

**ESTUDO MORFOLÓGICO E  
IMUNOISTOQUÍMICO DAS ANOMALIAS  
VASCULARES DA INFÂNCIA**

**HELOISA GALVÃO DO AMARAL CAMPOS**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para a obtenção do título de Doutora  
em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto  
Soares**

**São Paulo**

**2005**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa  
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Campos, Heloisa Galvão do Amaral  
**Estudo morfológico e imunoistoquímico das anomalias vasculares da infância.** / Heloisa Galvão do Amaral Campos -- São Paulo, 2005.  
126p.  
Tese(doutorado)-Fundação Antônio Prudente.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.  
Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. HEMANGIOMA/patologia. 2. APOPTOSE. 3. CRIANÇA.  
4. ANGIOGENESE PATOLOGICA. 5. IMUNOHISTOQUÍMICA.

Aos meus pais, **Sônia e Paulo**, exemplos de dedicação à família.

Ao **Tito**, companheiro de todas as horas, cujo amor e incentivo foram fundamentais, sempre, e mais ainda durante a execução deste projeto.

Ao **André**, meu filho querido, pela tranquilidade com que acompanhou a minha dedicação ao trabalho. Por sua brilhante trajetória pessoal e profissional.

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer, meu orientador, por me proporcionar a oportunidade de desenvolver este trabalho, pelos conselhos e ensinamentos, pelo exemplo de atitude decisiva e obstinada, pertinente aos grandes pesquisadores.

Ao **Dr. José Hermílio Curado**, Diretor do Departamento de Cirurgia Plástica Reparadora, principal incentivador da minha carreira, pelos ensinamentos e pelo exemplo profissional.

Ao **Dr. Alóis Bianchi**, exemplo de dedicação profissional, pelo carinho e incentivo.

Aos titulares e amigos do Departamento de Cirurgia Plástica Reparadora do Hospital do Câncer, **Dr. Alexandre Katalinic Dutra**, **Dr. Maurício Castello Domingues** e **Dr. Eduardo Koiti Yoshimatsu**, pela dedicação no atendimento aos pacientes durante o meu afastamento para a realização deste trabalho. À nossa secretária **Adriana de Fátima Galvão**, pela presteza e entusiasmo na execução das atividades diárias do departamento.

À **Dra. Isabela Werneck da Cunha**, pelo entusiasmo e dedicação na revisão morfológica e na avaliação da expressão dos marcadores imunoistoquímicos, pela amizade e pelo incentivo.

Aos membros da banca de defesa, **Dra. Eliana Maria Monteiro Caran, Dra. Glaucia Noeli Maroso Hajj, Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini e Dra. Mariângela Esther Alencar Marques**, pelos valiosos comentários e sugestões que permitiram a finalização deste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, **Dra. Beatriz de Camargo, Dr. José Vassalo, Dr. Rafael Linden e Dr. Roger Chammass**, pelas críticas e sugestões emitidas durante a elaboração deste projeto.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica, **Severino da Silva Ferreira e Carlos Nascimento Pereira**, pelo preparo das lâminas, **Suely Nogogaki e José Ivanildo Neves**, pela realização das reações imunoistoquímicas, aos funcionários do arquivo, e a todos cujo empenho e dedicação foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

À **Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria do Rosário Dias de Oliveira Latorre**, pela instrução e orientação da análise estatística, e à **Sr<sup>a</sup>. Maria Helena Amaral Muniz de Carvalho**, pela revisão do texto.

À **Suely Francisco Neves Epifânio**, bibliotecária do Hospital do Câncer, pela confecção da ficha catalográfica, pela revisão da formatação do texto e das referências bibliográficas. Aos demais funcionários da biblioteca pelo auxílio no levantamento bibliográfico.

À **Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari** e **Márcia Miwa Hiratani**, da pós-graduação, pelo competente trabalho, pela amizade e incentivo.

À **Sr<sup>a</sup>. Hirde Contensini** e demais funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital do Câncer, pela atenciosa colaboração durante a revisão dos prontuários.

À **Srt<sup>a</sup>. Theresa Alberto do Nascimento**, do Serviço de Desenho e Fotografia do Hospital do Câncer, pela atenção e cuidado com a documentação e com o arquivo fotográfico.

Finalmente, o meu mais profundo agradecimento ao **Hospital do Câncer**, aos pacientes e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração e realização deste projeto.

## RESUMO

Campos HGA. **Estudo morfológico e imunoistoquímico das anomalias vasculares da infância**. São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado – Fundação Antônio Prudente.

Os hemangiomas e linfangiomas são anomalias vasculares (AV) com significativa diversidade clínica: algumas lesões são transitórias, outras, permanentes. Na classificação clínica, as AV transitórias são os hemangiomas fragiformes e tuberosos; as permanentes são os hemangiomas planos, cavernosos e os linfangiomas. A classificação biológica divide as anomalias vasculares em dois grupos: os hemangiomas proliferativos (HP) e as máis-formações vasculares (MF). O padrão morfológico nem sempre identifica o tipo de AV e, recentemente, o marcador GLUT1 (*erythrocyte-type glucose transporter protein*) foi relatado como positivo em todas as fases de evolução dos HP e negativo nas MF. O diagnóstico do tipo de lesão é um fator determinante para a escolha da modalidade terapêutica. Os HP respondem ao tratamento sistêmico (corticóide e/ou interferon alfa), recomendado para os casos complicados. A resposta ao tratamento é avaliada com parâmetros clínicos, dificultando a análise de protocolos terapêuticos e a comparação de resultados. O presente trabalho estudou, retrospectivamente, as características morfológicas e imunoistoquímicas de 262 casos operados no Hospital do Câncer, no período de 1988 a 2004, com diagnósticos de HP (126) e MF (136), revisando a morfologia e usando marcadores imunoistoquímicos. Houve correlação entre os marcadores GLUT1 e Ki-67 ( $p < 0,001$ ). Os HP foram positivos para GLUT1 em 80,6%, enquanto as MF foram negativas em 99,3% ( $p < 0,001$ ). Houve divergências entre o diagnóstico clínico, a revisão morfológica e a resposta ao GLUT1, quando este último foi fundamental para definição do diagnóstico. Os HP apresentaram positividade média para Ki-67 (marcador de proliferação) de 3,6%, enquanto as MF, 1,94% ( $p < 0,001$ ). Foram analisados 118 casos de HP utilizando marcadores angiogênicos e de apoptose. Os marcadores angiogênicos VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e NOS3 (*endothelial nitric oxide synthase*) e os marcadores de apoptose, o inibidor Bcl-X e os pró-apoptose Bax, Bak, FAS, FAS-L foram positivos na quase totalidade dos casos, enquanto p53 e caspase-3, em parte dos casos, 39,0% e 17,0%, respectivamente. Não houve positividade para Bcl-2, fator inibidor da apoptose. Não houve correlação entre a imunorreatividade para estes marcadores e o tratamento sistêmico prévio. A apoptose foi analisada em 36 casos de HP, pela técnica de TUNEL. A porcentagem média de células em apoptose foi de 21,5% para os 22 pacientes não tratados e 57,7% para os 14 tratados com corticóide e/ou interferon alfa,  $p(\text{Mann-Whitney})=0,004$ . O marcador GLUT1 foi fidedigno para o diagnóstico dos HP. Confirmou-se a participação de moléculas pró-apoptose na patogênese destas lesões e a efetividade do tratamento sistêmico prévio em determinar um aumento na porcentagem de células em apoptose.

## SUMMARY

Campos HGA. **Morphological and immunohistochemical study of vascular anomalies of infancy and childhood.** São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado – Fundação Antônio Prudente.

Hemangiomas and lymphangiomas are vascular anomalies (VA) that present with a large clinical diversity. Some of them are transitory, whereas others are permanent. Clinically, transitory VA are classified as fragiform and tuberous hemangiomas, and permanent VA are flat and cavernous hemangiomas and lymphangiomas. According to their biological classification, VA are divided into two groups: proliferative hemangiomas (PH) as transitory lesions and vascular malformation (VM) as permanent lesions. Morphologically, it is not always possible to identify the type of VA. Recently, the GLUT1 (*erythrocyte-type glucose transporter protein*) marker has been found positive in the majority of lesion phases in PH and negative in VM. Treatment of AV depends on several factors but the diagnosis of the type of lesion is determinant to decide on the best therapeutic modality. PH are sensitive to systemic treatment (steroids and/or alpha interferon), which is recommended for complicated cases that present with characteristics that impair body functions and threaten patients' life. Systemic treatment response cannot be clinically measured, which makes it difficult analyze protocols and compare results. We retrospectively analyzed morphological and immunohistochemical characteristics of 262 patients diagnosed with PH (n = 126) and VM (n = 136) who underwent surgery at Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, Brazil, from 1988 to 2004. There was correlation between GLUT1 and Ki-67 markers ( $p < 0.001$ ). PH were positive for GLUT1 in 80.6%, whereas VM were negative in 99.3% ( $p < 0.001$ ). Divergence was found among clinical diagnosis, morphology, and GLUT1 response, which was crucial in order to define diagnosis. PH presented with 3.6% of mean positivity rate for Ki-67 (proliferation marker) and 1.94% for VM ( $p < 0.001$ ). In 118 cases of PH we could analyze the immunoreactivity for angiogenesis and apoptosis markers. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) and NOS3 (*endothelial nitric oxide synthase*) angiogenic markers, as well as apoptosis inhibitor Bcl-X and pro-apoptosis Bax, Bak, FAS, FAS-L were positive in almost all cases, whereas pro-apoptosis p53 and caspase-3 were partially positive (39% and 17%, respectively). There was no positivity for apoptosis inhibitor apBcl-2. There was no correlation between immunoreactivity to such markers and previous systemic treatment. Apoptosis was analyzed in 36 cases of PH using the TUNEL technique. Mean percentage of cells in apoptosis was 21.5% for 22 non-treated cases and 57.7% for 14 others previously treated with steroids and/or alpha interferon,  $p(\text{Mann-Whitney}) = 0.004$ . GLUT1 marker was found reliable to diagnose

proliferative hemangiomas. Proapoptosis molecules were confirmed to have participation in the pathogenesis of such lesions. We conclude that treatment may induce early regression of the PH.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Hemangioma Plano .....	5
<b>Figura 2</b>	Hemangioma Fragiforme .....	5
<b>Figura 3</b>	Hemangioma Tuberoso .....	5
<b>Figura 4</b>	Hemangioma Cavernososo .....	5
<b>Figura 5</b>	Linfangioma .....	5
<b>Figura 6</b>	Tufted Hemangioma .....	5
<b>Figura 7</b>	Fotomicrografia de preparação histológica de Má-formação Vascular corada pela hematoxilina-eosina (H.E. 400x) .....	34
<b>Figura 8</b>	Fotomicrografia de preparação histológica de Hemangioma Proliferativo corada pela hematoxilina-eosina (H.E. 400x) .....	34
<b>Figura 9</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para GLUT1 (aumento original, 400x) .....	41
<b>Figura 10</b>	Má-formação Vascular. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica para GLUT1 (aumento original, 400x) .....	41
<b>Figura 11</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para VEGF (aumento original, 400x) .....	42
<b>Figura 12</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para NOS3 (aumento original, 400x) .....	42
<b>Figura 13</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para p53 (aumento original, 400x) .....	43
<b>Figura 14</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica para p53 (aumento original, 400x) .....	43

<b>Figura 15</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica para Bcl-2 (aumento original, 400x) .....	44
<b>Figura 16</b>	Hemangioma Proliferativo..Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para Bcl-X (aumento original, 400x) .....	44
<b>Figura 17</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para Bax (aumento original, 400x) .....	45
<b>Figura 18</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para Bak (aumento original, 400x) .....	45
<b>Figura 19</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para FAS (aumento original, 400x) .....	46
<b>Figura 20</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para FAS-L (aumento original, 400x) .....	46
<b>Figura 21</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para caspase-3 (aumento original, 400x) .....	47
<b>Figura 22</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica para caspase-3 (aumento original, 400x) .....	47
<b>Figura 23</b>	Má-formação Vascular. Fotomicrografia mostrando resultado da reação imunoistoquímica para Ki-67 (aumento original, 400x). A. Reação negativa. B. Contagem das células negativas .....	48
<b>Figura 24</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado da reação imunoistoquímica para Ki-67 (aumento original, 400x). A. Reação com positividade. B. Contagem das células positivas e negativas .....	49

<b>Figura 25</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica de TUNEL (aumento original, 400x) .....	50
<b>Figura 26</b>	Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado com alta positividade da reação imunoistoquímica de TUNEL (aumento original, 400x) .....	50
<b>Figura 27</b>	Porcentagem de pacientes com hemangioma proliferativo, segundo GLUT1, por faixa etária .....	63
<b>Figura 28</b>	Porcentagem de pacientes com hemangioma proliferativo segundo a faixa de porcentagem de positividade para Ki-67, por faixa etária .....	64
<b>Figura 29</b>	Porcentagem de pacientes segundo VEGF, por faixa etária ....	68
<b>Figura 30</b>	Porcentagem de pacientes segundo NOS3, por faixa etária ....	70
<b>Figura 31</b>	Número de pacientes segundo p53, por faixa etária .....	71
<b>Figura 32</b>	Número de pacientes segundo Bcl-2, por faixa etária .....	72
<b>Figura 33</b>	Número de pacientes segundo Bcl-X, por faixa etária .....	74
<b>Figura 34</b>	Número de pacientes segundo Bax, por faixa etária .....	75
<b>Figura 35</b>	Número de pacientes segundo Bak, por faixa etária .....	76
<b>Figura 36</b>	Número de pacientes segundo caspase-3, por faixa etária .....	79
<b>Figura 37</b>	Médias de porcentagem de apoptose e respectivos intervalos de 95% de confiança .....	84

