

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZA DE DOCTORAT
REZUMAT

**STUDIU CLINIC ȘI MORFOLOGIC AL
HIPERCREȘTERII GINGIVALE FIBROTICE**

CONDUCĂTOR DOCTORAT:
Prof. Univ. Dr. Mihai Surpățeanu

STUDENT - DOCTORAND:
Eugen Ionuț Pascu

Craiova
2013

CAPITOLUL I - HISTOLOGIA ȘI HISTOFIZIOLOGIA MUCOASEI ORALE

1. Histologia mucoasei orale
2. Vascularizația și inervația mucoasei orale.
3. Particularități histologice ale mucoasei gingivale
4. Funcțiile mucoasei gingivale

CAPITOLUL II - ASPECTELE CLINICO-MORFOLOGICE ALE HIPERCREȘTERII GINGIVALE

1. Conceptul de hipercreștere gingivală
2. Clasificarea hipercreșterii gingivale
3. Aspecte epidemiologice ale hipercreșterii gingivale
4. Aspecte clinico-morfologice în hipercreșterea gingivală
5. Aspecte histologice în hipercreșterea gingivală
6. Tratamentul hipercreșterii gingivale
7. Căi patogenice implicate în hipercreșterea gingivală

CONTRIBUȚII PERSONALE

- Motivarea și premisele studiului
- Obiectivele studiului

CAPITOLUL III - STUDIU CLINIC AL HIPERCREȘTERII GINGIVALE FIBROTICE

1. Material și metodă
2. Rezultate
3. Concluzii și discuții

CAPITOLUL IV - STUDIU HISTOLOGIC AL HIPERCREȘTERII GINGIVALE FIBROTICE

1. Material și metodă
2. Colorarea secțiunilor
3. Rezultate
4. Concluzii și discuții

CAPITOLUL V - STUDIU INMUNOHISTOCHEMIC AL CĂILOR PATOGENICE IMPLICATE ÎN DEPNUTAREA DE COLAGEN ÎN HIPERCREȘTEREA GINGIVALĂ FIBROTICĂ

1. Material și metodă
2. Rezultate
3. Concluzii și discuții

CONCLUZII GENERALE

BIBLIOGRAFIE

Cuvinte cheie

Hipercreștere gingivală, fibromatoza gingivală, anticorpi, antigene, ciclosporina A (CsA), factor de creștere al țesutului conjunctiv (CTGF), matrix metaloproteinaze (MMP), tranziție epitelio-mezenchimală (TEM),

CAPITOLUL I-HISTOLOGIA ȘI HISTOFIZIOLOGIA MUCOASEI ORALE

1.Histologia mucoasei orale

Mucoasa orală are origine ectodermică, din foița internă a discului embrionar. Ea tapetează întreaga cavitate orală, porțiunea inițială a tubului digestiv. Cavitatea orală reprezintă o cavitate virtuală delimitată anterior de buze, posterior de istmul bucofaringian, lateral de obraji, superior de bolta palatină, iar inferior de limbă și spațiul sublingual.

Cavitatea orală este împărțită de arcadele alveolo-dentare în două compartimente :

- vestibulul oral, un spațiu în formă de potcoavă situat între obraji, buze și arcadele alveolo-dentare;

- cavitatea orală propriu-zisă situată înapoia arcaadelor alveolo-dentare.

Indiferent de zona topografică a cavității orale pe care o căpтуșește, mucoasa orală este alcătuită din două structuri distincte, la exterior **epiteliul oral**, pavimentos stratificat, așezat pe o membrană bazală continuă și **chorionul**, denumit și lamina propria, este țesutul conjunctiv bine vascularizat care susține epiteliul oral.

Din punct de vedere funcțional, mucoasa orală se subîmparte în trei mari varietăți histologice: mucoasa de căpтуșire –acoperă obraji - mucoasa jugală, buzele- mucoasa labială, planșeul oral, fața ventrală a limbii și palatul moale; mucoasa masticatorie -căpтуșește gingia și palatul dur și mucoasa specializată - situată pe fața posterioară a limbii (Baniță și Deva, 2006).

Mucoasa de acoperire reprezintă circa 60% din suprafața mucoasei orale. Acest tip de mucoasă prezintă o deosebită flexibilitate, fiind adaptată astfel masticației, fonației și deglutiției. Este formată din epiteliu nekeratinizat, situat pe un chorion conjunctiv lax, bogat vascularizat, care o leagă de structurile subiacente.

Mucoasa specializată (senzorială) reprezintă circa 15% din suprafața mucoasei orale și acoperă fața dorsală a limbii. Este o mucoasă cu grad variabil de keratinizare, prezentând ridicături polimorfe denumite papile linguale, legată direct de suprafața musculară a scheletului musculo-membranos al limbii.

