

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Studiul histopatologic și imunohistochimic al invazivității
locale în ameloblastoamele oaselor maxilare**

**Conducător Științific:
PROF. UNIV. DR. Prof. Surpățeanu Mihai**

**Student Doctorand:
Turcu Adina Andreea**

CRAIOVA 2017

CUPRINS

INTRODUCERE	1
--------------------	----------

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I. EPIDEMIOLOGIA TUMORILOR ODONTOGNE	6
I.1. INCIDENȚĂ ȘI DISTRIBUȚIE GEOGRAFICĂ	6
I.2. DISTRIBUȚIA ÎN FUNCȚIE DE VÂRSTĂ, SEX ȘI LOCALIZARE TOPOGRAFICĂ	8
CAPITOLUL II. ETIOPATOGENIA TUMORILOR BENIGNE ODONTOGNE	12
II.1. PRINCIPALELE CĂI DE SEMNALIZARE MOLECULARE IMPLICATE ÎN ETIOPATOGENEZA TUMORILOR BENIGNE ODONTOGENE	12
II.2. CĂI PATOGENICE PARTICULARE AMELOBLASTOAMELOR MAXILARE	20
CAPITOLUL III. FACTORI PROGNOSTICI AI INVAZIVITĂȚII TUMORILOR BENIGNE ODONTOGNE, CU REFERIRE ÎNDEOSEBI LA AMELOBLASTOM	33

CONTRIBUȚII PROPRII

CAPITOLUL IV. STUDIUL HISTOPATOLOGIC AL AMELOBLASTOAMELOR	44
IV.1. MATERIAL ȘI METODĂ	44
IV.2. REZULTATE	49
IV.3. DISCUȚII	95
IV.4. CONCLUZII	109
CAPITOLUL V. STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC AL AMELOBLASTOAMELOR	112
IV.1. MATERIAL ȘI METODĂ	112
IV.2. REZULTATE	118
IV.3. DISCUȚII	217
IV.4. CONCLUZII	235
CAPITOLUL VI. CONCLUZII FINALE	237
BIBLIOGRAFIE	241

INTRODUCERE

Ameloblastomul se numără printre cele mai frecvente tumori odontogene și se caracterizează printr-un comportament biologic în general benign, dar cu o mare capacitate de invazie locală și cu un risc crescut de recidivă. Totuși este o neoplazie rară, incidența sa globală fiind de circa 0,5 cazuri la un milion de locuitori și pe an. Diversitate morfologică a acestui tip de tumoră creează deseori confuzii, întrucât o serie de neoplazii benigne și maligne și chiar leziuni chistice pot mima histologic ameloblastomul, punând serios la încercare anatomopatologul. Deși comportamentul lor este unul benign, ameloblastomul are un comportament biologic invaziv local, tumora în evoluția sa determină expansiunea oaselor maxilare, subțierea și erodarea corticalelor osoase și ulterior și invazia în țesuturile moi adiacente.

Având în vedere toate aceste considerente studiul de față și a propus investigarea din punct de vedere epidemiologic, histopatologic, imunohistochimic și statistic un număr de 62 de bolnavi diagnosticați cu ameloblastoame de-a lungul unui interval de 8 ani, între 2008-2015. Studiul epidemiologic a scos în evidență prevalența ameloblastoamelor maxilare la persoanele de sex feminin, în decada a IV-a de viață și afectând cu precădere regiunea premolară/molară a mandibulei drepte. Studiul histopatologic a evidențiat prevalența formelor solide de ameloblastom, cu subtipurile predominante folicular și plexiform. Invazia osoasă, ca semn al agresivității acestor tumori a fost consemnat de noi în aproape două treimi din cazuistica investigată, aspect morfologic prezent mult mai frecvent în subtipul solid folicular și respectiv în cel solid plexiform.

Analiza imunohistochimică a vizat îndeosebi particularitățile procesului de invazivitate din aceste tumori investigându-se: imunoreactivitatea pentru metaloproteinaza Zinc-dependentă CD10, receptorul chemokinic CXCR4, factorul de creștere EGFR, sialomucina transmembranară Podoplanină, molecula de adeziune N-caderină, factorul transcripțional Snail, microfilamentele F-actină și proteina WASL-reglatoare a reorganizării citoscheletului actinic. Astfel, s-a dovedit implicarea în procesul de invazivitate mai ales a markerilor F-actina, WASL, Snail, podoplanina și EGFR, pentru care indiferent de subtipul histopatologic s-au obținut cele mai mari scoruri de imunoreactivitate. La baza agresivității locale a ameloblastoamelor au stat: un

proces activ de tranziție epitelio-mezenchimală (dovedit prin implicarea factorului de transcripție Snail, a podoplaninei și a proteinei invadopodice WASL ce coordonează rearanjarea intracelulară a filamentelor F-actinice) și supraexpresia factorului de creștere EGFR(implicat în progresia și creșterea locală tumorală). Acest studiu scoate în evidență implicarea certă a unora din biomarkerii investigați în comportamentul agresiv local (Snail, podoplanina, EGFR și CXCR4), sublinind valoarea prognostică a acestora dar și utilitatea lor terapeutică, ei putând constitui ținte moleculare eficiente în terapia acestor tumori odontogene..