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Classificação Clínica das Anomalias Vasculares .....	3
<b>Quadro 2</b>	Classificação Biológica Modificada .....	9
<b>Quadro 3</b>	CrITÉrios para a revisão da morfologia das anomalias vasculares .....	33
<b>Quadro 4</b>	Anticorpos, clones e origem .....	35
<b>Quadro 5</b>	Gradao da reao de acordo com a intensidade .....	39
<b>Quadro 6</b>	Gradao da reao de acordo com o número de células coradas .....	39
<b>Tabela 1</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo as classificaes clínica e biológica .....	56
<b>Tabela 2</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo características demográficas .....	57
<b>Tabela 3</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo características clínicas .....	58
<b>Tabela 4</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a revisão da morfologia das anomalias vasculares .....	59
<b>Tabela 5</b>	Resultado do marcador GLUT1 .....	60
<b>Tabela 6</b>	Associao entre os marcadores GLUT1 e Ki-67 .....	60
<b>Tabela 7</b>	Associao entre tipo de anomalia vascular e o marcador GLUT1 .....	61
<b>Tabela 8</b>	Associao entre Ki-67 e tipo de anomalia vascular .....	62
<b>Tabela 9</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo a classificao clínica, padrão morfológico e o marcador GLUT1 .....	65
<b>Tabela 10</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo características demográficas .....	67
<b>Tabela 11</b>	Número e porcentagem de pacientes segundo VEGF .....	68

<b>Tabela 12</b>	Número e percentagem de pacientes segundo NOS3 .....	69
<b>Tabela 13</b>	Número e percentagem de pacientes segundo p53 .....	70
<b>Tabela 14</b>	Número e percentagem de pacientes segundo Bcl-2 .....	72
<b>Tabela 15</b>	Número e percentagem de pacientes segundo Bcl-X .....	73
<b>Tabela 16</b>	Número e percentagem de pacientes segundo Bax .....	74
<b>Tabela 17</b>	Número e percentagem de pacientes segundo Bak .....	76
<b>Tabela 18</b>	Número e percentagem de pacientes segundo FAS .....	77
<b>Tabela 19</b>	Número e percentagem de pacientes segundo FAS-L .....	77
<b>Tabela 20</b>	Número e percentagem de pacientes segundo caspase 3 .....	78
<b>Tabela 21</b>	Associação entre tratamento prévio e os marcadores VEGF, NOS3, p53, Bcl-2, Bcl-X e Bax .....	80
<b>Tabela 22</b>	Associação entre tratamento prévio e os marcadores Bak, FAS, FAS-L e Caspase 3 .....	81
<b>Tabela 23</b>	Número e percentagem de pacientes segundo características demográficas .....	83

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Classificação Clínica .....	3
1.2	Classificação Biológica .....	6
1.2.1	Classificação Biológica Modificada .....	8
1.3	Tratamento sistêmico com corticóide e interferon alfa .....	11
1.4	Marcadores GLUT1 e Ki-67 .....	12
1.4.1	GLUT1 .....	13
1.4.2	Ki-67 .....	14
1.5	Marcadores de angiogênese e de apoptose .....	16
1.5.1	VEGF .....	18
1.5.2	NOS3 .....	20
1.5.3	p53 .....	21
1.5.4	Família das proteínas Bcl-2 .....	23
1.5.5	Família receptor de morte .....	24
1.5.6	Caspases .....	25
1.6	TUNEL .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODO</b> .....	<b>29</b>
3.1	Casuística .....	29
3.1.1	Critérios de elegibilidade para o estudo .....	29
3.1.2	Critérios de exclusão do estudo .....	29
3.1.3	Descrição da casuística .....	29
3.1.4	Estudo da imunorreatividade das proteínas ligadas a angiogênese e apoptose nos hemangiomas proliferativos .....	30
3.1.5	Estudo da apoptose nos hemangiomas proliferativos, com a técnica de TUNEL .....	30
3.2	Método .....	30
3.2.1	Revisão da Morfologia .....	32
3.2.2	Estudo imunoistoquímico .....	35
3.2.3	TUNEL .....	36

3.2.4	Mensuração da reação imunoistoquímica .....	38
3.2.4.1	GLUT1 e marcadores de angiogênese e apoptose celular .....	38
3.2.4.2	Ki-67 .....	39
3.2.4.3	TUNEL .....	40
3.3	Variáveis do estudo .....	51
3.3.1	Classificação Clínica .....	52
3.3.2	Classificação Biológica .....	52
3.3.3	Tratamento sistêmico .....	53
3.3.4	Reação imunoistoquímica .....	53
3.4	Análise estatística .....	54
3.4.1	Análise descritiva .....	55
3.4.2	Análise da associação das freqüências entre as variáveis .....	55
3.4.3	Comparação das médias .....	55
3.5	Questões éticas .....	55
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
4.1	Características demográficas e clínicas .....	56
4.2	Revisão da morfologia .....	59
4.3	Estudo com os marcadores GLUT1 e Ki-67 e análise da associação entre o tipo de anomalia vascular e o padrão morfológico .....	59
4.3.1	Associação dos marcadores GLUT1 e Ki-67 e o tipo de anomalia vascular .....	61
4.3.2	Estudo com os marcadores GLUT1 e Ki-67 nos hemangiomas proliferativos .....	62
4.3.3	Associação entre tipo de anomalia vascular , padrão morfológico e GLUT1 .....	64
4.4	Estudo com os marcadores de angiogênese e de apoptose nos hemangiomas proliferativos .....	66
4.4.1	Características demográficas e clínicas .....	66
4.4.2	Estudo com os marcadores de angiogênese e de apoptose nos hemangiomas proliferativos .....	67
4.4.2.1	VEGF .....	67
4.4.2.2	NOS3 .....	69
4.4.2.3	p53 .....	70
4.4.2.4	Bcl-2 .....	71

4.4.2.5	Bcl-X .....	73
4.4.2.6	Bax .....	74
4.4.2.7	Bak .....	75
4.4.2.8	FAS .....	77
4.4.2.9	FAS-L .....	77
4.4.2.10	Caspase-3 .....	78
4.4.3	Associação entre os marcadores de angiogênese e de apoptose e tratamento sistêmico prévio nos hemangiomas proliferativos .....	79
4.5	Estudo da apoptose, com a técnica de TUNEL, nos hemangiomas proliferativos .....	82
4.5.1	Características demográficas e clínicas .....	82
4.5.2	Estudo da apoptose, com a técnica de TUNEL .....	83
4.5.3	Associação da apoptose, técnica de TUNEL, e tratamento sistêmico prévio nos hemangiomas proliferativos .....	83
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>85</b>
5.1	Revisão morfológica, GLUT1 e Ki-67 .....	88
5.2	Marcadores de angiogênese e de apoptose .....	93
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO I</b> .....	<b>118</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

As anomalias vasculares, conhecidas genericamente como hemangiomas e linfangiomas, são freqüentes na prática clínica, ocorrendo em cerca de 23% dos prematuros com peso de nascimento abaixo de 1000gr, em 1% dos neonatos e em 12% das crianças com 1 ano de idade (HOLMDAHL 1955; PRATT 1967; AMIR et al. 1986).

A diversidade clínica das anomalias vasculares e a variedade de classificações encontradas na literatura provocaram um atraso na compreensão destas lesões e no estudo da eficácia das diferentes modalidades terapêuticas. No Brasil, as anomalias vasculares sangüíneas são denominadas hemangiomas, enquanto as linfáticas são denominadas linfangiomas, de acordo com a classificação clínica (CURADO 1992).

Em geral, as anomalias vasculares são assintomáticas, algumas estão sujeitas à regressão espontânea, enquanto outras progridem lentamente ao longo da vida (BOWERS et al. 1960). O desconhecimento da natureza benigna e a diversidade de comportamento destas lesões fizeram com que, no passado, terapias agressivas fossem empregadas; a radioterapia e a cirurgia radical foram recursos indicados, indiscriminadamente, para impedir a progressão de lesões, ainda que promovessem danos e deixassem seqüelas residuais. Foi a partir de 1938, com a publicação de LISTER, reconhecendo a regressão de um determinado tipo de anomalia vascular, que a conduta conservadora passou a ser considerada. Apenas 15% das anomalias vasculares evoluem de forma

alarmante, com complicações que comprometem funções e ameaçam a vida do paciente, exigindo intervenção terapêutica (ENJOLRAS et al. 1990).

Na busca de esclarecer as diferenças biológicas entre as anomalias vasculares, MULLIKEN e GLOWACKI, em 1982, propuseram a classificação biológica, ressaltando a existência de dois grandes grupos de lesões com características biológicas distintas: os **hemangiomas** e as **más-formações vasculares**.

Durante décadas, o diagnóstico e o prognóstico das anomalias vasculares eram estabelecidos apenas com os dados clínicos. Em 2000, NORTH et al. publicaram os resultados de um estudo revelando a descoberta de um marcador biológico, uma proteína transportadora de glicose - GLUT1 (*erythrocyte-type glucose transporter protein*), positiva durante todas as fases de evolução dos hemangiomas e negativa nas más-formações vasculares.

Diante deste recurso para auxiliar no diagnóstico das anomalias vasculares, pretendemos com este estudo reavaliar os pacientes portadores de tais anomalias, operados no Hospital do Câncer, com o objetivo de rever o diagnóstico inicial estabelecido clinicamente, por meio da revisão morfológica e do estudo imunoistoquímico com os marcadores GLUT1 e Ki-67.

Os avanços na área da biologia molecular vieram adicionar marcadores e proporcionar técnicas para auxiliar na pesquisa sobre as anomalias vasculares. Na segunda etapa deste projeto prosseguimos o

estudo imunoistoquímico dos casos identificados clinicamente como hemangiomas proliferativos, analisando a imunorreatividade para marcadores de angiogênese e de apoptose celular.

## 1.1 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA

A classificação clínica divide as anomalias vasculares em hemangiomas, anomalias vasculares sangüneas, e linfangiomas, anomalias vasculares linfáticas (Quadro 1) (CURADO 1992).

<b>Hemangiomas</b>	Planos	
	Tumorais	Fragiformes
		Tuberosos
		Cavernosos
<b>Linfangiomas</b>		
<b>Síndromes Hemangiomatosas</b>		

**Quadro 1** - Classificação Clínica das Anomalias Vasculares.

Os hemangiomas são divididos em planos e tumorais, sendo estes últimos subdivididos em fragiformes, tuberosos e cavernosos. Os linfangiomas são divididos em microcísticos e macrocísticos.

Os hemangiomas planos são más-formações venocapilares cutâneas (Figura 1). Ao nascimento, são manchas vinhosas planas que, a partir da

segunda década de vida, formam nodulações e provocam hipertrofia das estruturas comprometidas.

Os hemangiomas fragiformes e os tuberosos são lesões tumorais que se desenvolvem nas primeiras semanas de vida, por proliferação celular (Figuras 2 e 3). Após a fase proliferativa, segue-se a fase de regressão espontânea, que se prolonga por um período variável de um ano até uma década.

Os hemangiomas fragiformes e tuberosos sofrem regressão e, em geral, são apenas observados até completarem a resolução espontânea. Porém, durante a fase proliferativa, podem manifestar características alarmantes, como ferimentos ou obstruções aerodigestivas que requerem intervenção terapêutica com drogas.

Os hemangiomas cavernosos são má-formações venosas, eventualmente com componente arterial associado (Figura 4). Estão presentes ao nascimento e progridem ao longo da vida.

Os linfangiomas são anomalias vasculares linfáticas, decorrentes da má-formação da rede linfática, também com tendência à progressão lenta (Figura 5).

Os hemangiomas planos, os cavernosos e os linfangiomas são lesões permanentes que não sofrem regressão espontânea, portanto, é necessário um tratamento efetivo para amenizá-las ou mesmo eliminá-las.



FIGURA 1. Hemangioma Plano

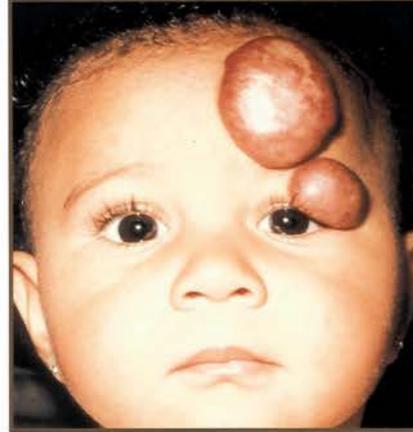


FIGURA 2. Hemangioma Fragiforme



FIGURA 3. Hemangioma Tuberoso

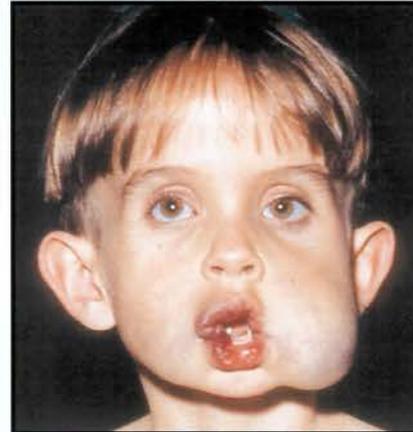


FIGURA 4. Hemangioma Cavernoso



FIGURA 5. Linfangioma

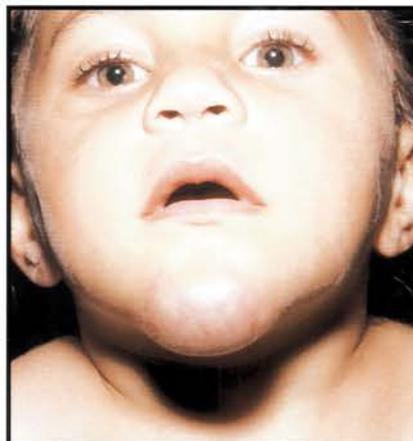


FIGURA 6. Tufted Hemangioma

Os hemangiomas planos, os cavernosos e os linfangiomas fazem parte de inúmeras síndromes dismórficas, das quais as mais freqüentes são as de Sturge-Weber, Klippel-Trenaunay e Proteus (WIEDEMANN et al. 1983; ENJOLRAS et al. 1985 e 1992; BIESECKER et al. 1999).