Mucoasa masticatorie, reprezintă circa 25% din totalul suprafeței cavității orale. Ca zonă topografică aferentă, acest tip de mucoasă acoperă gingiile și palatul dur, regiuni supuse permanent solicitărilor masticatorii. Este formată din epiteliu keratinizat, strâns legat de periostul subiacent.

2.Vascularizația și inervația mucoasei orale.

Mucoasa orală este foarte bine vascularizată și inervată. Numeroase ramuri arteriale, desprinse din artera carotidă internă, formează în structura mucoasei două rețele arteriale anastomozate: una în corionul profund și alta în corionul superficial. Cele două rețele arteriale dau numeroase arteriole și capilare care formează plexuri vasculare papilare. Se pare că fiecare papilă a chorionului dispune de cel puțin patru vase capilare. Venele au un traiect similar cu cel al arterelor. Inervația mucoasei orale este bogată, somatică și vegetativă. Fibrele nervoase senzitive, aparțin în principal nervului trigemen, care dă terminații nervoase libere atât la nivelul chorionului cât și la nivelul epiteliului oral. În plus, în chorion se găsesc corpusculi senzitivi (Meissner, Golgi, Rufini). Toate aceste structuri nervoase asigură sensibilitatea generală tactilă, termică și dureroasă a mucoasei orale (Ross și Pawlina, 2003).

3. Particularități histologice ale mucoasei gingivale

Mucoasa gingivală sau gingia este porțiunea de mucoasă orală care acoperă osul alveolar și dinții în regiunea cervicală. Împreună cu ligamentele gingivale formează parodontiul de înveliș. Termenii "normal clinic" sau "clinic sănătos" sunt utilizați pentru a desemna țesutul gingival caracterizat prin următoarele aspecte:

- nuanță de roz pal sau coral variabile în raport cu rasa și pigmentarea. Factorii care influențează culoarea sunt aportul vascular, grosimea epiteliului, gradul de keratinizare.

Pigmentarea fiziologică melanică apare frecvent la afro-americani, asiatici, indieni și caucazieni din țările mediteraneene.

- aspect de lamă de cuțit(sau ”tivity”),gingia care se adaptează strâns în jurul dintelui.

-fermitate și minimă adâncime a șanțului gingival cu nici o sângerare atunci când este sondat (Wilkins, 2013).

4. Funcțiile mucoasei gingivale

Funcția de protecție.

Mucoasa gingivală, prin epiteliul său keratinizat, îndeplinește în principal funcția de protecție a structurilor subjacente și mai puțin funcția de absorbție și secreție.

Funcția de recepție senzorială.

Prin receptorii pe care-i conține pentru sensibilitatea tactilă, termică și dureroasă, mucoasa gingivală contribuie pe de o parte la apărarea organismului împotriva pătrunderii unor substanțe nocive informând sistemul nervos central asupra calităților fizice și chimice ale alimentelor introduse în gură și inițiază alături de celelalte structuri din cavitatea orală reflexe de înghițire, salivatie, masticatie, (Nanci 2003, Baniță și Deva, 2006).

Funcția de absorbție.

În cantitate mică la nivelul mucoasei gingivale se absorb unele substanțe hidrosolubile: alcool, cocaina, nicotina, nitroglicerina,

Funcția de excreție (emonctoriu).

La nivelul mucoasei gingivale se elimină - excretă, atât prin canalele glandelor salivare cât și prin intermediul celulelor fagocitare unele substanțe nocive pătrunse în organism sau rezultate din procesele metabolice tisulare (uree, acid uric).

În gingie au fost identificate enzime (fosfataza alcalină și fosfataza acidă, glucozo-6-fosfat-dehidrogenaa, lactat-dehidrogenaza, β-glucoronidaza) cu rol în procesele metabolice, în inflamație, în vindecare și cicatrizare (Ross și Pawlina, 2006, Telser, 2007).

CAPITOLUL II - ASPECTELE CLINICO-MORFOLOGICE ALE HIPERCREȘTERII GINGIVALE

1. Conceptul de hipercreștere gingivală

Hipercreșterea gingivală se definește clinic drept îngroșarea sau creșterea de volum a țesuturilor moi care acoperă crestele alveolare cu mai mult de 1 mm, gradul de hipercreștere putând fi variabil, de la limitarea la nivelul papilei interdentare, până la acoperirea întregii coroane a dintelui (Desai și Silver, 1998,American Academy of Periodontology, 2004, Lin și colab., 2007, Kataoka și colab., 2005,Carey și colab., 2009).

2. Clasificarea hipercreșterii gingivale

Hipercreșterea gingivală detectabilă clinic se clasifică în raport cu factorul etiologic și cu modificările patologice pe care le determină:

- **hipercreștere gingivală reactivă** produsă de existența plăcii bacteriene, este forma cea mai comună, denumită și hipercreștere gingivală reactivăfocală, sau hiperplazie inflamatorie, denumită și epulidă. În general, epulidele sunt leziuni sesile sau pedunculate ale gingiei, termenul fiind clinico-topografic, fără o descriere histologică a leziunii, de aceea este preferat termenul de leziune reactivă a gingiei (Kfir și colab., 1980).

