

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

COSOROABĂ RALUCA MIOARA



TEZĂ DE DOCTORAT

**REAȚIA ȘI SEMNIFICAȚIA MASTOCITELOR
ÎN LEZIUNILE INFLAMATORII ȘI TUMORALE
ALE CAVITĂȚII ORALE**

-REZUMAT-

Conducător științific

PROF. UNIV. DR. POPOVICI RAMONA AMINA

Timișoara

2024

CUPRINS

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE.....	VI
ABREVIERI.....	VII
INDEXUL FIGURILOR.....	IX
INDEXUL TABELELOR.....	XIII
DEDICAȚIE.....	XIV
MULȚUMIRI.....	XV
INTRODUCERE.....	XVII
PARTEA GENERALĂ.....	1
Capitolul 1. STRUCTURA MICROSCOPICĂ A ȚESUTURILOR MOI ALE CAVITĂȚII ORALE.....	1
1.1. Mucoasa orală.....	1
1.2. Planșeul oral.....	4
1.3. Limba.....	5
1.4. Structurile dentare.....	7
Capitolul 2. LEZIUNILE INFLAMATORII: PARTICULARITĂȚI MICROSCOPICE.....	9
2.1. Inflamația acută.....	9
2.2. Inflamația cronică.....	12
Capitolul 3. LEZIUNILE CANCEROASE ȘI PRECANCEROASE: INCIDENȚĂ, PATOLOGIE, DIAGNOSTIC MOLECULAR.....	16
3.1. Leziunile canceroase.....	16
3.2. Leziuni precanceroase.....	24
3.2.1. Leucoplazia.....	24
3.2.2. Eritroplazia.....	25
3.2.3. Fibroza submucoasă orală.....	25
Capitolul 4. MASTOCITUL ÎN CONDIȚII NORMALE, INFLAMATORII ȘI TUMORALE LA NIVELUL CAVITĂȚII ORALE.....	27
4.1. Istoric, Origine, Fenotip și Localizare.....	27
4.1.1. Istoric.....	27

4.1.2. Origine.....	28
4.1.3. Fenotip și localizare.....	28
4.2. Morfologia mastocitelor.....	29
4.3. Rolul mastocitelor în procesele inflamatorii ale cavității bucale...	31
4.4. Rolul mastocitelor în tumorile maligne ale cavității orale.....	36
PARTEA SPECIALĂ.....	40
Capitolul 5. MOTIVAȚIA, SCOPUL, OBIECTIVELE, MATERIAL ȘI METODELE DE CERCETARE ALE STUDIILOR.....	40
5.1. Motivația, Scopul și Obiectivele cercetă.....	40
5.2. MATERIAL ȘI METODE.....	42
5.2.1. Recoltarea specime.....	42
5.2.2. Procesarea prima.....	42
5.2.3. Colorații morfologice.....	43
5.2.4. Metodele imunohistochimice.....	44
5.2.5. Microscopie electronică.....	46
5.2.6. Interpretarea rezultatelor.....	47
5.2.7. Calcularea microdensității mastocitare.....	47
5.2.8. Prelucrarea și procesarea imaginilor microscopice.....	48
5.2.9. Analiza statistică.....	48
Capitolul 6. STUDIUL 1. VALIDAREA ȘI SPECIFICITATEA METODELOR DE IDENTIFICARE A MASTOCITELOR ÎN ȚESUTURILE NORMALE ȘI PATOLOGICE ALE CAVITĂȚII ORALE.....	49
6.1. Introducere.....	49
6.2. Material și metode.....	51
6.3. Rezultate.....	51
6.4. Discuții.....	60
6.5. Concluzii.....	63
Capitolul 7. STUDIUL 2. MASTOCITELE ȘI LIMFANGIOGENEZA ÎN LEZIUNILE INFLAMATORII GINGIVALE.....	64
7.1. Introducere.....	64
7.2. Material și metode.....	67