O diagnóstico das anomalias vasculares é estabelecido com dados de história e de exame físico em 96% dos casos (FINN et al. 1983). No entanto, o diagnóstico clínico está sujeito a equívocos que levam a uma conduta incorreta, ou seja, aguardar a regressão espontânea de uma lesão permanente, no caso dos hemangiomas planos, cavernosos ou linfangiomas, ou tratar estas lesões com drogas sistêmicas, às quais não são sensíveis. Da mesma forma, o não-reconhecimento de um hemangioma sensível a drogas sistêmicas, como os fragiformes e tuberosos, pode induzir ao emprego de outras modalidades terapêuticas menos apropriadas, como a cirurgia e a embolização, sem antes considerar o tratamento sistêmico prévio para reduzir a lesão.

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO BIOLÓGICA

MULLIKEN e GLOWACKI, em 1982, a partir da observação do comportamento biológico das células endoteliais das anomalias vasculares propuseram a “classificação biológica” destas lesões, dividindo-as em dois grandes grupos: *hemangiomas*, lesões que evoluem com padrão proliferativo, e *vascular malformations*. Como no Brasil todas as anomalias vasculares sangüíneas - as transitórias e as permanentes - são

denominadas genericamente hemangiomas, optamos por empregar o termo **hemangiomas proliferativos** para este grupo da classificação biológica, com o objetivo de reforçar a natureza proliferativa destas lesões, em contraste com o outro grupo de anomalias, as **más-formações vasculares**, que se desenvolvem durante a gestação e que, após o nascimento, apresentam ciclo celular normal (CAMPOS e CURADO 2002).

A história natural dos hemangiomas proliferativos é caracterizada pelo rápido crescimento pós-natal, durante meses (fase proliferativa), seguida por uma regressão lenta com duração de um a cinco anos (fase de involução). A regressão está completa em 50% das crianças aos cinco anos e em 70% dos casos aos sete anos, ainda mantendo um ritmo de melhora até os dez anos (fase de resolução) (BOWERS et al. 1960; PRATT 1967; TAKAHASHI et al. 1994). Os hemangiomas proliferativos são mais freqüentes nas meninas, em uma razão de 3:1 (BOWERS et al. 1960). Em geral, são pequenas lesões assintomáticas e a conduta conservadora é adotada para a maioria dos casos, evitando qualquer medida terapêutica que possa provocar toxicidade ou determinar seqüelas estéticas e funcionais.

A patogênese dos hemangiomas proliferativos não está claramente estabelecida. São compostos por microvasos com células endoteliais e pericitos mitoticamente ativos, formando aglomerados de capilares neoformados (MULLIKEN e GLOWACKI 1982). O conceito de que os hemangiomas proliferativos são angiogênese-dependentes foi inicialmente proposto por FOLKMAN (1974) e FOLKMAN e COTRAN (1976). Outros estudos confirmaram que o desenvolvimento destas lesões é mediado por

moléculas angiogênicas que atuam sobre as células endoteliais e os pericitos, dando início à progressão de capilares (FOLKMAN e KLAGSBURN 1987; RISAU et al. 1988; ZETTER 1988; BREIER et al. 1992; PEPPER et al. 1992). Este processo de angiogênese é regulado por inibidores do crescimento das células endoteliais que, em condições normais, mantêm a microvasculatura quiescente (MIGNATTI et al. 1989; TAKIGAWA et al. 1990).

YU et al. (2004), estudando a fase proliferativa, encontraram um predomínio de células que expressam CD133-2, marcador de células endoteliais progenitoras, sugerindo a participação destas células no desenvolvimento dos hemangiomas proliferativos.

O outro grupo de anomalias vasculares, as más-formações vasculares, estão presentes ao nascimento e não regredem espontaneamente. Embora não ocorra proliferação celular pós-natal, estas lesões evoluem com aumento de volume progressivo e lento, decorrente da dilatação dos vasos sangüíneos e/ou linfáticos malformados.

### **1.2.1 Classificação Biológica Modificada**

A classificação biológica foi modificada em 1996, para adicionar ao grupo dos hemangiomas outros tumores vasculares proliferativos da infância, como os hemangiomas congênitos, o hemangioendotelioma kaposiforme, o *tufted hemangioma* e o granuloma piogênico, criando o grupo dos “tumores vasculares”, mais abrangente (Quadro 2) (ENJOLRAS e MULLIKEN 1997).

<b>Tumores vasculares</b>	<b>Más-formações vasculares</b>
Hemangioma Proliferativo	Má-formação capilar
Hemangioma congênito rapidamente involutivo	Má-formação venosa
Hemangioma congênito não involutivo	Má-formação linfática
Hemangioendotelioma kaposiforme	Má-formação arterial
Tufted hemangioma	Má-formação combinada
Granuloma piogênico	

**Quadro 2** - Classificação Biológica Modificada.

O termo hemangioma congênito foi introduzido para designar lesões que, diferentemente do comportamento da maioria dos hemangiomas proliferativos, já estavam no seu desenvolvimento máximo ao nascimento (BOON et al. 1996). Posteriormente, foram descritas duas variantes dos hemangiomas congênitos: os rapidamente involutivos e os não-involutivos.

O hemangioma congênito rapidamente involutivo (*rapidly involuting congenital hemangioma - RICH*) é uma variante relativamente rara dos hemangiomas proliferativos, que se encontra totalmente desenvolvido ao nascimento e regride durante o primeiro ano de vida, deixando, na maior parte dos casos, atrofia de pele e de subcutâneo (BOON et al. 1996; BERENQUER et al. 2003).

O hemangioma congênito não-involutivo (*noninvoluting congenital hemangioma - NICH*) também foi descrito como uma variante dos hemangiomas proliferativos, que já se encontra totalmente desenvolvido ao

nascimento, mas, diferentemente do RICH, não apresenta regressão espontânea (ENJOLRAS et al. 2001). Histologicamente, NICH é composto por grandes lóbulos de pequenos vasos, entremeados por fibrose e microfistulas arteriovenosas dérmicas. Vasos maiores com membrana basal fina podem ser encontrados no centro dos lóbulos. O exame histológico de RICH também mostra lóbulos de tamanho variado, com vasos extralobulares maiores. O estudo imunoistoquímico mostrou que, embora na morfologia RICH e NICH se assemelhem aos hemangiomas proliferativos, são negativos para GLUT1 (ENJOLRAS et al. 2001; BERENGUER et al. 2003).

O hemangioendotelioma kaposiforme é um tumor pediátrico raro, freqüentemente associado com trombocitopenia (Síndrome de Kasabach-Merritt) (SARKAR et al. 1997). São tumores que evoluem com agressividade local e nem sempre respondem à terapêutica convencional (ZUKERBERG et al. 1993). São lesões irregulares formadas por nódulos que se parecem ao padrão morfológico dos hemangiomas proliferativos, porém infiltrativos e com um tecido intercapilar de células fusiformes. Uma das maiores séries encontradas na literatura, com 33 casos, mostrou que as células endoteliais que formam estas lesões foram negativas para GLUT1 (LYONS et al. 2004).

O *tufted hemangioma* é um tumor pediátrico que compromete preferencialmente o pescoço e a parte superior do tronco (Figura 6). São tufos ou lóbulos formados por capilares de paredes finas, disseminados na derme, que, morfológicamente, são semelhantes aos hemangiomas proliferativos. Apesar do comportamento benigno, a evolução é variável com tendência à progressão lenta (JONES e ORKIN 1989).

O granuloma piogênico aparece como uma pápula ou póliplo de pele ou mucosa, friáveis e sangrantes (REQUENA e SANGUEZA 1997). Em geral, o desenvolvimento do granuloma piogênico é subsequente a uma injúria, mas também aparece em áreas já comprometidas por lesões preexistentes, como o hemangioma plano (SWERLICK e COOPER 1983). Desenvolve-se por proliferação de tecido de granulação e não apresenta imunorreatividade para GLUT1 (NORTH et al. 2000). Uma série com 15 casos mostrou uma baixa taxa de apoptose, provavelmente ocasionando o rápido crescimento destas lesões (NAKAMURA 2000).

### **1.3 TRATAMENTO SISTÊMICO COM CORTICÓIDE E INTERFERON ALFA**

Em geral, os hemangiomas proliferativos são sensíveis a drogas sistêmicas, como o corticóide e o interferon alfa. O tratamento é recomendado para pacientes com complicações clínicas, mais freqüentes nos primeiros meses de vida. Estas lesões que evoluem com complicações foram denominadas “hemangiomas alarmantes” e definidas como lesões cujas características comprometem funções fisiológicas e/ou ameaçam a vida do paciente (ENJOLRAS et al. 1990). Neste grupo, encontramos portadores de lesões deformantes, lesões que causam obstrução de visão ou de vias aerodigestivas, lesões ulceradas, com crescimento rápido e de caráter atípico, comprometimento hepático, descompensação cardíaca e associação com plaquetopenia. Na literatura, encontramos diversas

publicações relatando sucesso do tratamento dos hemangiomas proliferativos alarmantes com corticóide e/ou interferon alfa, sendo a melhora sempre constatada por evidências clínicas (ZAREM e EDGERTON 1967; FOST e ESTERLY 1968; EDGERTON 1976; ENJOLRAS et al. 1990; EZEKOWITZ et al. 1992). Um estudo com 155 pacientes tratados com injeções intralesionais de corticóide menciona melhora de pelo menos 50% do volume das lesões, também baseada em parâmetros clínicos (CHEN et al. 2000).

Ainda não foram totalmente desvendados os mecanismos de atuação do corticóide e do interferon alfa no caso de interromper a proliferação e induzir a regressão das lesões. Quanto aos corticóides, os estudos realizados até o momento sugerem a interação direta com os receptores de glicocorticóides (HASAN et al. 2000). Também já foi demonstrado que o tratamento com corticóide promove aumento na expressão de genes relacionados com a apoptose (HASAN et al. 2001). Quanto ao interferon alfa, um estudo com cultura de células endoteliais da microvasculatura dérmica apontou um índice apoptótico aumentado em 20% nas células tratadas com interferon alfa (SGONC et al. 1998).

#### **1.4 MARCADORES GLUT1 E KI-67**

As anomalias vasculares vêm despertando interesse crescente e encontramos na literatura diversos estudos sobre as características biológicas dos diferentes tipos de lesão. Os marcadores são mencionados

como promissores na distinção entre os hemangiomas proliferativos e as más-formações vasculares.

Porém, apesar das pesquisas já realizadas, a patogênese das anomalias vasculares ainda não está devidamente esclarecida. Os hemangiomas proliferativos foram mais estudados e os resultados mais relevantes publicados até o momento, baseados em estudos imunoistoquímicos, indicam ser o desenvolvimento destas lesões mediado por fatores angiogênicos, e que a regressão, tanto a espontânea como a induzida por drogas, mediada por moléculas que participam da apoptose (TAKAHASHI et al. 1994; IWATA et al. 1996; BENJAMIN e KESHET 1997; SGONG et al. 1998).

#### **1.4.1 GLUT1**

GLUT1 é membro de uma família de pelo menos seis proteínas transportadoras de glicose estruturalmente relacionadas, que está altamente expressa no endotélio da microvasculatura de barreiras como as do sistema nervoso central, retina, placenta, musculatura ciliar e no endoneuro dos nervos periféricos (FROEHNER et al. 1988; HARIK et al. 1990; SCHLINGEMANN et al. 1998; JANSSON et al. 1999). O GLUT1 não está presente na vasculatura da pele e do subcutâneo (FARRELL et al. 1992).

Os resultados de NORTH et al. (2000 e 2001) proporcionaram a perspectiva de diferenciar os hemangiomas proliferativos pela expressão de GLUT1, cujo estudo imunoistoquímico mostrou 97 % de positividade em 143 casos de hemangiomas proliferativos e 100% de negatividade em 66 casos

de más-formações vasculares. Segundo estes autores, a positividade para GLUT1 é persistente durante todos os estágios do desenvolvimento dos hemangiomas proliferativos, desde a fase proliferativa até a fase de resolução. Já as más-formações vasculares são sempre negativas para GLUT1.

Em outubro de 2004, o GLUT1 foi apresentado no XXV Congress of the International Academy of Pathology, como um novo recurso para cirurgiões e patologistas no diagnóstico diferencial entre os hemangiomas e as más-formações vasculares (NORTH 2004).

Além do GLUT1, os hemangiomas proliferativos indicam intensa imunorreatividade para outros antígenos vasculares associados à placenta, como FcγRII, merosina e LeY (NORTH et al. 2001). Este fato levou North e colaboradores a especular a possibilidade de os hemangiomas proliferativos serem originários de angioblastos que se diferenciaram para um fenótipo placentário ou ainda de serem provenientes de células placentárias embolizadas, esta última hipótese favorecida pela observação do aumento da incidência de hemangiomas proliferativos nos casos previamente submetidos à punção de vilosidade coriônica (BURTON et al. 1995).

#### **1.4.2 Ki-67**

Ki-67 é uma IgG1, anticorpo monoclonal, usado como um método confiável para detectar a fração de crescimento das neoplasias (BROWN e GATTER 1990; CATTORETTI et al. 1992). A preferência pelo anticorpo Ki-

uniformemente positiva para o marcador linfático LYVE-1, indicou imunorreatividade para Ki-67 em 10 a 15% das células endoteliais (NORTH et al. 2004).

## **1.5 MARCADORES DE ANGIOGÊNESE E DE APOPTOSE**

Nas últimas décadas, as pesquisas se sucederam com o objetivo de identificar fatores relacionados com a biologia molecular dos hemangiomas proliferativos. Recentes avanços na elucidação, tanto do desenvolvimento da rede vascular normal como da angiogênese, vêm auxiliando na compreensão do desenvolvimento dos hemangiomas proliferativos.