- **hipercreșterea gingivală determinată de iritații cronice locale** cum ar fi resturi radiculare, carii, defecte de protezare.

-**hipercreșterea gingivală indusă de tratamentul** cu unele medicamente cum ar fi: anticonvulsivante de tipul fenitoiniei, imunosupresoare - ciclosporina A, antihipertensive blocante ale canalelor de calciu – nifedipina; mai este denumită și hiperplazie gingivală fibrotică.

- **hipercresșterea gingivală determinată de afecțiuni sistemice** – diabet zaharat, unele leucemii.

- **hipercresșterea gingivală congenitală**- epulisul sau tumora Neumann

- **hipercresșterea gingivală determinată de dezechilibre hormonale**, apărută la pubertate sau în sarcină, denumite și epulide (Clocheret și colab., 2003).

-**fibromatoza gingivală** denumită șielefantiazis gingival,sau fibromatoză gingivală idiopatică, hiperplazie gingivală ereditară, leziune gingivală non placă bacteriană, gigantism gingival, sau doar gingie hipertrofică (Bittencourt și colab., 2000, Coletta și Graner., 2006)

3. Aspecte epidemiologicele hipercreșterii gingivale

Incidența varietăților de hipercreștere gingivală variază extrem de mult, în raport de nivelul socio-economic al populației respective și de factorii de risc incriminați, datele raportate fiind de 1/9000 adulți, cele mai numeroase fiind de natură inflamatorie, urmate de hipertrofiile induse de medicamente, fibromatoza gingivală ereditară fiind cea mai rară (www.maxillofacialcenter.com, Academy Report, 2004). Indiferent de factorul etiologic incriminat, prezența plăcii bacteriene este incriminată ca un cofactor etiologic, în special în hipercreșterea indusă de medicamente (Academy Report, 2004).

4. Aspecte clinico-morfologice în hipercreșterea gingivală

De actualitate este următoarea **clasificare clinică** a hipercreșterii gingivale:

Gradul 0 - nu se identifică modificări gingivale

Gradul 1 - hipercreștere localizată la papila interdentară

Gradul 2 - hipercreștere ce interesează papila interdentară și gingia marginală

Gradul 3- hipercreștere ce acoperă $\frac{3}{4}$ sau peste din coroana dintelui (Bokenkamp, 1994, DeAngelo, 2007, Douzgou și Dallapicolla,2011).

5. Aspecte histologice în hipercreșterea gingivală

Este de actualitate și larg acceptat faptul că indiferent de factorul etiologic incriminat, hipercreșterea gingivală se caracterizează prin creșterea volumului țesutului conjunctiv cu grade diferite de inflamație și fibroză și îngroșarea epiteliului. Gradul de inflamație, fibroză, hiperplazia celulară depind de durata, doza și tipul drogului dacă hipercreșterea este determinată de medicamente dar și de calitatea igienei orale sau de susceptibilitatea individuală și factori externi (Trackman și Kantarci, 2004).

6.Tratamentul hipercreșterii gingivale

Toți autorii subliniază importanța efectuării corecte a igienei orale, susținută de îngrijiri periodice profesionale în evoluția favorabilă a îmbolnăvirii gingivale dar și ca adjuvant important în cazul intervențiilor chirurgicale, cu rol în întârzierea apariției recidivelor (Oh și colab., 2002, Douzgou și Dallapicola, 2011).Majoritatea autorilor susțin că igiena orală reprezintă cheia reducerii recidivelor și a gravității lor.

Intervenția chirurgicală clasică trebuie efectuată pe cadrane, în mai multe ședințe, deoarece țesutul poate sângera excesiv.Utilizarea laserului cu CO₂ permite rezolvarea problemei într-o singură ședință deoarece sângerarea intraoperatorie este redusă, ceea ce îmbunătățește vizibilitatea și grăbește viteza de execuție.

7. Căi patogenice implicate în hipercreșterea gingivală

Sinteza studiilor de specialitate arată că în inflamație, în cicatrizare sau în leziunile fibrotice sunt implicate aceleași molecule și evenimente biologice (Bartold și Narayanan, 2006). Aceiași autori arată că fibroza poate interveni ca răspuns al unui factor izolat sau al unei combinații de factori cum ar fi:

- eliberarea anormală de mediatori în timpul inflamației. Sinteza unor molecule determină eliberarea altora iar dialogul acestora poate avea efecte sinergice, cumulative sau antagonice.

- persistența modificărilor anormale în profilul acțiunii unor factori de creștere și citokine.