Cuvinte cheie: ameloblastom, factori prognostici, imunohistochimie, invazivitate locală, tumoră odontogenă,

CAPITOLUL I. EPIDEMIOLOGIA TUMORILOR ODONTOGNE - prezintă cele mai noi date despre incidența, distribuția geografică, distribuția în funcție de vârstă, sex și localizare topografică a acestor neoplazii.

CAPITOLUL II. ETIOPATOGENIA TUMORILOR BENIGNE ODONTOGNE – descrie mai întâi principalele căi de semnalizare moleculare implicate în etiopatogeneza tumorilor benigne odontogene din perspective celor mai noi cunoștințe raportate în literatură. Apoi se face o trecere în revistă a căilor patogenice particulare implicate în tumorigeneza ameloblastoamelor maxilare.

CAPITOLUL III. FACTORI PROGNOSTICI AI INVAZIVITĂȚII TUMORILOR BENIGNE ODONTOGNE, CU REFERIRE ÎNDEOSEBI LA AMELOBLASTOM – în care se face o trecere în revistă a principalelor tipuri de tumori odontogene benigne cu potențial invaziv local, după care sunt prezentate biomarkerii și mecanismele moleculare ce stau la baza agresivității locale a ameloblastoamelor.

OBIECTIVELE STUDIULUI

I. Evaluarea caracteristicilor epidemiologice și histopatologice ale ameloblastoamelor maxilare din punct de vedere al prognosticului, pentru o perioadă de timp de 8 ani, prin cuantificarea următorilor parametri:

- epidemiologici: sexul, vârsta bolnavilor și localizarea tumorilor;
- histopatologici: varianta histopatologică, tipul diferențierilor citologice, tipul patternurilor de creștere tumorală, aspectele particulare ale stromei, prezența/absența invaziei, tipul morfologic de invazie.

II. Stabilirea imunoprofilului agresiv local al acestor tumori prin investigarea:

- biomarkerilor adresați direct invazivității tumorale: CD10, CXCR4 și EGFR;
- biomarkerilor implicați în procesul de tranziție epitelio-mezenchimală a celulelor tumorale: Podoplanină, N caderină, Snail, F-actină și WASL.

CAPITOLUL IV- STUDIUL HISTOPATOLOGIC AL AMELOBLASTOAMELOR.

MATERIALUL CERCETAT- din cazistica Laboratorului de Anatomie Patologică a Spitalului Spitalul Clinic de Chirurgie Oro-Maxilo-Faciala "Prof. Dr. Dan Theodorescu", București și a fost reprezentat de blocurile de parafină arhivate. Studiul s-a întins pe durata a 8 ani, cazurile fiind selectate în intervalul de timp 2008-2015, cu un număr de 62 de cazuri de ameloblastom maxilar ce au constituit obiectul studiului histopatologic.

METODE UTILIZATE

Studiul histopatologic s-a efectuat pe preparate permanente prelucrate în tehnica histopatologică clasică de fixare în formol, includere la parafină, secționare la microtom și colorarea cu Hematoxilină-Eozină (H.E.), Periodic Acid Schiff (PAS) și tricromic Van Gieson (tr. VG).

Variabilele urmărite:

- epidemiologice: vârsta, sexul, mediul de proveniență, antecedente heredocolaterale (istoric familial de ameloblastom), antecedente personale, acuzele subiective ce au determinat prezentarea pacienților la medic și istoricul bolii.
- Histopatologice: tipul și subtipul histopatologic al tumorilor investigate, patternul de creștere tumoral, diferențierile citologice ale tumorilor examinate, aspectul stromei tumorale, aspectul invaziei și creșterii tumorale.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Repartiția pe sexe a cazuisticii noastre a arătat un ușoară prevalență a cazurilor de ameloblastom la bolnavii de sex feminin (51,60%), fără să existe diferențe semnificative statistice în ceea ce privește distribuția pe sexe în funcție de subtipul histopatologic. Datele din literatură indică o distribuție uniformă a cazuisticii pe cele două sexe [Dhanuthai et al., 2012] sau o ușoară prevalență la sexul masculin [Dias et al., 2013; Filizzola et al., 2014]. Referitor la distribuția pe grupe de vârstă a cazuisticii am consemnat o plajă largă, cu cazuri depistate începând cu decada a II-a până în decada a IX-a de viață. Valoarea mediană a vârstei la care s-au dezvoltat ameloblastoamele incluse în studiu a fost de 33 de ani, aceasta fiind de circa 29 de ani pentru subtipul folicular, 32 de ani pentru cel plexiform și respectiv 53 de ani pentru subtipul acantomatos. Date din literatură, respectiv în cadrul celei mai mari serii, respectiv 3677 de cazuri de ameloblastom, s-a raportat faptul că vârsta bolnavilor a variat între 4 și 92 de ani [Reichart et al., 1995]. Cel mai tânăr bolnav raportat cu ameloblastom a avut 2 ani [Fulco et al., 2010], în timp ce cel mai învârstă a avut 93 de ani [Ord et al., 2002]. Cea mai frecventă localizare a ameloblastoamelor din cazuistica noastră a fost regiunea premolară/ molară a mandibulei, respectiv 55% din totalul leziunilor dezvoltându-se la acest nivel. Aproximativ 56,45% din tumorile cu această localizare au afectat mandibula dreaptă. Majoritatea studiilor indică mandibula ca fiind mult mai frecvent interesată comparativ cu maxila, cu un raport variind de la 5:1 la 90:1 [Filizzola et al., 2014; Gardner et al., 2005]. Există variații geografice, raportându-se pentru continentul asiatic un raport mergând de la 8:1 la 13.3:1 comparativ cu continentul Nord American unde acest raport a variat de la 3:1 la 6:1 [Dhanuthai et al., 2012].

În studiul nostru, **analiza histopatologică** a pieselor de exereză chirurgicală a reliefat prevalența formelor solide de ameloblastom cu un procent de 90,5%, la polul opus situându-se ameloblastoamele periferice cu un procent de 3.15%. În cadrul ameloblastoamelor solide de departe cele mai frecvente au fost cele foliculare cu 74,2% din totalul cazuisticii, pe locul doi situându-se varianta plexiformă cu 74,2% din totalul cazuisticii analizate. În cadrul grupului de ameloblastoame solide foliculare, subvarianta cea mai bine reprezentată a fost cea tipică diagnosticată în 51,6% din totalul cazuisticii noastre. În studiul întreprins de noi asocierea mai multor patternuri de creștere a fost observată în 23,5% din cazuistica investigată și au constat din asocierii de pattern folicular cu pattern plexiform și trabecular. Potrivit datelor din literatură, ameloblastoamele solide afectează mandibula [Adeline et al., 2008; Ledesma-Montes et al., 2007], în special regiunea sa posterioară [Adeline et al., 2008; Ledesma-Montes et al., 2007], raportul incidenței acestei varietăți de ameloblastom la cele 2 oase gnatiche fiind de of 1:5,4 [Reichart et al., 1995]. Strict din punct de vedere histopatologic datele privind incidența diverselor subtipuri de ameloblastom solid/multichistic sunt extrem de variabile. Astfel, Waldron și El-Mofty, pe o cazuistică de 116 ameloblastoame au raportat o incidență de 64,9% a ameloblastomului solid de tip folicular, de 16,9% a subtipului plexiform și o asociere a celor variante în 12,9% din cazurile investigate [Waldron & El-Mofty, 1987]. În schimb, Reichart et al., pe cea mai mare serie raportată în literatură de ameloblastoame (3677 de cazuri) a găsit pentru subtipul folicular o incidență de 35,4%, pentru tipul plexiform o frecvență de 31,5%, iar pentru varianta ameloblastomatoasă o incidență de 11,8% [Reichart et al., 1995]. Totodată datele din literatură indică pentru subtipul hibrid de ameloblastoame solide o incidență de 4,5% [Waldron & El-Mofty, 1987].

Invazia osoasă a fost evidențiată de noi în 72,6% din totalul tumorile investigate, cel mai des în subvariantele foliculară (87,5% din cazuri) și respectiv în cea plexiformă (în toate cazurile investigate), îmbrăcând aspectul de invazie în front larg, cu subțierea și erodarea platourilor corticale maxilare. Datele din literatură indică ameloblastomul ca fiind o tumoră care crește lent și care determină expansiunea corticalei osoase, perforarea platourilor linguale și/sau bucale și infiltrarea țesuturilor moi adiacente, mai ales în localizarea posterioară a mandibulei [Laskin et al., 2002]. Studii radiologice au identificat erodarea corticalei osoase maxilare în peste 80% din cazuri, iar infiltrarea țesuturilor moi în 87% din cazuri, 37,5% din bolnavii fiind diagnosticați cu subtipul folicular de ameloblastom [Fregnani et al., 2010].

CAPITOLUL V- STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC AL AMELOBLASTOAMELOR.