7.3. Rezultate.....	70
7.4. Discuții.....	74
7.5. Concluzii.....	77
Capitolul 8. STUDIUL 3. RELAȚIA DINTRE REACȚIA MASTOCITARĂ ȘI DENSITATEA MICROVASCULARĂ DIN TUMORILE EPITELIALE ALE CAVITĂȚII ORALE.....	79
8.1. Introducere.....	79
8.2. Material și metode.....	84
8.3. Rezultate.....	85
8.4. Discuții.....	94
8.5. Concluzii.....	97
Capitolul 9. STUDIUL 4. MASTOCITELE INTRAEPITELIALE DIN TUMORA WARTHIN: ELEMENTE DIAGNOSTICE ȘI PROGNOSTICE.....	98
9.1. Introducere.....	98
9.2. Material și metode.....	101
9.3. Rezultate.....	103
9.4. Discuții.....	109
9.5. Concluzii.....	111
Capitolul 10. CONCLUZII GENERALE, ASPECTE ORIGINALE ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE.....	112
REFERINȚE BIBLIOGRAFICE.....	116
ANEXE: ARTICOLE PUBLICATE IN EXTENSO.....	I

REZUMAT

Leziunile inflamatorii și tumorale ale cavității orale reprezintă în prezent un subiect de mare interes practic. Lucrarea evidențiază complexitatea și importanța studiului structurilor orale în contextul reacției acestora la agenții patogeni. Mastocitele, despre care se discută detaliat, influențează modificările vaselor limfatice, fiind implicate în leziunile inflamatorii și tumorale. Studiile menționate analizează distribuția și densitatea acestora în leziuni gingivale și parodontale, folosind metode specifice de investigație. De asemenea, se subliniază rolul glandelor salivare în menținerea echilibrului cavității orale și se examinează detaliat caracteristicile acestora.

Referitor la mastocite, se evidențiază incertitudinile și controversele din literatura de specialitate privind aceste celule. Se ridică întrebări legate de rolul lor în sistemul imunitar al organismului, posibila lor influență asupra celulelor tumorale și viabilitatea vaselor sanguine și limfatice în medii tumorale. Răspunsurile la aceste întrebări rămân în prezent neelucidate sau sunt greu de determinat.

Terapia ținută către mastocite este o abordare relativ recentă, având în vedere că studiile anterioare se concentraseră mai ales pe celulele epiteliale în condiții inflamatorii și tumorale. Datele referitoare la implicarea mastocitelor în aceste condiții patologice sunt limitate sau chiar absente în ceea ce privește relația lor cu leziunile observate microscopic. Tumorile cavității orale sunt mai puțin comune decât alte tipuri de tumori maligne, precum cele mamare, prostatice sau pulmonare, afectând în special buzele, limba și planșeul oral.

Incidența acestor tumori a crescut semnificativ în ultimele decenii, fiind adesea detectate în stadii avansate. Chiar dacă progresia lor este adesea lentă în comparație cu alte tipuri de tumori, acestea pot fi agresive, invadând țesuturile locale și metastazând la nivel sistemic. Majoritatea tumorilor cavității orale sunt carcinoame scuamocelulare, cu răspuns redus sau inexistent la tratamentele standard precum radioterapia sau chimioterapia, ceea ce conferă un prognostic nefavorabil în stadiile avansate.

În prezent, deși există progrese în implementarea tehnicilor moleculare, nu există încă o clasificare moleculară viabilă și aplicabilă în practică pentru tumorile din cavitatea orală și zona capului și gâtului. Profilul molecular al acestor tumori nu este încă clar definit în ceea ce privește aplicabilitatea clinică, în contrast cu alte tipuri de tumori.

Cercetarea subliniază complexitatea creșterii patologiei cavității orale în ultimele decenii, evidențiind diverse motive precum prezentarea tardivă la medicul stomatolog și igiena orală deficitară. Aceste aspecte conduc la leziuni severe care afectează toate țesuturile orale și pot influența starea generală de sănătate. Se cunoaște că leziunile cavității orale pot avea impact asupra stării de sănătate generală, iar afecțiunile sistemice pot determina modificări semnificative la nivelul țesuturilor orale.