Motivarea și premisele studiului

Ne-am propus un studiu coroborat, clinic, histologic și imunohistochimic al unei varietăți de hipercreștere gingivală definită clinic drept hipercreștere gingivală fibromatoasă sau fibrotică. Numeroși factori etiologici locali sau generali genetici sau ereditari, dar și unele medicamente, în special fenitoina, determină această varietate a hipercreșterii gingivale, de unde și confuzia de terminologie, frecvent în literatura de specialitate fiind definită drept fibromatoză gingivală.

Beneficiind de noi tehnici de cercetare, în special genetice și de biologie moleculară, hipercreșterea fibromatoasă a fost mai precis încadrată din punct de vedere al definirii factorilor etiologici, cuprinzând fibromatoza ereditară, determinată genetic de mutații ale genei SOS, sindromică, care recunoaște numeroase mutații genetice ce determină și alte manifestări clinice în afara hipercreșterii gingivale și fibromatoza idiopatică determinată de factori etiologici necunoscuți, deseori în această denumire fiind incluse în continuare și fibromatozele ereditare sau cele sindromice.

Obiectivele studiului

Obiectivul general al studiului propus a fost compararea și coroborarea aspectelor clinice, histologice și imunohistochimice ale pacienților diagnosticați la examenul clinic de specialitate cu hipercreștere gingivală fibromatoasă. Cazurile clinice studiate au provenit de la pacienți cu hipercreștere gingivală fibrotică determinată de mai mulți factori etiologici. Am exclus din studiul nostru hipercreșterea determinată de fenitoină, de asemenea cu caracter fibrotic, dar care recunoaște mecanisme patogenice diferite, studiate alături de celelalte medicamente ce determină hipercreștere gingivală.

Obiectivele specifice ale acestei lucrări au fost:

1. Caracterizarea clinică a hipercreșterii gingivale fibrotice în funcție de factorul etiologic.
2. Caracterizarea histologică a modificărilor mucoasei gingivale în raport cu factorul etiologic determinant și descrierea aspectelor particulare ale epitelului și laminei propria.
3. Coroborarea gradului de încărcare fibrotică cu prezența leziunilor gingivale inflamatorii.
4. Investigarea imunohistochimică a principalelor fenotipuri de fibroblaste folosind markeri specifici: vimentină, α -sma și FSP1 și coroborarea rezultatelor cu aspectele histologice caracteristice pentru fiecare caz în raport cu factorul de risc.
5. Testarea ipotezei că fibroblastele gingivale active provin din diferențierea keratinocitelor prin mecanismul de tranziție epitelio-mezenchimală.
6. Testarea ipotezei că în raport de factorul etiologic incriminat, epiteliul gingival joacă un rol important în creșterea sintezei de matrice extracelulară ca rezervor de celule sintetizante, prin investigarea exprimării FSP1, Ki-67 și E-cad, sau ca sursă de factori de creștere profibrilogenetici.
7. Investigarea surselor tisulare, a nivelului de sinteză și a raporturilor de interdependență pentru cei doi factori de creștere majori profibrilogenetici: TGF β 1 și CTGF.

CAPITOLUL III-STUDIUL CLINIC AL HIPERCREȘTERII GINGIVALE FIBROTICE

Scopul studiului acestui capitol este:

1. de a defini și descrie componentele de bază ale examinării hipercreștere gingivală fibrotică.
2. de a estima inițierea și evoluția formelor de hipercreștere gingivală fibrotică cu rolul de a crea o bază de date utilă în diagnosticul și terapia acestei afecțiuni.

1. Material și metodă

Materialul studiat

Lotul inițial luat în studiu a fost format din 15 pacienți, ce s-au prezentat în Clinica de chirurgie OMF și Clinica de parodontologie din cadrul Facultății de Medicină Dentară a U.M.F. Craiova.

După o amplă documentare științifică ce a permis, pe baza unei revizuirii sistematice a datelor din literatura de specialitate, definirea unor considerații și principii actuale în ceea ce privește aspectele clinice și paraclinice ale fibromatozei gingivale, s-a trecut la selectarea cazurilor ce fac subiectul prezentului studiu.

Investigarea a început în 2010, și a constat în evaluarea lotului de pacienți, de ambele sexe, cu vârste cuprinse între 7 și 59 de ani.

Criteriul de includere în lot a fost reprezentat de semne clinice *subiective* și *obiective*, ce pot orienta diagnosticul spre o formă de fibromatoză gingivală. Numărul final luat în considerare și inclus în lotul de cercetare a fost de 10 cazuri.

2. Rezultate

Pacientii au prezentat leziuni localizate ale mucoasei gingivale determinate de prezența plăcii bacteriene și depozitelor de tartru la nivelul ambelor arcade.

Leziunea inițială a debutat la nivelul gingiei marginale și a papilei interdente sub forma unei rotunjimi. Pe măsură ce inflamația a progresat, aceste creșteri de dimensiune ale gingiei marginale și papilare s-au unit transformându-se într-un pliu tisular masiv ce au acoperit o porțiune considerabilă a coroanei și au interferat cu ocluzia.