MATERIALUL CERCETAT- a fost reprezentat de un număr de 20 de cazuri de ameloblastom reprezentative pentru cele 62 de cazuri investigate histopatologic. Vârsta medie a acestor bolnavi a fost de 41 de ani, au aparținut preponderent persoanelor de sex feminin (B:F=9:11) și s-au dezvoltat cel mai frecvent în regiunea posterioară a ramului mandibular (17 cazuri). Raportat la prezența invaziei osoase aceasta a fost prezentă în 11 cazuri și raportat la subtipul histopatologic 6 cazuri au fost de tip folicular, 2 cazuri de tip plexiform, 1 de tip acantomatos, 1 cu degenerescență chistică și 1 cu celule granulare.

METODE UTILIZATE

Studiul imunohistochimic a fost unul de tip cu detecție enzimatică folosind ca metodă de lucru tehnica MACH 4 MICRO-POLYMER-HRP (Biocare Medical; M4U534). Rezultatul acestor reacții imunohistochimice constă în vizualizarea antigenilor investigați cu ajutorul cromogenului DAB, prin colorarea lor în brun. În cazul evaluării procesului de tranziție epitelio-mezenchimală, respectiv a expresiei markerilor N-cadherină și factorului nuclear de transcripție Snail am utilizat reacții imunohistochimice duble.

În studiul imunohistochimic al celor 20 de cazuri de ameloblastom am utilizat anticorpi concentrați dezvoltati în șoarece sau iepure direcționați împotriva omului, ale căror principale caracteristici sunt redate în tabelul de mai jos:

Tabel V.2 Anticorpi utilizați în studiul imunohistochimic al ameloblastoamelor

Anticorp folosit	Clonă, Producător	Diluți e	Demascare antigenică	Control extern
CD10	Șoarece, Monoclonal, 56C6, Dako Cytomation	1:50	0.1 M citrat, pH 6	Limfoganglion
CXCR4	Iepure, Policlonal, Thermo scientific	1:500	0.1 M citrat, pH 6	Carcinom scuamos
EGFR	Iepure, Policlonal, Leica Biosystems	1:50	0.1 M citrat, pH 6	Carcinom scuamos
Podoplanină	Șoarece, Monoclonal D2-40, Dako	1:100	0.1 M citrat, pH 6	Limfoganglion
N cadherină	Șoarece, Monoclonal 6G11, Dako Cytomation	1:30	0.1 M citrat, pH 6	Carcinom pancreatic
Snail	Iepure, Policlonal, Abcam	1:50	0.1 M citrat, pH 6	Carcinom mamar
F Actină	Șoarece, Monoclonal, LifeSpan Biosciences	1:50	0.1 M citrat, pH 6	Prostată
WASL	Iepure, Policlonal, Sigma-Aldrich	1:75	0.1 M citrat, pH 6	Colon

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Investigând imunoreactivitatea pentru CD10 pe cazuistica noastră am consemnat cea mai mare imunoreactivitate la nivelul variantei cu celule granulare atât la nivel epitelial cât și stromal, pe ultimul loc situându-se varianta periferică. Pentru toate variantele investigate formele invazive au prezentat cele mai mari scoruri, epiteliul tumoral fiind mult mai reactiv comparativ cu stroma. Referitor la reactivitatea epiteliului tumoral, noi am consemnat prezența acesteia doar la nivelul citoplasmei celulelor reticulului stelat și nu și la nivelul celulelor periferice ameloblast-like. Maximum de reactivitate a fost observat de noi în ariile cu metaplazie scuamosă și respectiv la nivelul celulelor tumorale granulare, cu pattern membranar și citoplasmatic. O serie de autori au arătat imunopozitivitatea membranară și citoplasmatică pentru CD10 a celulelor neoplazice din ameloblastoame [Masloub et al., 2011], reactivitatea fiind mai mare la nivelul ariilor infiltrative de epiteliu odontogen [Iezzi et al., 2008]. Totodată s-a mai arătat că expresia lui CD10 a fost mai mare în diversele forme de ameloblastom multichistic comparativ cu ameloblastomul unichistic, fapt ce ar explica și comportamentul mult mai agresiv al ameloblastomului solid față de cel unichistic [Masloub et al., 2011]. Pe de altă parte

Iezzi și colab. au arătat că acele cazuri de ameloblastom solid ce au prezentat un risc crescut de recidivă s-au asociat o rată mai mare de expresie a lui CD10 în celulele stromale peritumorale [Iezzi et al., 2008]. Autorii au sugerat că expresia lui CD10 în celulele stromale ale ameloblastomului solid este asociată cu invazia tumorală locală din aceste cazuri și că această imunoreactivitate ar putea fi utilă în identificarea ariilor cu potențial agresiv local chiar și în ameloblastoamele considerate a fi cu risc scăzut.

