra unor leziuni cu potențial malign, sau maligne de la nivelul cavității orale.

Contribuțiile proprii sunt legate de: (i) clarificarea anumitor aspecte care țin de utilizarea celulelor umane gingivale, sănătoase și tumorale cu scopul de a selecta o metodă complexă în studii *in vitro* viitoare; (ii) importanța testării *in vitro* a anumitor compuși aflați frecvent în contact cu mucoasa bucală - clorhexidina, aspartamul, xilitolul și bicarbonatul de sodiu – în vederea comportamentului celulelor cu rol în procesele de apărare ale organismului; (iii) analiza relației medic stomatolog-pacient și importanța igienei orale, prin evaluarea unui chestionar și (4) analiza detaliată a compușilor de origine naturală utilizați în practica stomatologică fie cu rol preventiv fie cu rol curativ.

Direcțiile viitoare de cercetare ar trebui să includă: identificarea de biomarkeri specifici pentru o anumită boală orală care începe cu keratinocitele și instabilitatea genetică; testarea complexă *in vivo* sau *in vitro* pe țesut uman reconstruit a compușilor utilizați în studiul de față dar și a altor compuși de origine vegetală cu eficacitate crescută și, nu în ultimul rând, elaborarea de programe de conștientizare a populației legate de importanța igienei orale.