Durante a embriogênese, o sistema vascular normal se desenvolve a partir de dois processos: vasculogênese e angiogênese (BREUGEM et al. 2000). Na vasculogênese, os vasos se formam a partir de células precursoras, os angioblastos. A angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir de vasos preexistentes e já foi demonstrada na patogênese dos hemangiomas proliferativos. Já o papel da vasculogênese no desenvolvimento destas lesões não está claro, ainda que a presença de artérias anômalas nos hemangiomas proliferativos extensos venha sendo atribuída a alterações da vasculogênese, provavelmente por volta da oitava e da décima semanas de idade gestacional (BREUGEM et al. 2000).

O equilíbrio dos tecidos é mantido pelo balanço entre proliferação e morte celular. No tecido vascular, a angiogênese é o processo de proliferação endotelial. As moléculas fator de crescimento do endotélio

vascular (*vascular endothelial growth factor* - VEGF) e óxido nítrico (*nitric oxide* - NO) são participantes na indução da angiogênese (KIMURA e ESUMI 2003). Nos hemangiomas, a ocorrência do VEGF na fase proliferativa já foi demonstrada, mas ainda não se explorou devidamente a participação do NO e das sintases de NO (*endothelial nitric oxide synthase* – NOS) na evolução destas lesões (TAKAHASHI et al. 1994; CHANG et al. 1999; TAN et al 2000).

A apoptose, ou a morte celular programada, é um processo ativo de autodestruição celular que representa um importante complemento da mitose na regulação do número de células durante o desenvolvimento, no ciclo celular homeostático do adulto, e em muitas outras condições (JACOBSON et al. 1997). É caracterizada por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas, como fragmentação do DNA, encolhimento citoplasmático e formação de corpos apoptóticos (WYLLIE et al. 1980; HENGARTNER 2000). O processo da apoptose é regulado por diversos genes. O gene p53 codifica uma proteína cuja função inclui a indução da apoptose celular.

O mecanismo de moléculas que atuam na apoptose é complexo e pode ser ativado por diferentes estímulos mediante duas vias: a via mitocondrial e a via receptor de morte.

A família Bcl-2 é uma das mais atuantes na via mitocondrial, com proteínas que inibem a apoptose, como a Bcl-2 e a Bcl-X, ou a estimulam, como Bax e Bak. Outro grupo de proteínas, FAS e FAS-L, estimulam a apoptose pela via receptor de morte.

A apoptose tem como componente central um grupo de enzimas proteolíticas denominadas caspases (*cysteiny/ aspartate-specific proteases*) (KERR et al. 1972). Uma vez ativadas, as caspases atuam em cadeia produzindo as alterações celulares do fenótipo da apoptose, especialmente evidentes no núcleo, no qual a cromatina se torna condensada, assumindo uma forma geométrica globular muito compacta (LEIST e JÄÄTTELÄ 2001).

Na literatura, encontramos estudos que sugerem ser o processo de apoptose o responsável pela regressão dos hemangiomas proliferativos, tanto a melhora espontânea como a induzida por drogas (HASAN et al. 2000 e 2001; FRISCHER et al. 2004). Pelos resultados de RAZON et al. (1998), a apoptose está aumentada cinco vezes na fase de involução dos hemangiomas.

### 1.5.1 VEGF

Os fatores de crescimento são moléculas regulatórias cuja função principal é colocar células quiescentes no ciclo celular. Costumam ser denominados de acordo com o órgão alvo de sua atividade biológica, por meio do qual se liga a receptores de superfície específicos e têm capacidade de afetar a proliferação ou diferenciação celular. O VEGF e o fator de crescimento dos fibroblastos (*fibroblast growth factor* - FGF) controlam a angiogênese.

Fisiologicamente, angiogênese é um processo regulado rigorosamente e, quando não, leva a processos patológicos, como tumores e doenças

inflamatórias. O VEGF é um potente fator angiogênico, mediando a neovascularização fisiológica e patológica, sendo usualmente empregado na pesquisa experimental para estimular a formação de vasos (FOLKMAN e KLAGSBRUN 1987). Porém, ainda não está claro se os vasos neoformados dependem do VEGF como fator de sobrevivência.

Nos hemangiomas proliferativos, MULLIKEN e GLOWACKI (1982) encontraram positividade para o VEGF e para bFGF, com a técnica da imunohistoquímica.

De acordo com o estudo de TAKAHASHI et al. (1994), também com imunohistoquímica, a alta imunorreatividade para VEGF, durante a fase proliferativa dos hemangiomas proliferativos, evidenciou o envolvimento desta molécula no desenvolvimento destas lesões. Recentemente, um estudo com hibridização *in situ* mostrou que a superexpressão do VEGF ocorre no plano da expressão gênica (produção de mRNA), com pico que coincide com a fase de proliferação (CHANG et al. 1999).

BENJAMIN e KESHET (1997) relataram que a sobrevivência da vascularização de células tumorais depende da manutenção do nível de VEGF, sugerindo que a queda provoca a regressão dos vasos neoformados. Nos hemangiomas proliferativos, os dados são controversos e ainda é questionável se a queda do nível de VEGF pode ser responsável pela regressão dos hemangiomas proliferativos. O estudo de uma biópsia de hemangioma proliferativo tratado previamente com triancinolona intralesional, com regressão acelerada após o tratamento, mostrou aumento da

expressão de genes ligados à apoptose, mas não encontrou alteração da expressão de VEGF (HASAN et al. 2000).

### 1.5.2 NOS3

O NO é uma molécula simples, porém com diversas funções fisiológicas (LINCOLN et al. 1997). Foi inicialmente descrito como vasodilatador potente, posteriormente identificado como fator relaxante do endotélio (KIMURA e ESUMI 2003). É sintetizado pela conversão enzimática da L-arginina, pelas sintases de óxido nítrico - NOS, liberando NO e L-citrulina. Dentre as sintases já descritas, a NOS3 é a isoforma constitutivamente expressa nas células do endotélio vascular (HECKER et al. 1995).

Segundo DULAK e JOZKOWICZ (2003), são abundantes as evidências demonstrando que NO é uma molécula efetora mediando a atividade de VEGF. Por meio da ligação com receptores, VEGF inicia a sinalização em cascata que resulta na produção de NO e na ativação angiogênica das células endoteliais. Em situações de hipóxia, NO promove a angiogênese, potencializando a atividade de uma molécula denominada fator indutor de hipóxia (*hypoxia inducible factor* - HIF-1), que, por sua vez, representa um papel chave na superexpressão de VEGF (DULAK e JOZKOWICZ 2003). Porém, alguns estudos mencionam a atuação do NO como indutor da angiogênese, outros constataam uma atuação indutora da apoptose, na dependência da quantidade liberada (LI et al. 1991; NISHIO e WATANABE 1998). Os resultados encontrados por SHEN et al. (1998) demonstraram que

a baixa concentração de NO contribui para a sobrevivência de células endoteliais humanas, enquanto a alta concentração desta molécula é patológica e promove a destruição celular. Para NISHIO e WATANABE (1998), NO induz a apoptose pelo aumento da expressão de p53 e diminuição da expressão de Bcl-2.

Nas neoplasias malignas humanas, a participação do NO é ainda pouco compreendida (MENDES et al. 2001). Nos estudos realizados até o momento, observou-se que esta molécula pode promover o crescimento dos tumores por meio da ativação da angiogênese e favorecer a ocorrência de metástases pelo aumento da permeabilidade vascular (GALLO et al. 1998).

Quanto aos hemangiomas proliferativos, GHIGO et al. (1995), estudando o comportamento de células endoteliais *in vitro*, sugerem a participação de NO, induzido por NOS3, no desenvolvimento destas lesões.

### 1.5.3 p53

O gene p53 atua como supressor de tumor e sua importância no desenvolvimento de algumas neoplasias já foi amplamente demonstrada na literatura (CATTORETTI et al. 1988; HOLLSTEIN et al. 1994; HENGARTNER 2000). A proteína produzida pelo gene p53 é um fator de transcrição que se liga em seqüências específicas de DNA, regulando a expressão de genes alvo. Em condições normais, a proteína p53 tem uma meia-vida curta e é inativada no citoplasma, em parte, pela oncoproteína MDM2 (O'CONNOR et al. 2003). Diversos estímulos podem levar ao

acúmulo de p53 no núcleo, especialmente um dano ao DNA. Acredita-se que a alteração de p53 também possa resultar no seu acúmulo.

O p53 pode atuar na indução da apoptose pela via mitocondrial e pela via receptor de morte (GRAEBER et al. 1994; SCHULER et al. 2000; SHEIKH e FORNACE 2000). Na via mitocondrial, p53 atua regulando positivamente fatores pró-apoptose, como Bax, e regulando negativamente fatores que inibem a apoptose, como o Bcl-2 (MIYASHITA et al. 1994). Na via receptor de morte, p53 pode determinar um aumento do nível da proteína FAS por meio de uma regulação transcricional.

A Síndrome de Li-Fraumeni ilustra a atuação do p53 como supressor de tumor. Os indivíduos portadores desta síndrome apresentam mutação de p53 nas células germinativas e desenvolvem tumores, como sarcomas, câncer de mama, leucemia e câncer de sistema nervoso central, que apresentam perda do alelo remanescente (MALKIN 1993). Da mesma forma, camundongos com mutação do p53 são susceptíveis ao desenvolvimento precoce de tumores e hemangiomas (DONEHOWER et al. 1992).

Na literatura, em um estudo com sete casos de hemangiomas proliferativos, não se encontrou imunorreatividade para p53 (IWATA et al. 1996). Ainda assim, a participação de p53 na patogênese dos hemangiomas proliferativos humanos não foi devidamente explorada.

#### 1.5.4 Família das proteínas Bcl-2

A família de proteínas Bcl-2 representa um papel central na via mitocondrial da apoptose (TSUJIMOTO et al. 1984; BAKHSHI et al. 1985). A proteína Bcl-2 localiza-se na membrana mitocondrial e atua mantendo a sobrevivência celular contínua, bloqueando a morte celular (HOCKENBERY et al. 1991). Bcl-2 está expressa em diversos tecidos fetais e adultos, em células que renovam a população celular, não sendo expressa nas células maduras como as do tecido vascular (SMOLLER et al. 1994).

A função da família de proteínas Bcl-2 é regular a atividade fisiológica da mitocôndria de inibir ou promover a morte celular (BRUCKHEIMER et al. 1998). A ativação da via mitocondrial da apoptose é sinalizada tanto pela liberação das proteínas mitocondriais como pela disfunção da própria mitocôndria (GREEN e REED 1998; GROSS et al. 1999). As moléculas com atividade pró e antiapoptose podem, direta ou indiretamente, antagonizar a atividade umas das outras.

Os componentes pró-apoptose, como Bax e Bak, servem como sensores dos sinais de morte e executores do programa. Os componentes antiapoptose, como Bcl-2 e Bcl-X, inibem a iniciação do programa (ADAMS e CORY 1998).

A disfunção de Bcl-2 pode estar relacionada ao desenvolvimento do câncer (MCDONNELL e KORSMEYER 1991; KRAJEWSKI et al. 1996; BRUCKHEIMER et al. 2000). Nos hemangiomas proliferativos, MANCINI e SMOLLER (1996) encontraram imunorreatividade para Bcl-2, tanto nas

células endoteliais como nas intersticiais, com decréscimo nas fases de evolução dos hemangiomas.

### 1.5.5 Família receptor de morte

Os receptores de morte pertencem à superfamília dos receptores TNF/NGF (*tumor necrosis factor/nerve growth factor*) que são ativados pela junção aos seus ligantes naturais (NAGATA 1996; ASHKENAZI e DIXIT 1998; LOCKSLEY et al. 20). Os membros desta família são proteínas transmembrana tipo-I, com um C-terminal intracelular e um domínio N-terminal extracelular. Apresentam uma seqüência de aminoácidos citoplasmática conhecida como domínio de morte (DD), que habilita os receptores de morte a iniciar o seu sinal. A interação do domínio de morte citoplasmático com outras moléculas resulta na ativação de uma das caspases ativadoras, como a caspase-8, e na subsequente ativação da cadeia de caspases com o processamento e ativação de uma caspase efetora, como a caspase-3, resultando, direta ou indiretamente, na execução da morte celular (GUICCIARDI e GORES 2003).

Dos seis receptores de morte já descobertos, o FAS (também denominado CD95 ou APO-1) foi o mais estudado até o momento. FAS-L (CD95L) é um potente indutor da apoptose (DESBARATS et al. 1998; MIWA et al. 1998). É uma proteína transmembrana tipo-II, expressa na superfície de células T ativadas. A ligação de FAS com FAS-L induz a apoptose celular (DESBARATS et al. 1998).

Um elemento responsivo à p53 está localizado no primeiro íntron do gene FAS, e colabora com três seqüências, no promotor que regula a superexpressão de FAS e FAS-L (MULLER et al. 1998).

Não encontramos na literatura estudos sobre a atuação das moléculas FAS e FAS-L na patogênese dos hemangiomas proliferativos.

### **1.5.6 Caspases**

O estudo do desenvolvimento do *Caenorhabditis elegans* resultou na descoberta da participação das caspases no fenômeno da apoptose (ELLIS et al. 1991).

Até o momento, foram identificadas onze caspases humanas que compõem um complexo sistema proteolítico vital na regulação da apoptose (MURPHY e MARTIN 2003). O processo é desencadeado por diversos estímulos que resultam na ativação das caspases e culminam no colapso celular. As caspases envolvidas na apoptose apresentam diversas atividades. Os estímulos que iniciam o processo, promovem a ativação das caspases efetoras que, por sua vez, provocam a clivagem e a ativação das caspases executoras. Na via mitocondrial da apoptose, a caspase-3 representa um papel fundamental na disseminação e amplificação da cadeia (SLEE et al. 1999).