3. Discuții

Fibromatoza gingivală poate fi atribuită mai multor cauze: inflamatorii, afecțiuni ereditară, afecțiune asociată unui alt sindrom și o afecțiune legată de efectele secundare ale unor medicamente.

Fibromatoza gingivală ereditară se însoțește de o serie de complicații, în funcție de dimensiunea măririi de volum:

- tulburări fizionomice
- întârzieri în erupție
- deplasări dentare datorită țesutului fibros
- malocluzii, dureri, când mucoasa acoperă parțial suprafața ocluzală și este traumatizată în timpul masticației

Ca tablou clinic, primele semne ale măririlor de volum gingivale induse apar la 3-4 luni după administrarea medicamentului. În cazul fenitoiniei, mărirea de volum începe după 2-3 săptămâni de administrare și atinge apogeul după 18-24 de luni . (McDonald, 1994).

Fibromatoza gingivală poate fi prezentă ca o variantă nonsindromică izolată și ocazional asociată cu epilepsie, retard mintal sau hipertricoză (Peeran si colab. 2013).

CAPITOLUL IV-STUDIUL HISTOLOGIC AL HIPERCREȘTERII GINGIVALE FIBROTICE

1. Material și metodă

Studiul histologic a fost efectuat pe cazurile selectate în urma examenului clinic, așa după cum au fost prezentate în capitolul anterior.

În raport cu diagnosticul inițial, aspectul lezional și evoluția clinică în urma tratamentului instituit a fost efectuată gingivectomia terapeutică pentru un număr de 12 cazuri diagnosticate clinic cu hipercreștere gingivală fibrotică.

O parte din cazurile incluse în studiul histologic a provenit din banca de probe biologice existente realizată în cadrul proiectului de cercetare ID 563 2008-20011.

Pacienții incluși în prezentul studiu au avut vârsta cuprinsă între 7-59 ani, 6 dintre aceștia fiind de sex feminin și 5 de sex masculin.

Constituirea loturilor de studiu:

- **lotul I** - hipercreștere gingivală focală reactivă - **4 cazuri**
- **lotul II** - fibromatoză gingivală ereditară –**3cazuri**
- **lotul III** - fibromatoză gingivală sindromică - **2 cazuri**
- **lotul IV** - fibromatoză gingivală idiopatică -**3 cazuri**

Metodele utilizate

Metode histologice uzuale

Prelucrarea histologică a materialului biologic s-a făcut în cadrul Laboratorului de Histologie al UMF Craiova. Tehnicile histologice utilizate au presupus parcurgerea mai multor etape care vor fi descrise în continuare.

Includerea în parafină

- fixarea;
- deshidratarea;
- clarificarea;
- parafinarea;
- includerea propriu-zisă și formarea blocului.

Piesele bine îmbibate cu parafină topită se înglobează într-un bloc de parafină de consistență omogenă care se solidifică la temperatura camerei. Drept formă pentru turnarea blocurilor se pot folosi mici matrițe sau casete de plastic susținute de un suport de metal (inox). Se toarnă parafina topită în suportul de metal încălzit în prealabil. Apoi, cu o spatulă bine încălzită la flacără, se trece prin parafina din formă pentru a scoate eventualele bule de aer care s-au format și pentru a topi pojghița subțire de parafină formată la suprafață. Cu o pensă încălzită la flacără se scoate piesa din ultima baie de parafină aflată în termostat și se scufundă în parafina din matriță.

Obținerea secțiunilor histologice

Secționarea blocului de parafină

Secționarea blocurilor s-a făcut la un microtom Leica, realizând secțiuni (cupe) de 3-5μm. Secțiunile s-au întins pe lame de sticlă care în prealabil au fost curățate și degresate.

Lipirea secțiunilor pe lame

Secțiunile au fost culese, una câte una, fie pe pe suprafața tratată cu polilisină a lamelor port-obiect. Fiecare lamă a fost introdusă în lichidul din cristalizator plasându-se oblic sub secțiune, după care a fost ridicată încet în timp ce secțiunea a fost menținută în mijlocul lamei cu ajutorul unui ac.

2. Colorarea secțiunilor

Tehnica de colorare cu hematoxină-eozină (HE)

Aceasta este cea mai folosită tehnică de colorare pentru vizualizarea arhitectoniei țesuturilor, colorând în mod diferit structurile în funcție de proprietățile tinctoriale ale acestora.

Tehnica de colorare tricromic după metoda Masson (Masson modificat)

Tehnica de impregnare argentică (Gömöri modificată)

Această metodă este folosită pentru detectarea fibrelor de reticulină din diferite țesuturi pe secțiuni fixate în formalină tamponată și incluse în parafină.

Tehnica PAS-Alcian Blue (albastru alcian)

Această metodă se aplică pentru a identifica mucopolizaharidele neutre, mucoproteinele, glicoproteinele și glicolipidele, precum și glicozaminoglicanii în țesuturi.