Mai mult, în lucrare se poate observa că leziunile inflamatorii ale țesuturilor de susținere ale dinților sunt subiect de discuții și controverse în ceea ce privește clasificarea și terapia lor. În ciuda dezbaterilor extinse din literatura de specialitate, există încă multe aspecte neclare, controverse și date necunoscute în domeniul patogeniei, clasificării și terapiei patologiei cavității orale.

Acest studiu a implicat prelevarea de biopsii chirurgicale, procesare standardizată a materialului biologic și aplicarea unor tehnici de colorație specifice pentru identificarea mastocitelor și caracterizarea altor elemente tisulare. S-au folosit metode histochemice și imunohistochemice avansate, iar rezultatele au fost analizate cu precizie. De asemenea, se subliniază importanța clarificării unor aspecte controversate legate de diagnostic și terapie, folosind rezultatele acestei investigații ca o bază solidă pentru viitoare intervenții medicale.

Leziunile inflamatorii și tumorale ale cavității orale reprezintă în prezent un subiect de mare interes practic. Există o preocupare crescută pentru clasificarea clinică, diagnosticul histopatologic și terapiile adecvate pentru astfel de leziuni. De asemenea, se aduce în discuție creșterea incidenței tumorilor din cavitatea orală, diagnosticul acestora fiind frecvent realizat în stadii avansate, având prognostic nefavorabil.

Mastocitele sunt menționate ca fiind implicate în aceste condiții patologice, însă informațiile referitoare la ele sunt limitate sau absente în ceea ce privește relația lor cu leziunile observate microscopic. Aspectele incerte și controversate legate de mastocite, așa cum sunt prezentate în literatura de specialitate, pun în discuție funcțiile acestor celule în contextul tumorilor cavității orale.

Studiile anterioare și obiectivele cercetării menționate se concentrează pe evaluarea reacției mastocitelor în corelație cu biopsiile prelevate din țesuturile patologice și sănătoase ale cavității orale. Scopul este de a clarifica implicarea mastocitelor în patologia orală, inclusiv în tumori, iar aceasta poate aduce beneficii atât în planul cercetării fundamentale, cât și în practica diagnostică.

Partea generală, însumează 4 capitole principale. În primul capitol se relatează informații despre structura microscopică a țesuturilor moi ale cavității orale; în cel de-al doilea capitol sunt prezentate aspecte ale leziunilor inflamatorii- particularitățile microscopice; în al treilea capitol sunt discutate leziunile canceroase și precanceroase (incidență, parologie și diagnostic molecular); iar în al patrulea capitol se relatează informații despre mastocitul în condiții normale, inflamatorii și tumorale la nivelul cavității orale.

Partea specială cuprinde cercetarea personală elaborată în cadrul a patru studii. Scopul cercetării este de a evalua reacția mastocitelor în corelație cu biopsiile studiate microscopic prelevate din țesuturi patologice și clinic sănătoase ale cavității orale.

STUDIUL 1. VALIDAREA ȘI SPECIFICITATEA METODELOR DE IDENTIFICARE A MASTOCITELOR ÎN ȚESUTURILE NORMALE ȘI PATOLOGICE ALE CAVITĂȚII ORALE

Mastocitele nu se evidențiază cu metodele morfologice, uzuale de colorare a secțiunilor microscopice. Aceasta este cauza neraportării acestor celule în buletinele histopatologice, fiind asimilate în majoritatea cazurilor cu alte celule ale răspunsului inflamator al organismului. Din acest motiv cercetările asupra rolului acestor celule în condiții normale, inflamatorii și tumorale a fost mult mai puțin studiat decât pentru alte

componente celulare conjunctive, iar datele de care dispunem în prezent sunt neclare sau chiar controversate. Pentru mai bine de 100 de ani, identificarea mastocitelor s-a bazat pe punerea în evidență a unora dintre componentele granulelor specifice.

Scopul acestui studiu este de a evalua cele mai eficiente metode de identificare a mastocitelor și acuratețea acestora.

Obiectivul principal al studiului îl reprezintă caracterizarea metodelor specifice de identificare tisulară a mastocitelor și calcularea microdensității acestor celule, prin aplicarea colorațiilor histochimice și imunohistochimice.