CXCR4 a fost utilizat de noi în premieră pentru evaluarea agresivității diferentelor variante de ameloblastoame. Astfel, maximum de reactivitate a fost observat în formele acantomatos invaziv și unichistic luminal, la polul opus situându-se varianta foliculară tipică non-invazivă și cea cu celule granulare. Per ansamblu celulele reticulului stelat au fost mult mai reactive comparativ cu celulele periferice ameloblast-like, iar patternul de reacție a fost diferit, respectiv unul citoplasmatic pentru celulele reticulului stelat și membranar pentru celulele periferice. Totodată am consemnat o intensificare a reactivității mai ales către frontul de invazie. Strict legat de expresia acestui marker la nivelul țesuturilor dentare s-a demonstrat doar o slabă reactivitate în țesutul pulpar dentar normal și o expresie crescută în țesutul pulpar inflammat sugerându-se o posibilă recrutare a celulelor pulpare CXCR4- pozitive către locul inflamației [Jiang et al., 2008].

În studiul nostru maximum de reactivitate pentru EGFR a fost consemnat în varianta unichistică și periferică, urmate îndeaproape de varianta foliculară și cea plexiformă. Reactivitatea pentru EGFR, indiferent de subtipul histopatologic, a fost mai mare la periferia proliferărilor tumorale și în frontul de invazie, patternul predominant fiind unul citoplasmatic. Totodată celulele periferice ameloblast-like au fost mult mai reactive și cu un pattern preponderent membranar, în timp ce celulele reticulului stelat au fost mult mai puțin reactive ci cu un pattern preponderent citoplasmatic. Astfel, dacă Shrestha și colab. nu au găsit imunoreactivitate în nici unul din cele 23 de ameloblastoame solide examinate [Shrestha et al., 1992], în schimb, Vered și colab. [Vered et al., 2003], Abdel-Aziz și Amin [Abdel-Aziz & Amin, 2012] și respectiv Li și colab. [Li et al., 1993] au observat expresia sa în toate cazuri investigate. Maximum intensității pare să fie în formele foliculare și cele cu diferențiere scuamoasă, rândul periferic de celule neoplazice ameloblastic-like fiind mai reactiv comparativ cu celulele reticulului stelat, acest lucru fiind mai evident mai ales în cazurile cu invazie osoasă și extensie extraosoasă [Oikawa et al., 2013; Ueno et al., 1994].

În studiul nostru reactivitatea la podoplanină a fost maximă în cazurile de ameloblastom unichistic și plexiform invaziv, umate îndeaproape de cazurile de ameloblastom folicular invazive. cazul folicular cu celule granulare și respectiv cazul de ameloblastom periferic. Indiferent de subtip și invazivitate reactivitatea a fost prezentă îndeosebi la nivelul celulelor periferice ameloblast-like cu pattern preponderent membranar. O creștere a reactivității a fost semnalată mai ales la periferia proliferărilor tumorale și îndeosebi la fontul de invazie, această creștere fiind înregistrată mai ales la nivel citoplasmatic atât la nivelul celulelor periferice cât și a celor din reticulul stelat. O serie de studii au arătat că în tumorile odontogene benigne podoplanina a fost exprimată îndeosebi de către celulele de la periferia proliferărilor tumorale, celule presupuse a fi responsabile de invazia locală a acestor tumori [Caetano et al., 2013; Zustin et al., 2010; Friedrich et al., 2012; González-Alva et al., 2011; Tsuneki et al., 2012]. Strict la nivelul ameloblastoamelor foliculare, expresia citoplasmatică și membranară a podoplaninei a

fost observată îndeosebi la nivelul celulelor periferice columnare ale insulelor tumorale și de regulă celulele reticulii stelate din centrul insulelor nu au fost imunoreactive [Caetano et al., 2013; Tjioe et al., 2012; Siar et al., 2015]. Totodată maximum de reactivitate pentru podoplanină a fost observată în ariile de invazie și respectiv ariile tumorale cu cea mai înaltă activitate proliferativă [Ganvir et al., 2016].

Investigația noastră a scos în evidență un maxim de reactivitate pentru N-caderină la nivelul cazului de ameloblastom unichistic luminal și plexiform invaziv, urmată îndeaproape de varianta foliculară invazivă. Indiferent de subtipul histopatologic și de comportamentul local, maximum de reactivitate a fost identificat în celulele periferice ameloblast-like, cu pattern preponderent membranar. În frontul de invazie, reactivitatea a fost mult mai evidentă, patternul de reacție fiind unul chiar nuclear în celulele periferice și totodată reacția devine vizibilă și la nivelul celulelor reticulii stelate. În singurul studiu care a investigat expresia N-caderinei la nivelul ameloblastoamelor s-a raportat o rată de expresie a sa în 87,5% din cazuistica investigată, cu o localizare membranară a semnalului îndeosebi la nivelul celulelor columnare periferice ameloblast-like [Kusafuka et al., 2011]. Raportat la subtipuri, autorii au găsit că circa 61,9% din cazurile de ameloblastom folicular au fost reactive și respectiv că 61,5% din cazurile de ameloblastom plexiform au fost pozitive pentru acest marker.