As caspases podem ser inativadas por mutação, silenciadas por metilação ou pela superexpressão de um inibidor endógeno. Estas

alterações podem ser encontradas em diferentes tipos de câncer, como as já relatadas nos melanomas, neuroblastomas, entre outros (UEKI et al. 2001).

Ainda não foi demonstrada a participação da caspase-3 na patogênese dos hemangiomas proliferativos.

## 1.6 TUNEL

O método padrão para a detecção da apoptose é o reconhecimento e a quantificação das células morfológicamente alteradas. Porém, estas alterações são de difícil detecção à microscopia óptica convencional, sendo mais facilmente identificadas com o auxílio de colorações específicas (GAVRIELI et al. 1992; ANSARI et al. 1993). A técnica de TUNEL permite a identificação de núcleos condensados pela utilização de corantes fluorescentes e a detecção das extremidades do DNA fragmentado pela marcação com dUTP-biotina mediada pela transferase terminal (TdT).

Como já foi mencionado, a apoptose é o processo celular que promove a regressão dos hemangiomas proliferativos. Uma série publicada em 1998, com 16 espécimes de hemangiomas proliferativos, empregando a técnica de TUNEL, encontrou um aumento da apoptose, a partir do segundo ano de vida, coincidindo com a fase de involução destas lesões (RAZON et al. 1998). Outra publicação recente evidenciou a eficiência da técnica de TUNEL em demonstrar as células endoteliais apoptóticas, raras nos hemangiomas em proliferação e freqüentes na fase de involução (FRISCHER et al. 2004).

De fato, os estudos indicam ser o processo de apoptose o responsável pela regressão dos hemangiomas proliferativos, tanto na melhora espontânea como na induzida por drogas. Porém, até o momento, não encontramos estudos que demonstrassem claramente a efetividade do corticóide e do interferon alfa no tratamento dos hemangiomas proliferativos.

## **2. OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

- A. Estudar a imunorreatividade dos marcadores GLUT1 e Ki-67 nas anomalias vasculares, comparar os resultados com o diagnóstico clínico/biológico estabelecido previamente e com o padrão encontrado na revisão da morfologia;
  
- B. Estudar a imunorreatividade de proteínas ligadas à angiogênese (VEGF e NOS3) e à apoptose (p53, Bcl-2, Bcl-X, Bak, Bax, FAS, FAS-L e caspase-3) nos hemangiomas proliferativos; comparar os resultados encontrados entre dois grupos de pacientes: não tratados e tratados previamente com corticóide e/ou interferon alfa;
  
- C. Estudar a apoptose nos hemangiomas proliferativos (técnica de TUNEL) e comparar os resultados encontrados entre dois grupos de pacientes: não tratados e tratados previamente com corticóide e/ou interferon alfa.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODO**

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODO**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Este estudo é uma análise retrospectiva de 262 pacientes portadores de anomalias vasculares, admitidos para tratamento no Setor de Hemangioma do Departamento de Cirurgia Reparadora do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer, em São Paulo, e operados no período de março de 1988 a março de 2004.

##### **3.1.1 Critérios de elegibilidade para o estudo**

Foram elegíveis para este estudo os pacientes admitidos para tratamento entre 0 a 18 anos de idade, portadores de anomalias vasculares, segundo a classificação clínica adotada, a saber: hemangioma plano, hemangioma fragiforme, hemangioma tuberoso, hemangioma cavernoso, linfangioma e as associações.

##### **3.1.2 Critérios de exclusão do estudo**

Foram excluídos os casos que não dispunham de material adequado para o estudo imunoistoquímico.

##### **3.1.3 Descrição da casuística**

Para a primeira etapa do projeto, 262 pacientes foram incluídos para a revisão morfológica e estudo imunoistoquímico com os marcadores GLUT1

e Ki-67. Excluiu-se 1 paciente cuja revisão morfológica mostrou tratar-se de hemangioendotelioma kaposiforme.

#### **3.1.4 Estudo da imunorreatividade das proteínas ligadas a angiogênese e apoptose nos hemangiomas proliferativos**

Para o estudo da imunorreatividade dos marcadores de angiogênese e apoptose (VEGF, NOS3, p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, FAS, FAS-L e caspase-3) foram incluídos 118 pacientes com diagnóstico clínico/biológico de hemangioma proliferativo e com material disponível e adequado para o restante do estudo imunoistoquímico.

#### **3.1.5 Estudo da apoptose nos hemangiomas proliferativos, com a técnica de TUNEL**

Para o estudo da apoptose pela técnica de TUNEL foram incluídos 36 pacientes com diagnóstico clínico/biológico de hemangioma proliferativo. Para tornar o estudo viável, devido ao alto custo do kit Apoptag, optou-se por reduzir o número de pacientes.

### **3.2 MÉTODO**

Este estudo incluiu coleta dos dados clínicos dos prontuários, resgate das lâminas para revisão morfológica, escolha e resgate dos blocos para estudo imunoistoquímico. Os dados clínicos foram coletados dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico Estatístico (SAME) do Hospital do

Câncer, retrospectivamente. Realizou-se o levantamento dos prontuários, o preenchimento das fichas clínicas e dos dados do exame anatomo-patológico, a digitação para o banco de dados e a análise estatística.

O instrumento de coleta de informações consistiu em um formulário padronizado, contendo os seguintes grupos de dados:

- nome, número do registro e número do estudo;
- demográficos (idade, gênero e grupo étnico);
- história clínica (idade ao aparecimento da lesão, ritmo de progressão da lesão, sangramento e ferimento);
- exame loco-regional (extensão e profundidade da lesão);
- localização topográfica (segmento cefálico, tronco ou membros);
- diagnóstico clínico;
- tratamento sistêmico (medicamento utilizado, duração do tratamento em dias);
- tratamento cirúrgico (data e número do laudo anatomo-patológico).

Pelo número do exame anatomo-patológico as lâminas foram solicitadas ao arquivo para a revisão morfológica. Em seguida, os blocos escolhidos foram cortados para o estudo imunoistoquímico. A autora desta tese acompanhou a leitura dos exames imunoistoquímicos e a contagem de células do Ki-67 e do TUNEL. À medida que os dados foram sendo

coletados, as fichas eram preenchidas e os dados registradas em um banco, utilizando o programa de computador SPSS, versão 10.0.

### **3.2.1 Revisão da Morfologia**

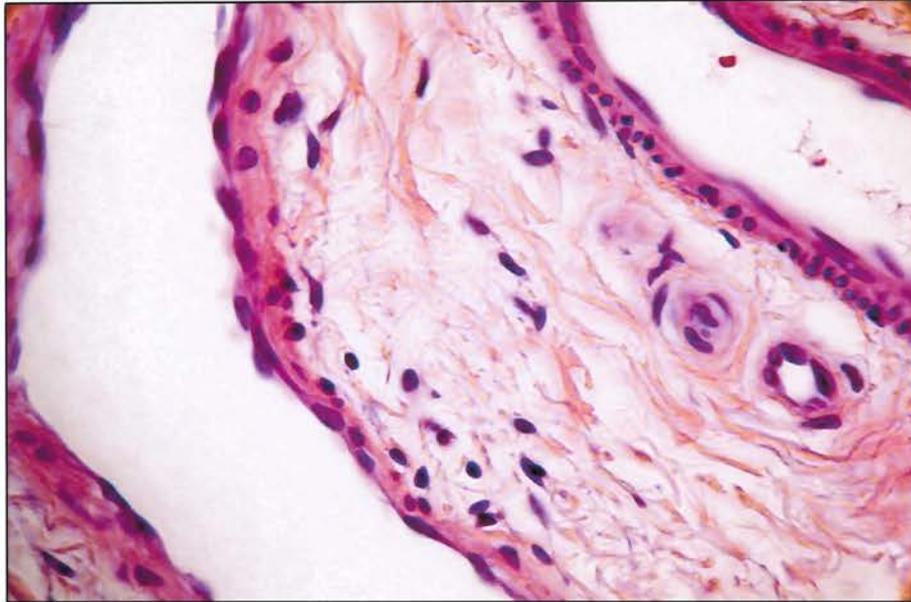
As lâminas correspondentes aos casos de anomalias vasculares incluídos no estudo foram revisadas por dois patologistas (F.A.S. e I.W.C), para a confirmação do diagnóstico e para a escolha do bloco mais representativo de cada caso. Durante a revisão, os casos foram classificados de acordo com a morfologia: padrão má-formação, padrão proliferação, padrão fibrogorduroso e padrão fibrose (Quadro 3) (NORTH et al. 2000).

O padrão morfológico de má-formação foi identificado pela presença de vasos capilares, venosos e/ou linfáticos, irregulares e dilatados e pode ser visto na Figura 7. O padrão morfológico de proliferação, composto por massas de células endoteliais e com a presença de figuras de mitose, pode ser visto na Figura 8.

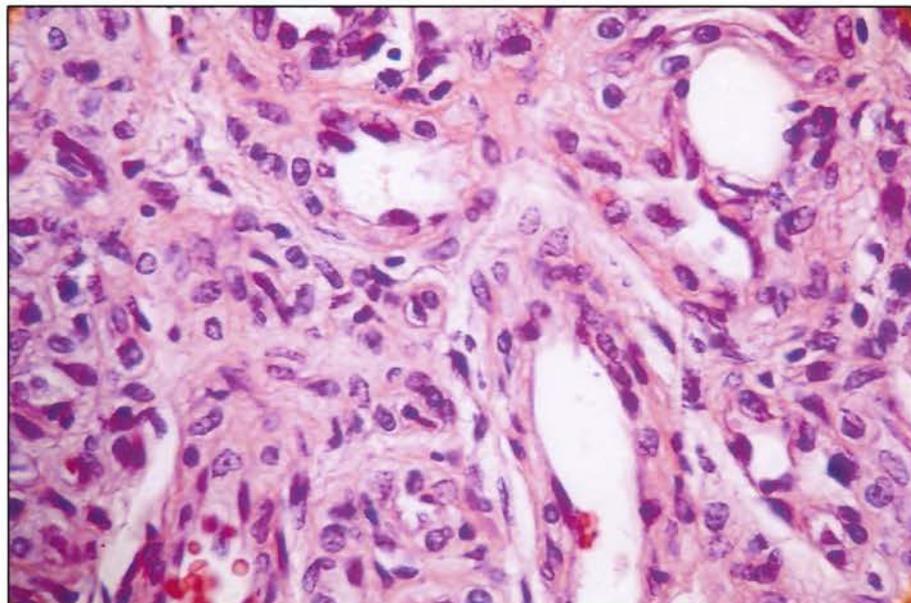
Após a revisão da morfologia, os blocos de parafina foram resgatados e cortados para o estudo imunoistoquímico.

Variável	Padrão morfológico
Padrão má-formação	<ul style="list-style-type: none"> <li>- venulocapilar: capilares e venulas ectasiadas confinadas a derme, células endoteliais achatadas e mitoticamente inativas;</li> <li>- venosa: coleções anormais de vasos e lagos venosos irregulares, com musculatura lisa da parede pobremente organizada, células endoteliais achatadas e mitoticamente inativas;</li> <li>- artério-venosa: coleções anormais compostas por canais venosos e arteriais, misturadas com vasos menores, células endoteliais achatadas e mitoticamente inativas;</li> <li>- linfática: coleção de canais linfáticos dilatados contendo fluído proteináico, células endoteliais achatadas e mitoticamente inativas;</li> </ul>
Padrão proliferação	<ul style="list-style-type: none"> <li>- fase proliferativa dos hemangiomas proliferativos: massa bem definida composta por tubos de células endoteliais e pericítos com luz pequena e arredondada. Figuras de mitose são frequente;</li> <li>- fase de involução dos hemangiomas proliferativos: capilares ainda presentes, progressivamente substituídos por tecido fibrogorduroso, capilares residuais mostrando membrana basal espessa e células endoteliais achatadas, pouca atividade mitótica;</li> </ul>
Padrão fibrogorduroso	<ul style="list-style-type: none"> <li>- fase de resolução dos hemangiomas proliferativos: substituição da lesão por tecido fibrogorduroso, vasos dilatados residuais que mimetizam má-formação vascular;</li> </ul>
Padrão fibrose	<ul style="list-style-type: none"> <li>- tecido fibrótico não sendo possível reconhecer nenhum tipo de padrão.</li> </ul>

**Quadro 3** - Critérios para a revisão da morfologia das anomalias vasculares.



**FIGURA 7.** Fotomicrografia de preparação histológica de Má-formação Vascular corado pela hematoxilina-eosina (H.E. 400x).



**FIGURA 8.** Fotomicrografia de preparação histológica de Hemangioma Proliferativo corado pela hematoxilina-eosina (H.E. 400x).

### 3.2.2 Estudo imunoistoquímico

O estudo imunoistoquímico compreende um conjunto de métodos para a detecção de antígenos em tecidos ou células baseado na revelação da reação antígeno-anticorpo, identificando proteínas no tecido alvo de maneira específica com o uso de marcadores.

Na primeira etapa do estudo foram empregados os marcadores GLUT1 e Ki-67 (Quadro 4). Na segunda etapa, os casos diagnosticados clinicamente como hemangiomas proliferativos foram estudados com o restante dos marcadores apresentados no Quadro 4.

ANTÍGENO	CLONES	CATÁLOGO	ORIGEM	DILUIÇÃO
GLUT1	Policlonal	A3536	DAKO	1:500
Ki-67	Ki-s5	M7187	DAKO	1:100
VEGF	Policlonal	Sc-152	Santa Cruz	1:600
NOS3	3	N30020	Transduction Labts.	1:100
Proteína p53	DO7	M-7001	DAKO	1:500
Proteína Bcl-2	124	M0887	DAKO	1:50
Proteína Bcl-X	Policlonal	A3535	DAKO	1:50
Proteína Bax	Policlonal	A3533	DAKO	1:50
Proteína Bak	Policlonal	A3538	DAKO	1:400
CD95/Fas (C20)	Policlonal	Sc-715	Santa Cruz	1:200
CD95/Fas-L (N20)	Policlonal	Sc-834	Santa Cruz	1:200
Caspase-3	Policlonal	9661	Cell Signaling	1:600

**Quadro 4** - Anticorpos, clones e origem.

As reações imunoistoquímicas foram realizadas pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®). Os passos técnicos foram os já descritos na literatura (HSU et al. 1981; GORCZYCA et al. 1995).