3.Rezultate

Colorațiile histologice uzuale au arătat diferențe semnificative la examinarea de ansamblu a cazurilor provenind din cele patru loturi. Astfel, în fibroza gingivală focală reactivă mucoasa în ansamblul său a prezentat aspect îngroșat, determinat de creșterea grosimii epitelului și îngroșarea laminei propria. Imaginile de ansamblu arată în chorion acumulare de fibre colagene în benzi groase a căror intersectare lasă spații înguste insulare cu infiltrat inflamator bine reprezentat.

Epiteliul apare pe unele suprafețe îngroșat, cu aspect papilomatos, cu creste adânci și uneori ramificate, cu zone de parakeratoză alternând cu altele de hiperkeratoză, pentru același caz descris mucoasa recoltată la nivelul sulcusului gingival prezintă epiteliu foarte îngroșat, cu celule superficiale balonizate sau prezentând zone de parakeratoză și intens infiltrat cu celule inflamatorii. La acest nivel se remarcă frecvent și zone de akantoză cu akantoliză. Imaginile de detaliu care surprind papilele chorionului pe secțiuni transversală arată o creștere a cantității de matrice extracelulară la nivelul acestora, cu puține celule și vase sanghine, dar cu densificarea fasciculelor conjunctive, ceea ce transformă conjunctivul lax papilar într-un țesut conjunctiv dens. Aceste aspecte sunt însoțite de puține celule inflamatorii, atât la nivel conjunctiv cât și epitelial. Vasele sanghinede tip capilar sunt prezente în număr mai mare în papile corionului lipsite de acumulare fibrotică, iar arteriole sau venule dilatate apar în ariile de acumulare de celule inflamatorii, alături de capilare de dimensiuni reduse.

4. Concluzii și discuții

În prezentul capitol ne-am propus un studiu sistematic al fibromucoasei gingivale în hipercreșterea gingivală fibrotică. Cazurile selectate în urma diagnosticului clinic au fost introduse în patru loturi de studiu. Loturile au fost astfel concepute încât să includă acumulare de matrice extracelulară determinată de mai mulți factori de risc sau factori etiologici, astfel încât să putem compara aspectele histologice surprinse. Hipercreșterea gingivală fibrotică diagnosticată la examenul clinic se caracterizează histologic prin mărirea de volum a fibromucoasei gingivale la care participă în egală măsură epiteliul gingival și țesutul conjunctiv subjacent.

Colorațiile speciale sunt importante în studiul modificărilor morfologice deoarece indică modificări cantitative - depunerile de matrice organică care cresc consistența fibromucoasei gingivale la examinarea clinică dar care nu se regăsesc sub forma aspectului fibrilar la examinarea histologică în colorații uzuale.

CAPITOLUL V-STUDIUL INMUNOHISTOCHEMIC AL CĂILOR PATOGENICE IMPLICATE ÎN DEPUNEREA DE COLAGEN ÎN HIPERCREȘTEREA GINGIVALĂ FIBROTICĂ

În prezentul capitol ne-am propus evidențierea prin tehnici de imunohistochimie a unor molecule implicate în multiplicarea, diferențierea și reglarea funcțiilor de sinteză ale fibroblastelor, celule principale implicate în sinteza matricei extracelulare în fibromucoasa gingivală.

1. Material și metodă

Materialul studiat

În studiul imunohistochimic au fost utilizate aceleași probe de țesut gingival care au fost prelucrate în tehnica pentru includerea în parafină și ulterior colorate cu colorații histologice uzuale, așa cum am prezentat în capitolul anterior.

Metodele utilizate

Tehnici imunohistochimice

Imunohistochimia reprezintă o tehnică folosită pentru studiul de morfologie microscopică, utilizată atât în scop de cercetare cât și în diagnosticul histopatologic.

Imunohistochimia reprezintă de fapt adaptarea *in vitro* a unei reacții antigen-anticorp amplificată, care va asigura evidențierea localizării *in situ* a componentelor specifice anumitor celule și țesuturi.

Clasificarea tehnicilor imunohistochimice

Metoda directă. Metoda directă se efectuează într-o singură etapă și implică un anticorp marcat (de exemplu antiser conjugat FITC) care reacționează direct cu antigenul din secțiunile de țesut. Această tehnică utilizează un singur anticorp, este rapidă și de scurtă durată. Cu toate acestea, nu este foarte sensibilă datorită amplificării mici a semnalului și este tot mai rar folosită de la introducerea în practică a metodei indirecte.

Metoda indirectă. Metoda indirectă implică utilizarea a doi anticorpi: un anticorp primar nemarcat, care reprezintă primul strat și care reacționează cu antigenul tisular, și un anticorp secundar, care va reacționa cu anticorpul primar, reprezentând al doilea strat. Este obligatoriu ca anticorpul secundar să fie anti IgG a speciei de animal care a produs anticorpul primar.