În studiul nostru un maxim de reactivitate pentru Snail a fost consemnat în cazurile de ameloblastom folicular invaziv, urmate de cazul de ameloblastom unichistic și cel cu degenerescență chistică invaziv. Expresia acestui marker a fost mai evidentă în formele invazive indiferent de subtipul histopatologic, iar celulele periferice ameloblast-like au fost cele mai reactive cu pattern preponderent citoplasmatic și membranar. În frontul de invazie reactivitatea a fost prezentă și la nivelul celulelor reticulii stelate și în plus am mai consemnat și o colocalizare nucleară și/sau citoplasmatică a acestui marker cu N-caderina mai ales în formele foliculară, plexiformă și unichistică. Siar și Ng au demonstrat faptul că factorul Snail este exprimat în 94% din ameloblastoame, fiind cu mult mai bine exprimat în comparație cu ceilalți factori transcripționali implicați în EMT (Slug, SIP1 și Twist) [Siar & Ng, 2014]. Autorii nu au găsit diferențe semnificative privind expresia lui Snail în funcție de topografia tumorală (centru versus front de invazie) sau de patternul arhitectural (ameloblastom solid versus cel unichistic). Totuși imunoreactivitatea pentru acest marker s-a dovedit a fi mai mare la nivelul celulelor periferice ameloblast-like comparativ cu cele de la nivelul reticulii stelate.

În studiul nostru, cele mai imunoreactive pentru F-actină s-au dovedit a fi formele invazive de ameloblastom, respectiv variantele foliculară, acantomatoasă, cu celule granulare și unichistic, luminal. Indiferent de subtipul histopatologic, celulele periferice ameloblast-like au fost mult mai reactive cu pattern predominant citoplasmatic și membranar. În plus în formele invazive, la nivelul frontului de invazie reactivitatea a fost mult mai intensă, fiind observată în celulele periferice și la nivel nuclear. Oarecum similar imunoreactivității pentru F-actină, în studiul întreprins de noi, WASL a fost mult mai bine exprimat de formele invazive de ameloblastom, cu un maximum de reactivitate la nivelul ameloblastomului folicular cu celule granulare, ameloblastomului unichistic luminal și cazurilor de ameloblastom folicular și plexiform invazive. Reactivitatea acestora a fost cu mult mai mare la frontul de invazie. În plus, atât pentru WASL cât și pentru F-actină, în formele invazive, mai ales la frontul de invazie am mai remarcat o reactivitate intensă din partea fibroblaștilor stromali. Siar și colab. au examinat expresia

proteinelor invadopodice (cortactin, N-WASP, WIP) și F-actinei în 87 de ameloblastoame, dovedind supraexpresia acestora (cortactin în 83,9%; N-WASP în 67,8%; WIP în 88,5% și F-actin în 100% din cazurile investigate) [Siar et al., 2016]. Cortactinul a fost mai intens exprimat în epitelul tumoral decât în stromă, în timp ce WIP și F-actina au fost prezente îndeosebi la frontul de invazie. Autorii au concluzionat că cel puțin în parte procesul de invazivitate locală a ameloblastoamelor este dependent de distribuția intracelulară a proteinelor invadopodice în corelație cu dinamica citoscheletală a filamentele F-actinice [Siar et al., 2016].

CAPITOLUL V- CONCLUZII FINALE.

- În intervalul de timp 2008-2015, ameloblastomul a reprezentat circa 26,5% din totalul tumorilor odontogene operate, fiind alături de odontom una din cele mai frecvente neoplazii odontogene ale cazusiticii noastre.

- Analiza distribuției pe sexe a indicat o ușoară prevalență a cazuisticii la sexul feminin, cu raport pe sexe de 1,1 în favoarea acestuia, fără să existe diferențe semnificative statistice în raport cu subtipul histopatologic. Repartiția cazuisticii pe grupe de vârstă a arătat o plajă largă a vârstelor, acest tip de tumoră odontogenă dezvoltându-se între decada a II-a și a IX-a de viață. Analiza topografiei lezionale a indicat localizarea de predilecție a ameloblastoamelor la nivelul regiunii premolare/molare a mandibulei (55%) drepte.

- Studiul histopatologic a consemnat prevalența formelor solide de ameloblastom cu un procent de 90,5%, la polul opus situându-se ameloblastoamele periferice cu un procent de 3.15%. În cadrul ameloblastoamelor solide de departe cele mai frecvente au fost cele foliculare (74,2%), iar pe locul doi s-a situat varianta plexiformă (74,2%).