Resumidamente, cortes histológicos de cada caso (3µm) fixados em formol a 10% e emblocados em parafina foram montados em lâminas previamente revestidas por solução de silano (APTS – Sigma® A3648) diluído a 4% em acetona. Após desparafinização e reidratação, foram imunocorados utilizando-se o método do complexo estreptavidina ligada à biotina (LSAB, DAKO). O bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com água oxigenada a 3% e a recuperação antigênica por calor úmido em panela de pressão e forno de microondas, em tampão citrato 10mM, pH 6,0. As reações foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, Sigma®) e contracoradas com hematoxilina de Harris (Merck®).

As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado e dois controles negativos, dos quais, o primeiro foi obtido pelo não-uso do anticorpo primário e o segundo pela retirada do anticorpo secundário durante os passos da reação.

### **3.2.3 TUNEL**

A detecção da apoptose in situ, pela marcação dos pontos de quebra do DNA por DUTP-biotina mediada por deoxinucleotidil terminal-transferase

(TUNEL) foi realizada, utilizando-se o ApopTag Plus Peroxidase (Intergen Company), por meio da técnica descrita previamente (GAVRIELI et al. 1992; ANSARI et al. 1993). Brevemente, os cortes histológicos de anomalias vasculares (3 $\mu$ m) fixados em formol a 10% e emblocados em parafina foram montados em lâminas previamente revestidas por solução de silano (APTS – Sigma® A3648) diluído a 4% em acetona. Após desparafinização e reidratação, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,2. Os cortes histológicos foram então submetidos à digestão em solução de tripsina (Sigma) a 0,25mg%, em estufa a 37°C, por 2 minutos, e então lavados em água deionizada. O bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com água oxigenada a 3%. Após a aplicação de um tampão de equilíbrio (fornecido pelo fabricante), as lâminas foram incubadas com solução contendo a enzima deoxinucleotidil terminal-transferase (TdT) e nucleotídeos conjugados à digoxigenina por uma hora, a 37°C. A reação foi interrompida, incubando-se as lâminas em um “tampão de interrupção”, fornecido pelo fabricante, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após lavar as lâminas em PBS, passamos à identificação dos nucleotídeos incorporados. Para tal, incubamos os cortes com anticorpo antidigoxigenina conjugado à peroxidase e revelamos a reação com diaminobenzidina (DAB). A contracoloração foi feita com Green Fast. O controle negativo foi obtido, utilizando-se a solução de enzima TdT e nucleotídeos, conjugados à digoxigenina por tampão fosfato.

### **3.2.4 Mensuração da reação imunoistoquímica**

As reações imunoistoquímicas foram avaliadas por dois observadores (F.A.S e I.W.C.), com o microscópio óptico comum, em lâminas numeradas, sem nenhum conhecimento dos dados de cada caso.

#### **3.2.4.1 GLUT1 e marcadores de angiogênese e apoptose celular**

A visualização da reação imunoistoquímica é expressa pela coloração marrom no núcleo (KI-67 e p53) ou no citoplasma das células endoteliais (demais marcadores). A técnica imunoistoquímica foi julgada adequada, e o resultado da reação, negativo ou positivo, de acordo com os controles.

Para os marcadores GLUT1, VEGF, NOS3, p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, FAS, FAS-L e caspase-3, os resultados foram classificados em relação ao número de células positivas e à intensidade da reação nos campos mais representativos. Esta gradação pode ser vista nos Quadros 5 e 6. O escore final foi estabelecido pela somatória dos graus, sendo considerados casos negativos os escores 0-2, fracamente positivos a somatória entre 3-4 e fortemente positivos os casos cuja somatória foi maior do que 4.

Os casos com dificuldade técnica, por impedir a leitura da imunorreatividade, foram classificados como “não avaliáveis”.

A Figura 9 mostra um exemplo de positividade para GLUT1 em um hemangioma proliferativo e a Figura 10 mostra uma má-formação vascular, negativa para GLUT1. As Figuras 11 a 22 mostram exemplos das reações imunoistoquímicas para os marcadores VEGF, NOS3, p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, FAS, FAS-L e caspase-3.

<b>Característica</b>	<b>Grau</b>
<b>Ausente</b>	<b>0</b>
<b>Pouca</b>	<b>1</b>
<b>Moderada</b>	<b>2</b>
<b>Forte</b>	<b>3</b>
<b>Muito forte</b>	<b>4</b>

**Quadro 5** - Gradação da reação de acordo com a intensidade.

<b>Característica</b>	<b>Grau</b>
<b>0 células</b>	<b>0</b>
<b>&lt; 10% das células positivas</b>	<b>1</b>
<b>10 a 50% das células positivas</b>	<b>2</b>
<b>51 a 75% das células positivas</b>	<b>3</b>
<b>&gt; 75% das células positivas</b>	<b>4</b>

**Quadro 6** - Gradação da reação de acordo com o número de células coradas.

#### 3.2.4.2 Ki-67

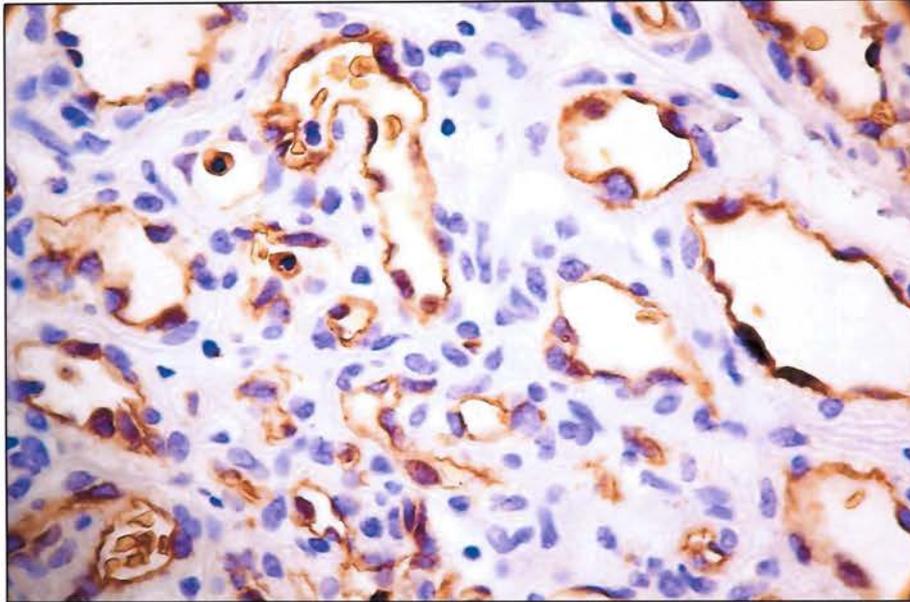
No estudo com o marcador Ki-67, para cada caso foram fotografados 5 campos (aumento de 400x) utilizando a câmera fotográfica CyberShot 3.3 (Sony, DSC-575) acoplada ao microscópio. As imagens foram transferidas para o computador para morfometria que foi realizada com o programa AxioVision 3.1 (Zeiss). As células positivas para Ki-67, identificadas pela

coloração marrom no núcleo, foram marcadas com um sinal vermelho e as negativas com verde. A Figura 23 mostra exemplo de má-formação vascular negativa para Ki-67. A Figura 24 mostra exemplo de hemangioma proliferativo com células coradas, positivas para o Ki-67.

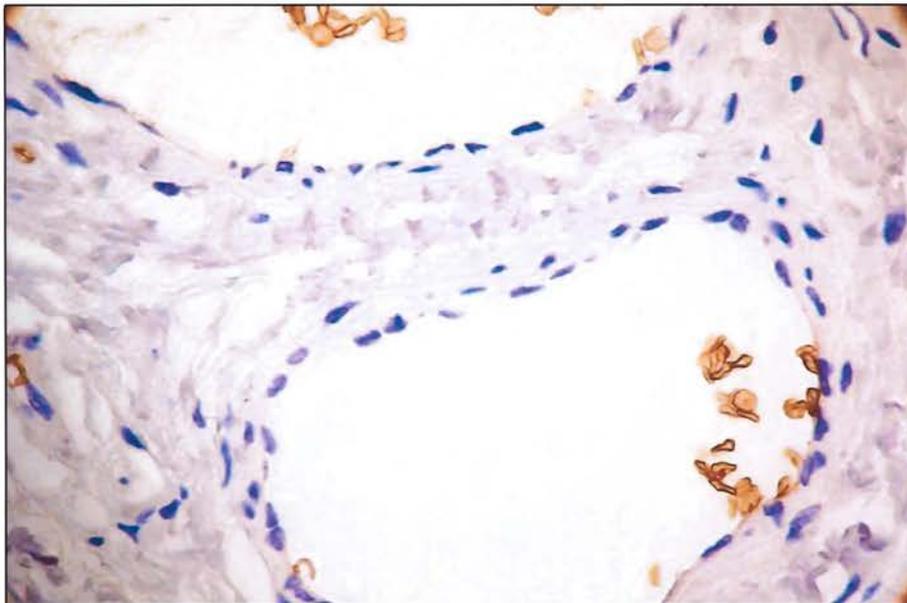
Para este marcador, para calcular a porcentagem de proliferação celular, procedeu-se à divisão de número de células positivas para Ki-67 pelo número de células negativas, multiplicando o produto por 100. A porcentagem de positividade para Ki-67 foi separada em grupos: até 1% e acima de 1,0% de positividade, de acordo com a mediana.

#### **3.2.4.3 TUNEL**

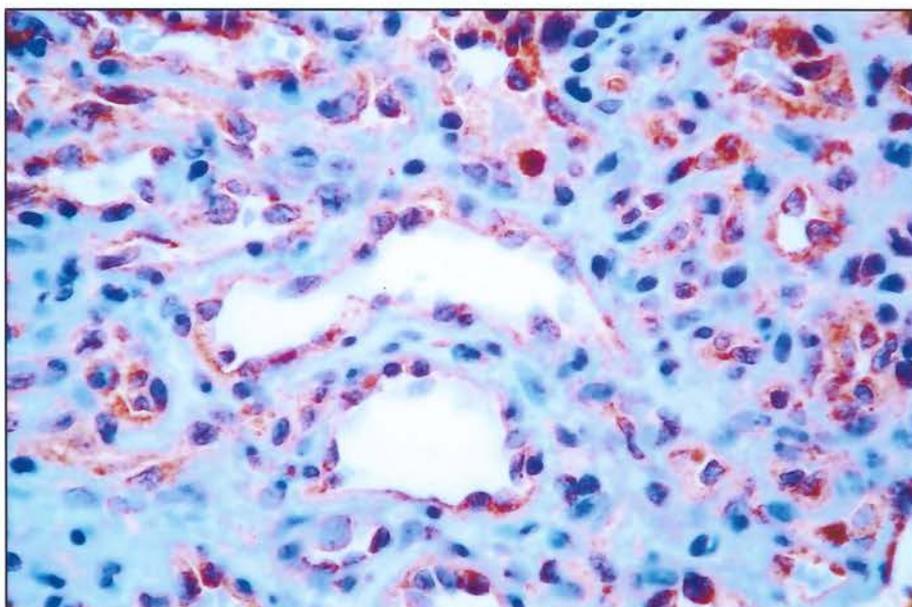
Para cada caso foi realizada a contagem de 500 células, positivas e negativas. As células negativas foram identificadas pela fraca coloração esverdeada e as positivas pela coloração marrom, como mostram as Figuras 25 e 26. A porcentagem de células positivas para a apoptose foi obtida mediante a divisão do número de células positivas pelo número de células negativas, multiplicando-se o produto por 100.



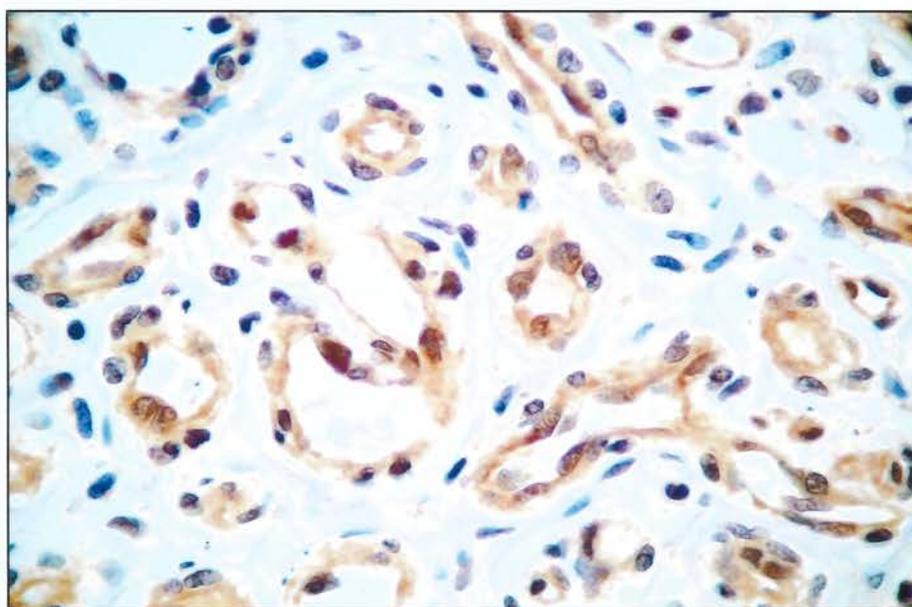
**FIGURA 9.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para GLUT1 (aumento original, 400x).