Anticorpii folosiți în studiu

În tabelul următor sunt prezentați anticorpii folosiți pentru detectarea antigenelor evaluate în studiile imunohistochimice din această lucrare, sursa, diluțiile și metoda imunohistochimică folosită pentru fiecare anticorp.

ANTICORP Sursă	Cod	Diluție	Metoda
Monoclonal mouse antihuman α -smooth muscle actin (1A4) Dako	M0851	1:100	EnVision
Monoclonal mouse anti Ki-67 Dako	M7020	1:50	ABC
Monoclonal mouse antihuman vimentin (V9) Dako	M0725	1:50	LSAB
Monoclonal mouse antihuman CTGF 6(B13) Santa Cruz Biotechnology Inc., SUA	Sc-101586	1:300	ABC
Monoclonal mouse anti human TIMP-2 (3A4) Santa Cruz Biotechnology Inc., SUA	Sc-21735	1:100	ABC
Monoclonal mouse anti human e-Cadherin (NCH38), Dako	M3612	1:100	ABC
Polyclonal rabbit anti-human S100 A4, Dako	A5114	1:200	ABC

2.Rezultatele obținute

Studiul exprimării imunohistochimice a markerilor fibroblastici

Pentru evidențierea fenotipurilor fibroblastice implicate în sinteza colagenului am folosit anticorpi anti-vimentină, anti α -sma și anti S100-A4 (FSP1).

Imunoreacția pentru α -sma arată pentru lotul I, alcătuit așa după cum am arătat din creșteri fibrotice de natură reactivă locală, o pozitivitate extrem de restrânsă, constant remarcată la nivelul pereților vaselor de sânge. Am folosit acest aspect ca martor intern al reacției imunohistochimice. Se poate astfel observa numărul relativ modest de vase sanghine, atât la nivelul papilelor chorionice cât și în chorionul profund.

Reacția imunohistochimică pentru lotul I în situația pacienților cu hipercreștere gingivală fibrotică secundară purtării unui aparat ortodontic a arătat o incidență mult mai mare a numărului celulelor α -sma pozitive în comparație cu pacienții aceluiași lot, dar cu hipercreștere determinată de cauze locale inflamatorii.

Studiul expresiei imunohistochimice a Ki-67 și E-cadherinei

Reacția pozitivă pentru FSP1 a unui număr mare de keratinocite și a numeroase fibroblaste din lamina propria ne-a determinat să continuăm studiul imunohistochimic pentru determinarea originii acestor fibroblaste. În acest sens am folosit doi anticorpi, e-cadherina (E-cad) și Ki-67.

Cazurile de hipercreștere gingivală fibromatoasă provenit din loturile II și III - fibromatoză gingivală ereditară respectiv sindromică, s-au caracterizat printr-un număr superior de celule aflate în diviziune în stratul bazal epitelial, marcate specific cu Ki-67.

Studiul exprimării imunohistochimice a factorilor de creștere profibrilogenetici

Principalii factori de creștere recunoscuți pentru rolul lor în stimularea sintezei matricei extracelulare sunt TGFβ1 și CTGF.

Ca și în situația markerilor ale căror rezultate obținute în urma marcării imunohistochimice a fost descrisă, cei doi factori de creștere menționați au prezentat reacții diferite atât în raport cu lotul de studiu, dar și în cadrul aceluiași lot.

3. Discuții și concluzii

În prezentul capitol am urmărit evidențierea unor molecule implicate în sinteza colagenă și anume molecule cu rol în multiplicarea, diferențierea și metabolismul populațiilor fibroblastice din chorionul gingival. Rezultatele noastre indică un număr mare de elemente mezenchimale pozitive pentru vimentină în lotul I, conținând fibromucoasele provenind de la pacienții cu fibroză reactivă focală, în timp ce în același lot pacienții cu fibroză dezvoltată în urma purtării aparatului ortodontic au prezentat un număr redus de celule vimentin pozitive, asemănător celor din lotul IV.

Diagnosticul clinic de fibromatoza gingivală recunoaște mai multe căi patogenice în funcție de factorul etiologic sau de risc incriminat.

Fibroblastele, principala populație celulară implicată în sinteza de matrice extracelulară prezintă o variație fenotipică importantă, fiind marcate în marea majoritate de FSP1 și vimentină.

TGF-β1 deține rol nu doar în creșterea depunerii de colagen ci și în mecanismul de tranziție epiteliomezenchimală, fiind prezent constant la nivelul vârfului creștelor epiteliale dar și în keratinocite izolate.

CONCLUZII GENERALE

Hipercreșterea gingivală fibrotică diagnosticată la examenul clinic prezintă aspecte histologice sensibil asemănătoare indiferent de factorul etiologic determinant.

Constant se remarcă îngroșarea epitelială și creșterea volumului țesutului conjunctiv.