- Cea mai rară variantă diagnosticată de noi a fost cea de ameloblastom periferic, respectiv 2 cazuri (3,22%), în timp ce varianta de ameloblastom unichistică a fost diagnosticată în 6,45% din cazuri. În 23,5% din cazuistica investigată am consemnat asocierea mai multor patternuri de creștere, cel mai frecvent fiind vorba de asocierii de pattern folicular cu pattern plexiform și trabecular.

- Invazia osoasă a fost evidențiată de noi în 72,6% din cazurile investigate, cel mai frecvent în subtipul solid folicular (87,5%) și respectiv în cel solid plexiform (100%), îmbrăcând aspectul de "pushing border", cu subțierea și erodarea platourilor corticale maxilare;

- În procesul de invazivitate locală a ameloblastomului par să fie implicați mai ales markerii pentru: microfilamentele F-actine, proteina WASL (reglatoare a reorganizării citoscheletului actinic), factorul transcripțional Snail (implicat în reglarea procesului de tranziție epitelio-mezenchimală), sialomucina transmembranară podoplanina (ce controlează mobilitatea celulară) și factorul de creștere EGFR implicat în progresia și creșterea locală tumorală). Pentru toți acești biomarkeri, indiferent de subtipul histopatologic s-au obținut cele mai mari scoruri de imunoreactivitate;

- În urma investigațiilor imunohistochimice se poate concluziona că la baza agresivității locale a ameloblastoamelor au stat pe de o parte un proces activ de tranziție epitelio-mezenchimală (dovedit prin implicarea factorului de transcripție Snail, a podoplaninei și a proteinei invadopodice WASL ce coordonează rearanjarea intracelulară a filamentelor F-actinice) și pe de altă parte supraexpresia factorului de creștere EGFR (implicat în progresia și creșterea locală tumorală);

▪ Cele mai agresive variante histopatologice de ameloblastom, potrivit scorurilor de imunoreactivitate obținute par să fie varianta unichistică și respectiv cea polichistică cu subtipurile foliculară tipică și plexiformă. Un comportament intermediar pare să aibă varianta acantomatoasă și respectiv cea cu celule granulare, iar cele mai puțin agresive par să fie ameloblastomul periferic și varianta de ameloblastom cu degenerescență chistică;

▪ Compartimentul tumoral cel mai agresiv, indiferent de varianta histopatologică pare să fie cel al celulelor periferice ameloblast-like, la periferia proliferărilor tumorale și mai ales în frontul de invazie;

▪ În procesul de invazivitate locală a ameloblastoamelor intervine și stroma adiacentă proliferărilor tumorale fapt dovedit de existența imunoreactivității la acest nivel pentru markeri de tipul: CD10, F-actină și WASL;

▪ Acest studiu scoate în evidență implicarea certă a unora din biomarkerii investigați în comportamentul agresiv local (Snail, podoplanina, EGFR și CXCR4), sublinind valoarea prognostică a acestora dar și utilitatea lor terapeutică, ei putând constitui ținte moleculare eficiente în terapia acestor tumori odontogene.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:

1. Dias CD, Brandão TB, Soares FA, Lourenço SV. Ameloblastomas: clinical-histopathological evaluation of 85 cases with emphasis on squamous metaplasia and keratinization aspects. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(6):1651-5.

2. Dhanuthai K, Chantarangsu S, Rojanawatsirivej S, Phattarataratip E, Darling M, Jackson-Boeters L, Said-Al-Naief N, Shin HI, An CH, Hong NT, An PH, Thosaporn W, Lam-ubol A, Subarnbhesaj A. Ameloblastoma: a multicentric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;113(6):782-8.

3. Filizzola AI, Bartholomeu-dos-Santos TC, Pires FR. Ameloblastomas: clinicopathological features from 70 cases diagnosed in a single oral pathology service in an 8-year period. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014;19(6):e556-61.

4. Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995;31B(2):86-99.

5. Fulco GM, Nonaka CF, Souza LB, Miguel MC, Pinto LP. Solid ameloblastomas - Retrospective clinical and histopathologic study of 54 cases. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76(2):172-7.

6. Ord RA, Blanchaert RH Jr, Nikitakis NG, Sauk JJ. Ameloblastoma in children. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(7):762-70; discussion, 770-1.

7. Gardner DG, Heikinheimo K, Shear M, Philipsen HP, Coleman H. Ameloblastomas. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours.* Lyon: IARC Press; 2005. p.296-300.

8. Adeline VL, Dimba EA, Wakoli KA, Njiru AK, Awange DO, Onyango JF, Chindia ML. Clinicopathologic features of ameloblastoma in Kenya: a 10-year audit. *J Craniofac Surg.* 2008;19(6):1589-93.