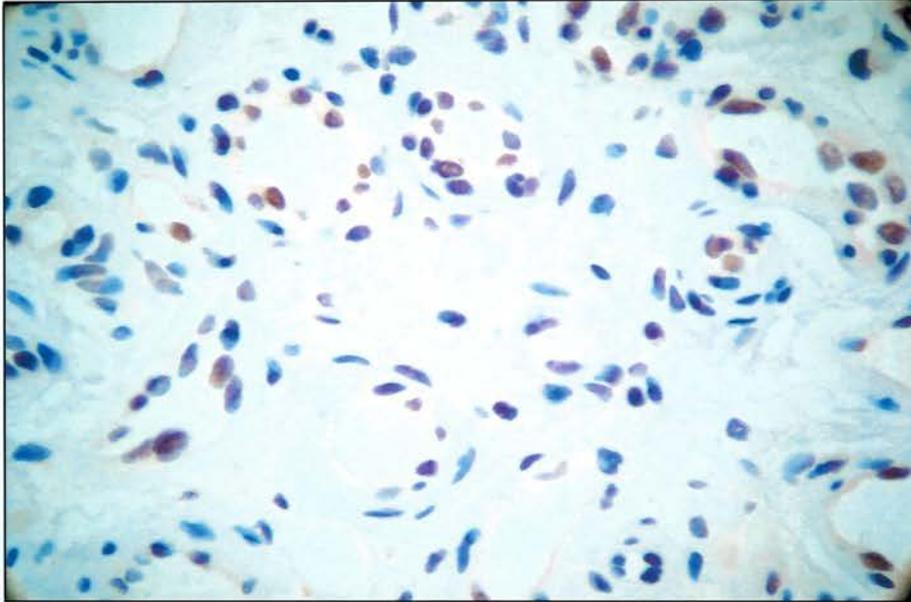
**FIGURA 10.** Má-formação Vascular. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica para GLUT1 (aumento original, 400x).



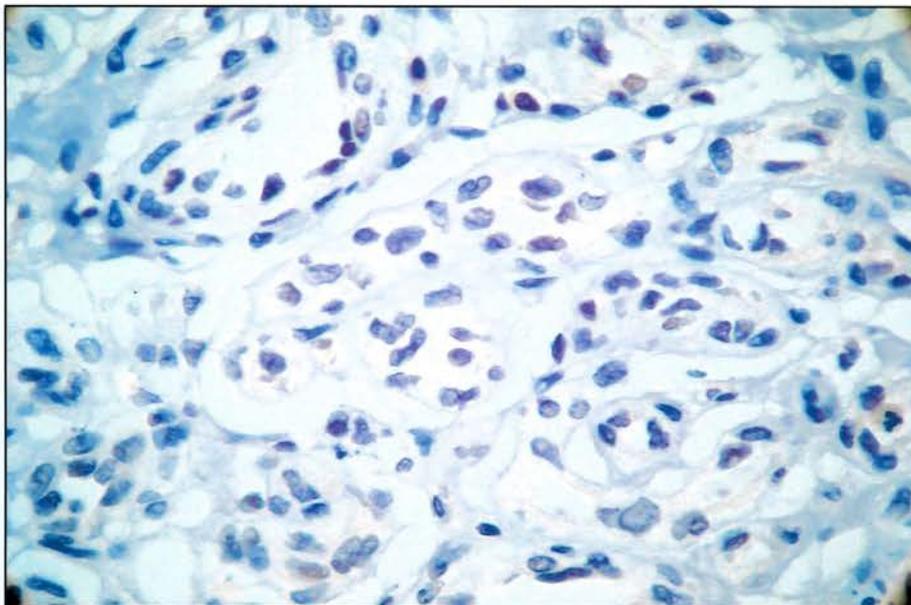
**FIGURA 11.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para VEGF (aumento original, 400x).



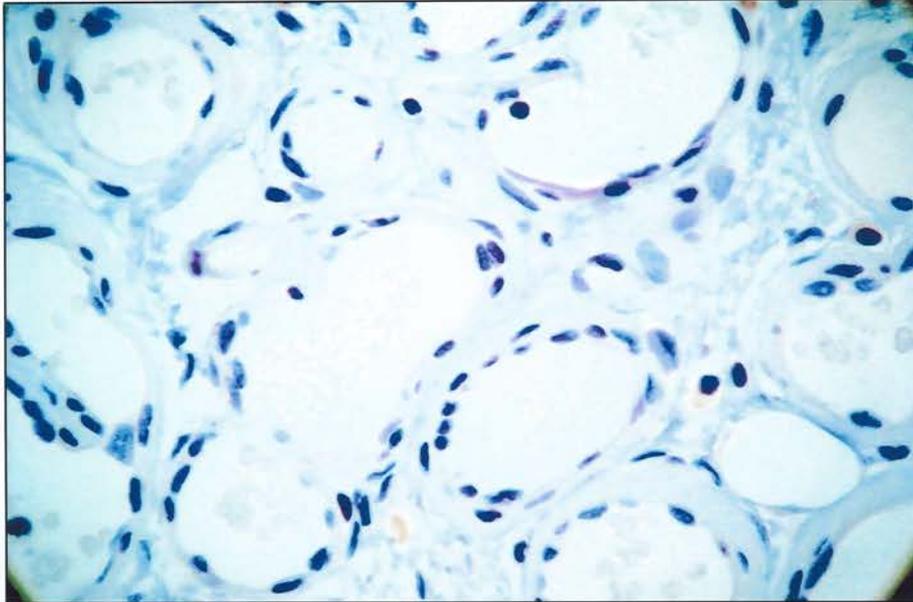
**FIGURA 12.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para NOS3 (aumento original, 400x).



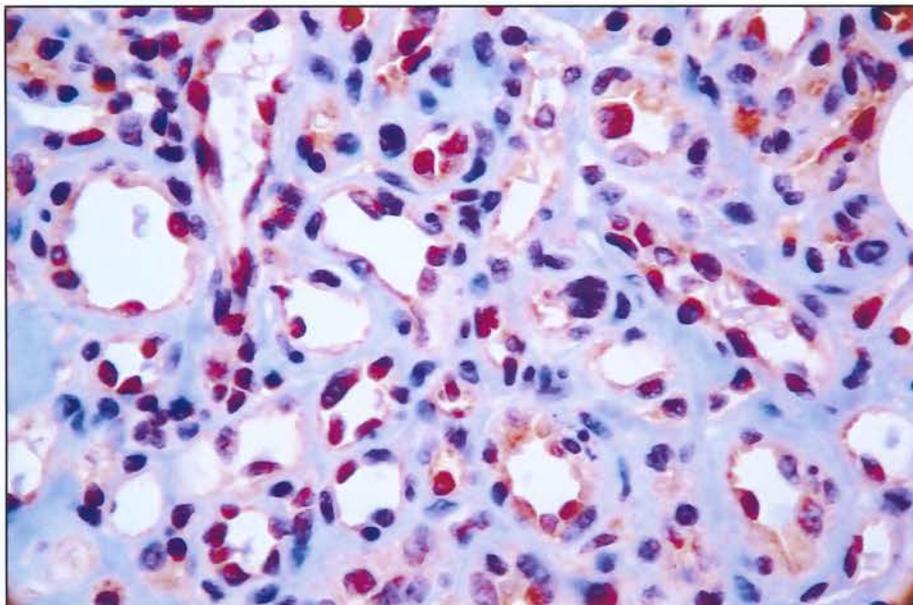
**FIGURA 13.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para p53 (aumento original, 400x).



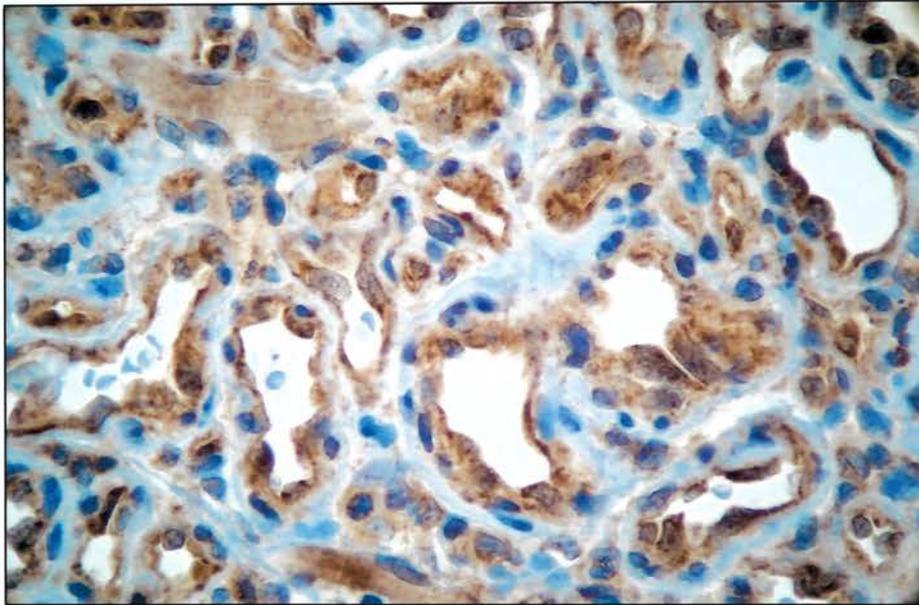
**FIGURA 14.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica para p53 (aumento original, 400x).



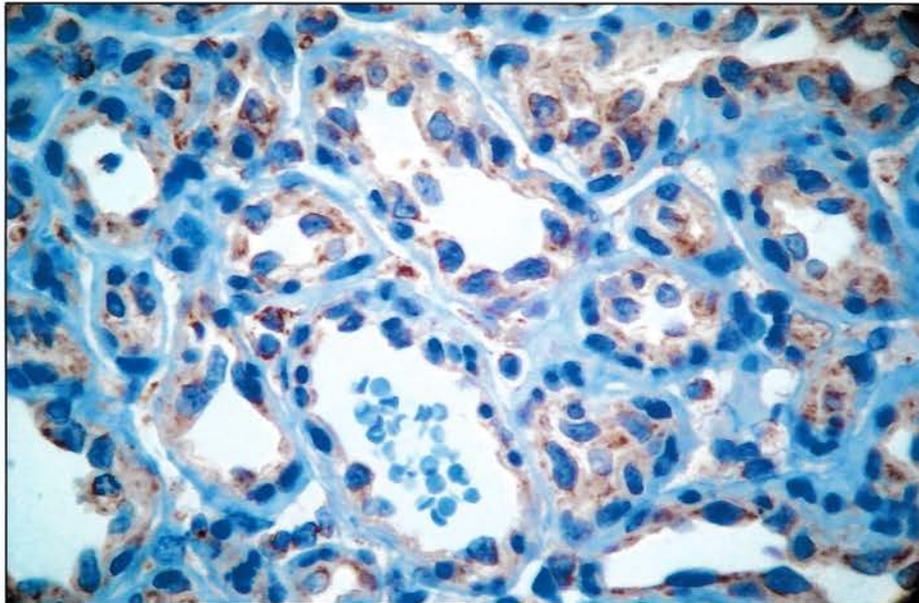
**FIGURA 15.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica para Bcl-2 (aumento original, 400x).



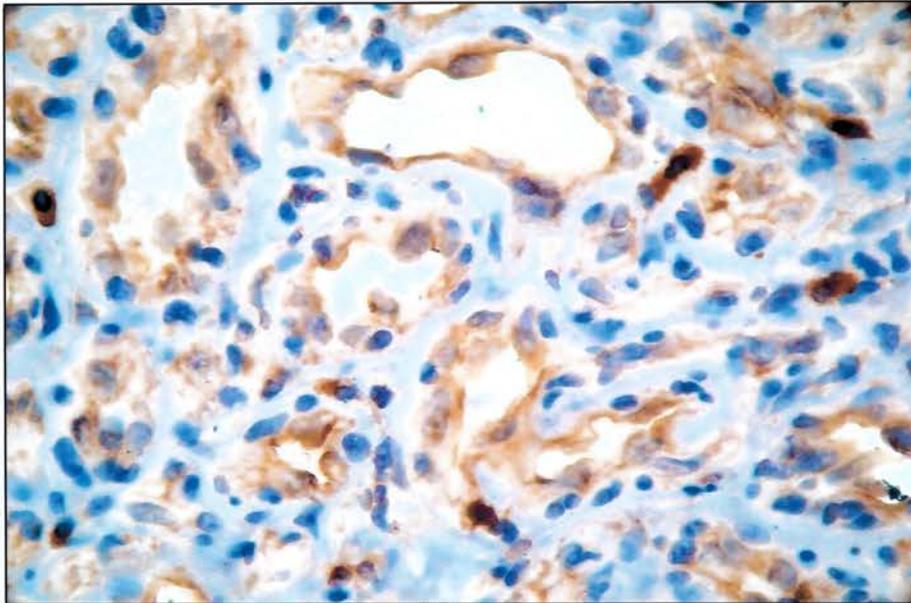
**FIGURA 16.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para Bcl-X (aumento original, 400x).



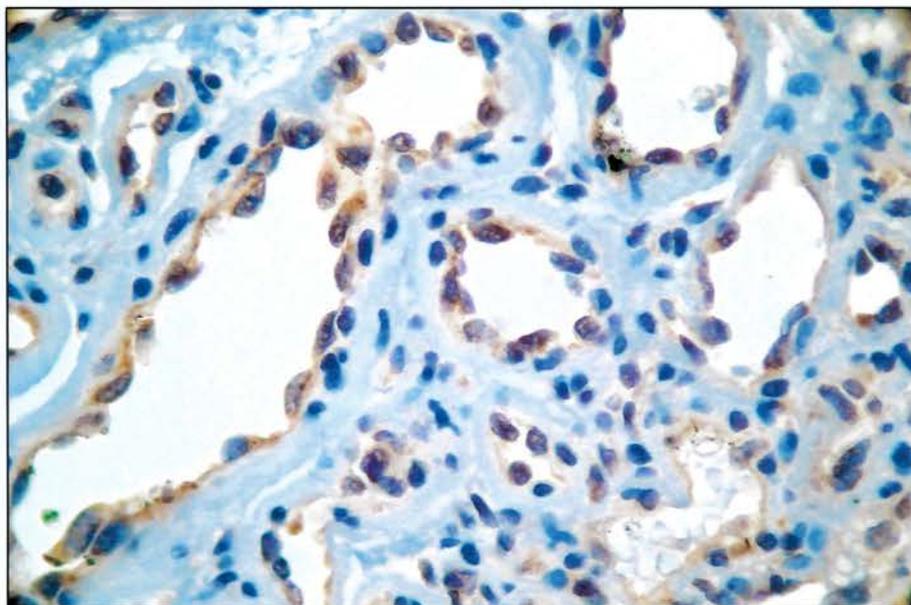
**FIGURA 17.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para Bax (aumento original, 400x).