MATERIALE ȘI METODE

Pentru testarea valorii metodelor histologice convenționale în identificarea mastocitelor, am selecționat câte cinci biopsii din următoarele entități: gingie cu leziuni inflamatorii, cancer de buză, cancer lingual și glande salivare majore asociate cu țesut tumoral de adenom pleomorf. Toate specișenele au fost prelucrate primar prin fixare în formalină tamponată și incluzionate la parafină, tehnica standard, secțiuni de 5 μm grosime fiind utilizate pentru evaluarea în microscopia fonică.

Dintre tehnicile histochimice, am aplicat metodele cotate cu cele mai bune rezultate din acest punct de vedere, respectiv albastru de toluidină la pH 2.2, albastru alcian la pH2.5, albastru alcian safranină la pH0.2. În această etapă a cercetării evaluarea a fost cea calitativă.

CONCLUZII

1. Metodele care utilizează colorația cu albastru alcian la pH 2.5 au sensibilitatea moderată pentru mastocite și specificitate redusă; colorația cu albastru de toluidină la pH2.2 are specificitate moderată și sensibilitate mare prin reacția metacromatică de la nivelul granulelor mastocitare.
2. Metoda cu albastru alcian safranină are mare sensibilitate și specificitate, fiind singura dintre metodele histochimice cu valoare pentru aplicațiile numerice.
3. Microscopia electronică este o metodă utilă pentru studiul ultrastructural al mastocitelor, dar nu oferă informații referitoare la compoziției granulelor specifice.
4. Mastocitele modificate structural, cu inegalități între granule și densitate electronică redusă sau moderată au fost identificate la cancerul de buză și limbă.

Studiul 2. MASTOCITELE ȘI LIMFANGIOGENEZA ÎN LEZIUNILE INFLAMATORII GINGIVALE

Limfangiogeneza este procesul prin care se formează noi vase limfatice din venulele postcapilare sau/și din vase limfatice preexistente. Spre deosebire de angiogeneza– formarea de noi vase sanguine, la limfangiogeneza nu sunt clar definite în prezent caracterele acestui proces la formarea de novo sau din vase preexistente, în ciuda importanței pe care calea limfatică o are în variate procese patologice.

Scopul acestui studiu a fost evaluarea distribuției, numărului și densitatea mastocitelor și micro-vaselor limfatice la pacienți cu leziuni gingivale și parodontale cu diferite grade de severitate, aplicând o metodă de dublă imunocolorare pentru mastocite (triptaza mastocitară) și pentru celulele endoteliale limfatice (Podoplanina).

Obiective specifice:

- Evaluarea prezenței mastocitelor în spațiile perivasculare în condiții inflamatorii;
- Relația numerică dintre mastocite și vasele limfatice în leziunile inflamatorii gingivale și parodontale;
- Evaluarea caracterului prognostic al mastocitelor perivasculare în leziunile inflamatorii gingivale și parodontale.

CONCLUZII

- 1.Mastocitele și vasele limfatice pot fi identificate și cuantificate în aceleași câmpuri microscopice prin dubla imunocolorată triptază mastocitară-D2-40.
- 2.În biopsiile prelevate din mucoasa aparent normală nu s-au identificat relații particulare dintre mastocite și vasele limfatice.
- 3.Numărul de mastocite și de vase limfatice crește odată cu creșterea severității leziunilor, cu excepția formelor avansate de boală.
- 4.Vasele sanguine din derm sunt dilatate, cu aspecte de stază, care modifică major capacitatea de nutriție a epitelului.
- 5.Este evident efectul inductor al degranulării mastocitelor și al eliberării de substanțe biologice active asupra limfangiogenezei în condițiile inflamatorii din boala parodontală.
- 6.Modificările histologice apar atât în țesutul epitelial cât și în cel conjunctiv și sunt reprezentate de infiltratul inflamator celular, a cărui densitate crește de la formele incipiente spre cele grave, fiind populat cu granulocite neutrofile, eozinofile și plasmocite.
- 7.Diagnosticul morfologic convențional detaliat aduce date în plus, care completează diagnosticul clinic, contribuind astfel la modelarea strategiei terapeutice.