9. Ledesma-Montes C, Mosqueda-Taylor A, Carlos-Bregni R, de León ER, Palma-Guzmán JM, Páez-Valencia C, Meneses-García A. Ameloblastomas: a regional Latin-American multicentric study. *Oral Dis.* 2007;13(3):303-7.

10. Waldron CA, el-Mofty SK. A histopathologic study of 116 ameloblastomas with special reference to the desmoplastic variant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987;63(4):441-51.

11. Laskin DM, Giglio JA, Ferrer-Nuin LF. Multilocular lesion in the body of the mandible. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002;60(9):1045-8.

12. Fregnani ER, da Cruz Perez DE, de Almeida OP, Kowalski LP, Soares FA, de Abreu Alves F. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39(2):145-9.

13. Masloub SM, Abdel-Azim AM, Elhamid ES. CD10 and osteopontin expression in dentigerous cyst and ameloblastoma. *Diagn Pathol.* 2011;6:44.
14. Iezzi G, Piattelli A, Rubini C, Artese L, Goteri G, Fioroni M, Carinci F. CD10 expression in stromal cells of ameloblastoma variants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(2):206-9.
15. Jiang HW, Ling JQ, Gong QM. The expression of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) in inflamed human dental pulp. *J Endod.* 2008;34(11):1351-4.
16. Shrestha P, Yamada K, Higashiyama H, Takagi H, Mori M. Epidermal growth factor receptor in odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med.* 1992;21(7):314-7.
17. Vered M, Peleg O, Taicher S, Buchner A. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(7):597-604.
18. Abdel-Aziz A, Amin MM. EGFR, CD10 and proliferation marker Ki67 expression in ameloblastoma: possible role in local recurrence. *Diagn Pathol.* 2012;7:14.
19. Li TJ, Browne RM, Matthews JB. Expression of epidermal growth factor receptors by odontogenic jaw cysts. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(2):137-44.
20. Oikawa M, Miki Y, Shimizu Y, Kumamoto H. Assessment of protein expression and gene status of human epidermal growth factor receptor (HER) family molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2013;42(5):424-34.
21. Ueno S, Miyagawa T, Kaji R, Mushimoto K, Shirasu R. Immunohistochemical investigation of epidermal growth factor receptor expression in ameloblastomas. *J Pathol.* 1994;173(1):33-8.
22. Caetano Ados S, Tjioe KC, Faustino SE, Hanemann JA, Belone Ade F, Soares CT, Oliveira DT. Immunolocalization of podoplanin in benign odontogenic tumours with and without ectomesenchyme. *Arch Oral Biol.* 2013;58(4):408-15.
23. Zustin J, Scheuer HA, Friedrich RE. Podoplanin expression in human tooth germ tissues and cystic odontogenic lesions: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(1):115-20.
24. Friedrich RE, Scheuer HA, Zustin J. Expression of podoplanin in nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated keratocystic odontogenic tumours. *Anticancer Res.* 2012;32(5):2125-7.
25. González-Alva P, Inoue H, Miyazaki Y, Tsuchiya H, Noguchi Y, Kikuchi K, Ide F, Ishihara S, Katayama T, Sakashita H, Kusama K. Podoplanin expression in odontomas: clinicopathological study and immunohistochemical analysis of 86 cases. *J Oral Sci.* 2011;53(1):67-75.
26. Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Cheng J, Saku T. Podoplanin expression profiles characteristic of odontogenic tumor-specific tissue architectures. *Pathol Res Pract.* 2012;208(3):140-6.
27. Tjioe KC, Oliveira DT, Soares CT, Lauris JR, Damante JH. Is podoplanin expression associated with the proliferative activity of ameloblastomas? *Oral Dis.* 2012;18(7):673-9.
28. Siar CH, Ishak I, Ng KH. Podoplanin, E-cadherin, β -catenin, and CD44v6 in recurrent ameloblastoma: their distribution patterns and relevance. *J Oral Pathol Med.* 2015;44(1):51-8.
29. Ganvir SM, Khobragade PG, Bamane SA, Kumavat R, Dalmia A. Role of podoplanin expression in deciding the invasive potential of ameloblastoma - A retrospective IHC study. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2016;6(3):187-193.
30. Kusafuka K, Hirobe K, Wato M, Tanaka A, Nakajima T. CD56 expression is associated with neuroectodermal differentiation in ameloblastomas: an immunohistochemical evaluation in comparison with odontogenic cystic lesions. *Med Mol Morphol.* 2011;44(2):79-85.
31. Siar CH, Ng KH. Differential expression of transcription factors Snail, Slug, SIP1, and Twist in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(1):45-52.
32. Siar CH, Rahman ZA, Tsujigiwa H, Mohamed Om Ablazi K, Nagatsuka H, Ng KH. Invadopodia proteins, cortactin, N-WASP and WIP differentially promote local invasiveness in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(8):591-8.