Principalele elemente conjunctive sunt fibrele colagene, a căror structură variază însă în raport de gradul de inflamație, predominând colagenul tip I când inflamația este redusă, în timp ce colagenul tip III crește cantitativ în situația unei infiltrări inflamatorii consistente.

Gradul de inflamație locală diferă în raport cu factorul etiologic: în hipercreșterea reactivă și în cea idiopatică țesutul de granulație este mult mai bine reprezentat decât în fibromatoza ereditară și cea sindromică.

Populația fibroblastică din lamina propria este numeroasă și extrem de heterogenă, fenotipurile celulare diferind în raport cu factorul etiologic incriminat. Fibroblastele sunt frecvent pozitive pentru vimentină, majoritar pozitive pentru FSP1 și doar sporadic se remarcă miofibroblaste pozitive pentru α - sma.

Studii ulterioare sunt necesare pentru determinarea capacității de sinteză colagenă pentru fiecare dintre aceste populații.

Factorii de creștere profibrilogenetici TGF-β1 și CTGF sunt bine reprezentați în cazurile de depunere fibrotică accentuată, exprimarea lor imunohistochimică fiind prezentă în toate cazurile studiate, indiferent de gradul de depunere colagenă și de etiologie.

Bibliografie

American Academy of periodontology. Informational paper: drug associated gingival enlargement, . J.periodontol., 75:1424-31, 2004.

Baniță M., Deva V., Organul Dentar, Editura Alma, Craiova: 68-78, 96-102, 2006.

Bartold, P.M. , Narayanan A. S. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues, Periodontol 2000 vol.40, 29-49, 2006.

Bittencourt L.P., campos V., Moliterno L.F.M., Ribeiro D.P.B., Sampaio R.K., Hereditary Gingival Fibromatosis Review of the Literature and a case report, Oral Medicine, Quintessence International 2000; 31(415-418), 2000.

Bökenkamp A, Bohnhorst B, Beier C, Albers N, Offner G, Brodehl J. Nifedipine aggravates cyclosporine A-induced gingival hyperplasia., *Pediatr Nephrol.* Apr;8(2):181-5., 1994

Carey JC, Cohen MM Jr, Curry CJ, Devriendt K, Holmes LB, Verloes A., Elements of morphology: standard terminology for the lips, mouth, and oral region., *Am J Med Genet A.* Jan;149A(1):77-92. doi: 10.1002/ajmg.a.32602. 2009.

Clocheret K, Dekeyser C, Carels C, Willems G, Idiopathic gingival hyperplasia and orthodontic treatment case report. *J Orthodontics*, 30(1):13-19. 2003.

De Angelo S, Murphy J, Claman L, Kalmar J, Leblebicioglu B, Hereditary gingival fibromatosis: a review, *Compend Contin Educ Dent*, 28(3):138-143., 2007.

Desai P, Silver JG., Drug-induced gingival enlargements. *J Can Dent Assoc.* Apr;64(4):263-8., 1998.

Douzgou S., Dallapiccola B., The gingival Fibromatoses, [www. intechopen.com](http://www.intechopen.com), 2011.

Kataoka M, Kido J, Shinohara Y, Nagata T, Drug-Induced Gingival Overgrowth-a Review, *Biol Pharm Bull*, 28(10):1817-1821, 2005.

Kfir Y, Buchner A, Hansen LS. Reactive lesions of the gingiva. A clinicopathological study of 741 cases. *J Periodontol.* Nov;51(11):655-61, 1980.

Lin K., Guihoto L.M.F.F., Marcia Targas Yacubian E, Drug-Induced Gingival Enlargement – Part II . Antiepileptic Drugs Not Only Phenytoin is Involved, *JEpilepsy and Clinical Neurophysiology*, 13(2) 83-88, 2007.

McDonald A., Post/cores in dentistry: a review. *J Ir Dent Assoc.* ;40(3):69-71, 74, 77., 1994.

Nanci A., Ten cate's oral Histology, Development, structure and function, Sixth, Mosby, 2003.

Oh TJ, Eber R, Wang HL. Periodontal diseases in the child and adolescent. J Clin Periodontol. May;29(5):400-10. 2002.

Peeran SW, Ramalingam K, Peeran SA, Mugrabi MH, Abdulla KA., Hereditary nonsyndromic gingival fibromatosis: report of family case series. Case Rep Dent. 2013;2013:835989. Epub Sep 26., 2013.

Ross M.H. Pawlina W. Histology, A text and Atlas, with correlated cell and molecular biology, Fifth edition, Lipincott Williams & wilkins, 2003.

Telser A.G., Integrated Histology Mosby, Elsevier, 2007.

Trackman PC, Kantarci A, Connective tissue metabolism and gingival overgrowth, Crit Rev Oral Biol Med, 15(3):165-175., 2004.

Wilkins Esther M. BS Clinical Practice of the Dental Hygienist: Text and Student Workbook, Package 11th Edition, 2013.

www.maxillofacialcenter.com