STUDIUL 3. RELAȚIA DINTRE REACȚIA MASTOCITARĂ ȘI DENSITATEA MICROVASCULARĂ DIN TUMORILE EPITELIALE ALE CAVITĂȚII ORALE

Tumorile maligne au suscitat interesul a numeroși cercetători și medici practicieni, iar resursele limitate de care dispunem în prezent, sunt în mare parte datorate mecanismului etiologic cât și căilor prin care celulele normale se transformă

în celule maligne. Mai mult decât atât, nu există în prezent criterii obiective cu caracter predictiv pentru metastazele limfonodale și la distanță, care pot să apară chiar în condițiile unor tumori mici sau chiar nedetectabile clinico-imagistic. Studiile care au investigat micromediul tumoral, denumit anterior stromă, sunt foarte rare, înainte de anul 2000. Doar după introducerea analizelor moleculare curente în perioada actuală, s-a observat comportamentul diferit al celulelor canceroase în funcție de tipul micromediului tumoral.

Scopul acestui studiu este identificarea relațiilor dintre structurile vasculare de neoformație din ariile tumorală și intratumorală și mastocite, evaluate ca localizare și densitate.

Obiective specifice:

- Relația numerică dintre mastocite și angiogeneză.
- Relația numerică dintre mastocite și limfangiogeneză
- Relația dintre mastocitele intra- și perilezionale.

CONCLUZII

1. Densitatea mastocitelor se reduce odată cu creșterea gradului de diferențiere.
2. Există o corelație statistic semnificativă între MVD și MCD pentru leziunile precanceroase și carcinomul scuamocelular bine diferențiat.
3. Densitatea crescută de mastocite se corelează în particular cu vasele imature și intermediare atât din aria tumorală, cât și peritumorală.
4. MCD crește semnificativ din stadiul de mucoasă normală trecând prin hiperplazie și displazie și carcinom bine diferențiat, apoi valorile scad semnificativ.
5. Reducerea marcată a valorilor MCD corelată cu creșterea MVD semnalează prognosticul nefavorabil a carcinomului scuamocelular de buză și limbă și evoluție rapidă a tumorii.

STUDIUL 4. MASTOCITELE INTRAEPITELIALE DIN TUMORA WARTHIN: ELEMENTE DIAGNOSTICE ȘI PROGNOSTICE

Tumorile din cavitatea orală sunt de o deosebită complexitate structurală, evolutivă și pun probleme majore diagnostice și terapeutice. Heterogenitatea acestor tumori, care pot să apară în toate structurile normale de la acest nivel, este semnalată de elemente microscopice care în această formă nu se regăsesc în alte sisteme și organe ale corpului uman. Acest aspect ar putea fi generat și de originea embriologică particulară a țesuturilor din zona capului și gâtului.

Scopul acestui studiu este de a evalua mastocitele intraepiteliale din tumora Warthin, iar obiectivul principal al acestui studiu este de a identifica acumularea de mastocite intraepiteliale intens triptaza – mastocitara pozitive.

CONCLUZII

- 1.Studiul mastocitelor asociate tumorii Warthin semnaleză acumularea masivă a celulelor triptază mastocitară pozitive intraepiteliale.
- 2.Densitatea mastocitelor intraepiteliale este de 10-12 ori mai mare decât a celor din țesutul limfoid.
- 3.Majoritatea mastocitelor intraepiteliale sunt defective, prezentând depleție de glicozaminoglicani, ceea ce limitează identificarea lor cu metodele convenționale histochemice.
- 4.Particularitățile de expresie a mastocitelor intraepiteliale la toate cazurile studiate sunt pozitive și pentru CD117, acesta poate fi considerat un marker util pentru clasificarea moleculară

CONCLUZII GENERALE, ASPECTE ORIGINALE ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

Studiile morfologice, histochemice și imunohistochemice asupra țesuturilor normale, inflamatorii și tumorale din zona anatomică a cavității orale scot în evidență concluziile generale pe care le prezentăm mai jos:

1. Metodele care utilizează colorația cu albastru alcian la pH 2.5 au sensibilitatea moderată pentru mastocite și specificitate redusă; colorația cu albastru de toluidină la pH2.2 are specificitate moderată și sensibilitate mare prin reacția metacromatică de la nivelul granulelor mastocitare.
2. Metoda cu albastru alcian safranină are mare sensibilitate și specificitate, fiind singura dintre metodele histochemice cu valoare pentru aplicațiile numerice.
3. Microscopia electronică este o metodă utilă pentru studiul ultrastructural al mastocitelor, dar nu oferă informații referitoare la compoziția granulelor specifice.
4. Mastocitele modificate structural, cu inegalități între granule și densitate electronică redusă sau moderată au fost identificate la cancerul de buză și limbă.
5. Mastocitele și vasele limfatice pot fi identificate și cuantificate în aceleași câmpuri microscopice prin dubla imunocolorare triptază mastocitară-D2-40.
6. În biopsiile prelevate din mucoasa aparent normală nu s-au identificat relații particulare dintre mastocite și vasele limfatice.
7. Numărul de mastocite și de vase limfatice crește odată cu creșterea severității leziunilor, cu excepția formelor avansate de boală.
8. Este evident efectul inductor al degranulării mastocitelor și al eliberării de substanțe biologice active asupra limfangiogenezei în condițiile inflamatorii din leziunile inflamatorii avansate.
9. Vasele sanguine din derm sunt dilatate, cu aspecte de stază, care modifică major capacitatea de nutriție a epitelului.
10. Diagnosticul morfologic convențional detaliat aduce date în plus, care completează diagnosticul clinic, contribuind astfel la modelarea strategiei terapeutice.
11. Densitatea mastocitelor se reduce odată cu creșterea gradului de diferențiere.

12. Există o corelație statistic semnificativă între MVD și MCD pentru leziunile precanceroase și carcinomul scuamocelular bine diferențiat.
13. Densitatea crescută de mastocite se corelează în particular cu vasele imature și intermediare atât din aria tumorală, cât și peritumorală.
14. MCD crește semnificativ din stadiul de mucoasă normală trecând prin hiperplazie și displazie și carcinom bine diferențiat, apoi valorile scad semnificativ.
15. Reducerea marcată a valorilor MCD corelată cu creșterea MVD semnalează prognosticul nefavorabil a carcinomului scuamocelular de buză și limbă și evoluție rapidă a tumorii.
16. Studiul mastocitelor asociate tumorii Warthin semnalează acumularea masivă de mastocite intraepiteliale intens pozitive la triptaza-mastocitară.
17. Densitatea mastocitelor intraepiteliale este de 10-12 ori mai mare decât a celor din țesutul limfoid.
18. Majoritatea mastocitelor intraepiteliale sunt defective, prezentând depleție de glicozaminoglicani, ceea ce limitează identificarea lor cu metodele convenționale histochemice.
19. Particularitățile de expresie a mastocitelor intraepiteliale la toate cazurile studiate sunt pozitive și pentru CD117, acesta poate fi considerat un marker util pt clasificarea moleculară.

ASPECTE ORIGINALE ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

Considerăm ca fiind originale aspectele pe care le menționăm în continuare, respectiv:

1. Comparația între metodele specifice de identificare a mastocitelor
2. Demonstrarea morfologică a rolului mastocitelor în inițierea și întreținerea limfangionezei în particular în leziunile tumorale.
3. Raportarea relației mastocit/vase de neoformație în angiogeneza precoce, cu identificarea cel puțin a două ținte terapeutice noi în cazul leziunilor tumorale.
4. Particularitățile de expresie a mastocitelor intraepiteliale la toate cazurile studiate sunt pozitive pentru CD117, acesta poate fi considerat un marker util pentru clasificarea moleculară.

Direcții viitoare de cercetare:

1. Integrarea rezultatelor imunohistochemice pentru realizarea unei clasificări moleculare a carcinoamelor scuamocelulare orale.
2. Realizarea unui model experimental care să demonstreze implicarea directă a mastocitelor.
3. Testarea eficienței în model experimental a inhibitorilor și degranulantelor mastocitare cu efectul asupra vaselor sanguine și limfatice.