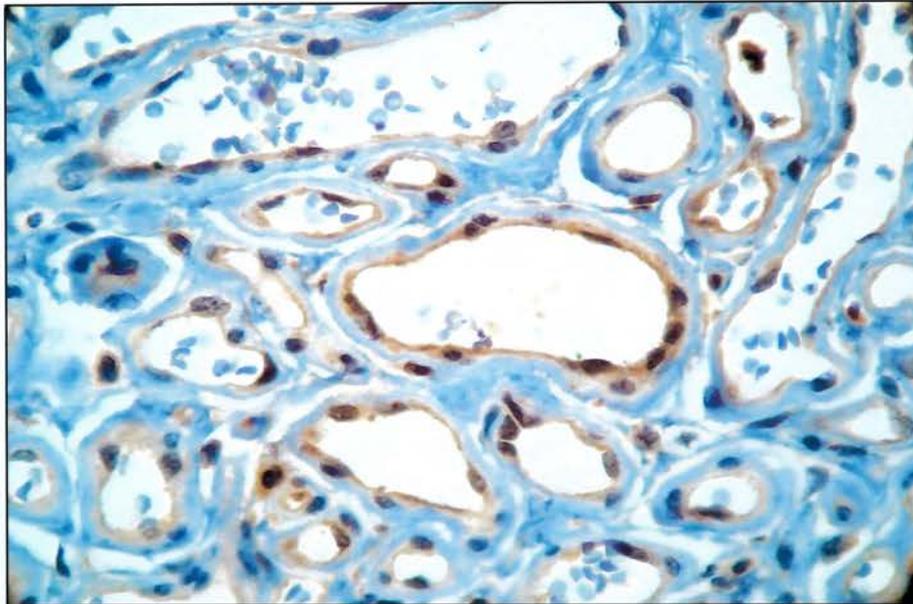
**FIGURA 18.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para Bak (aumento original, 400x).



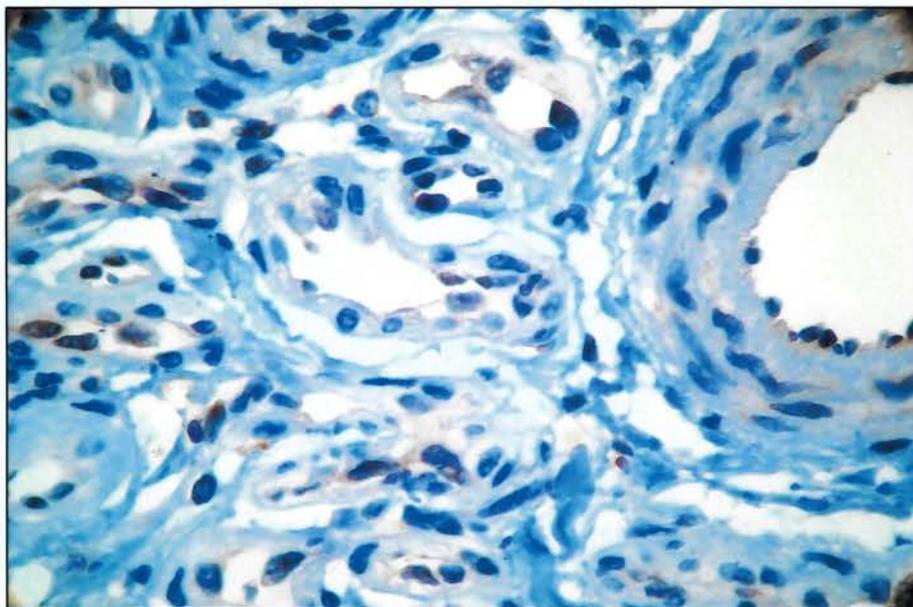
**FIGURA 19.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para FAS (aumento original, 400x).



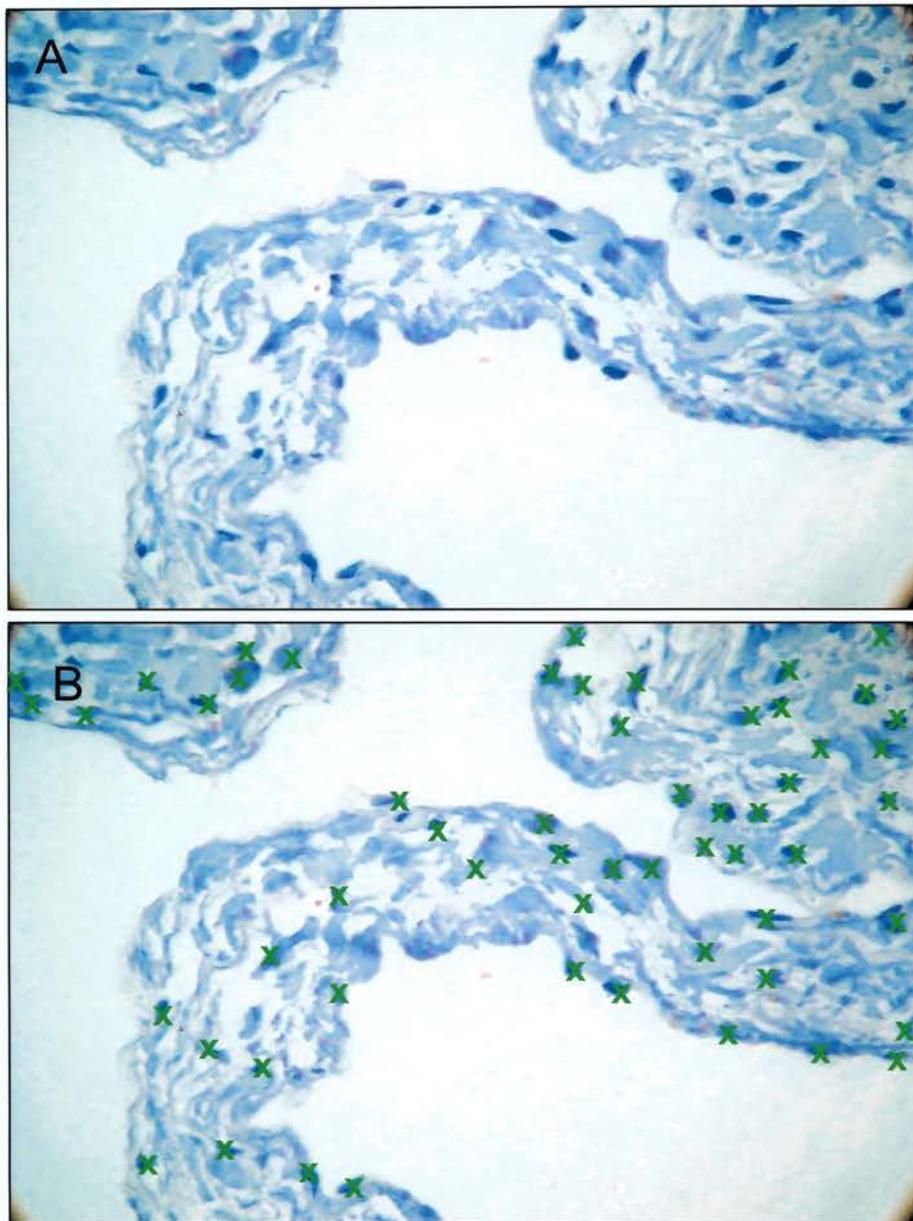
**FIGURA 20.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para FAS-L (aumento original, 400x).



**FIGURA 21.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica para Caspase-3 (aumento original, 400x).

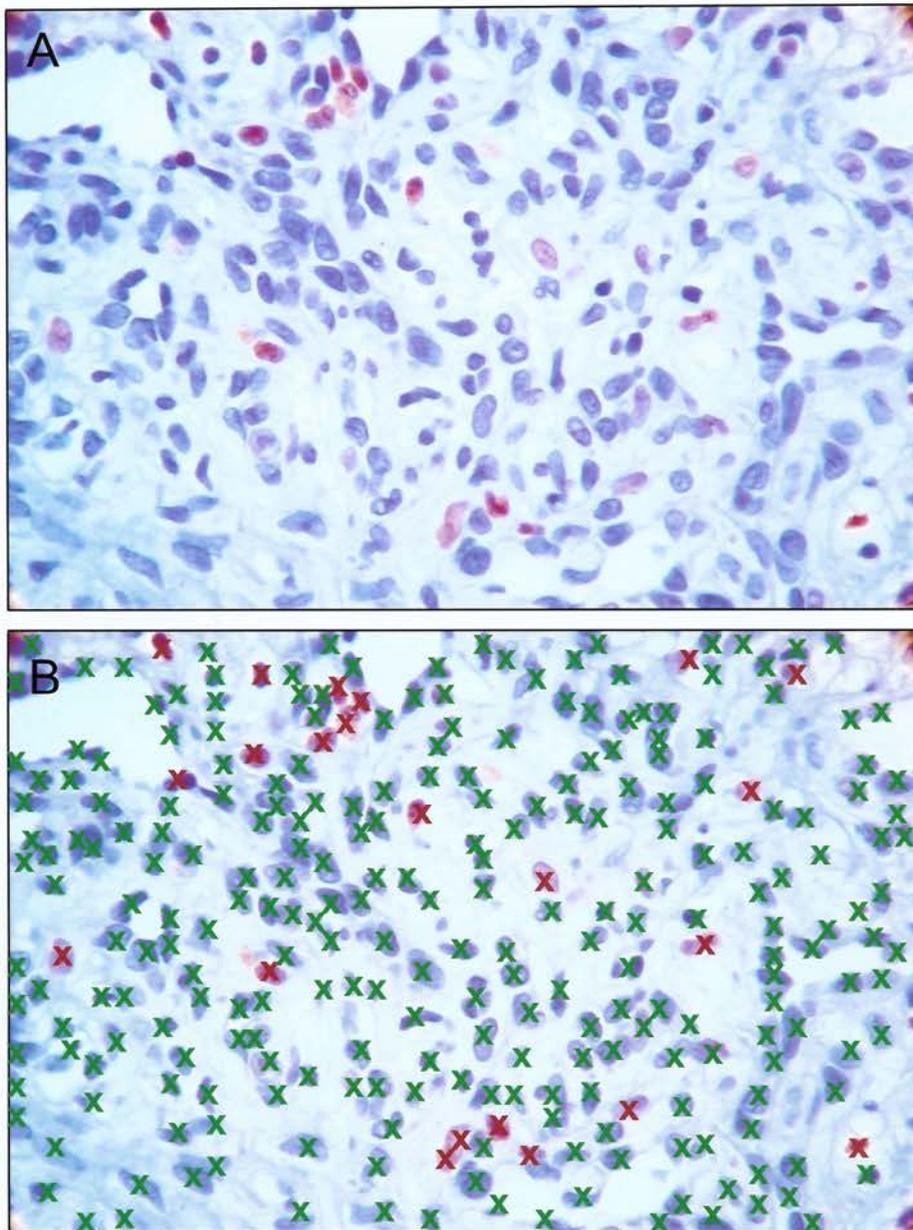


**FIGURA 22.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica para Caspase-3 (aumento original, 400x).



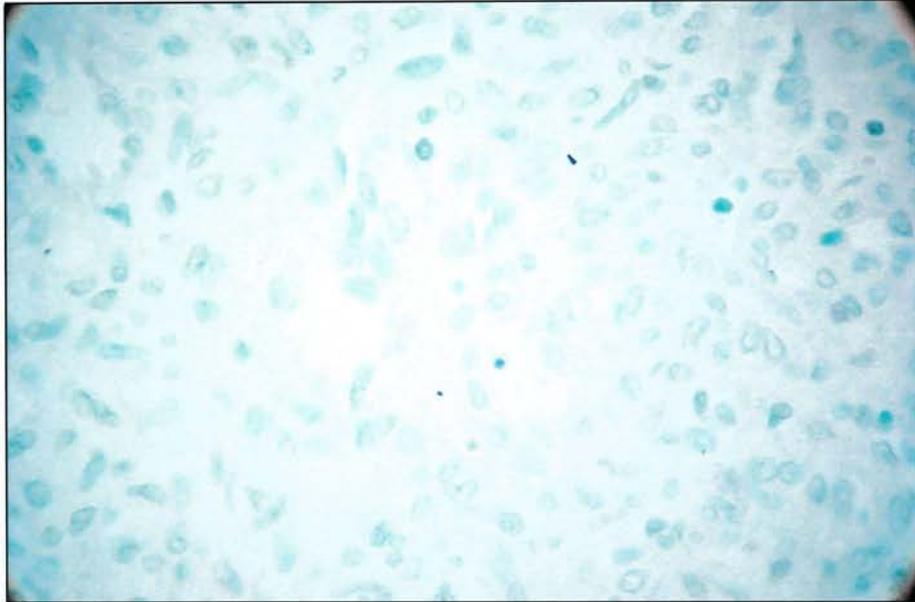
**FIGURA 23.** Má-formação Vascular. Fotomicrografia mostrando resultado da reação imunoistoquímica para Ki-67 (aumento original, 400x).

- A. Reação negativa.
- B. Contagem das células negativas.

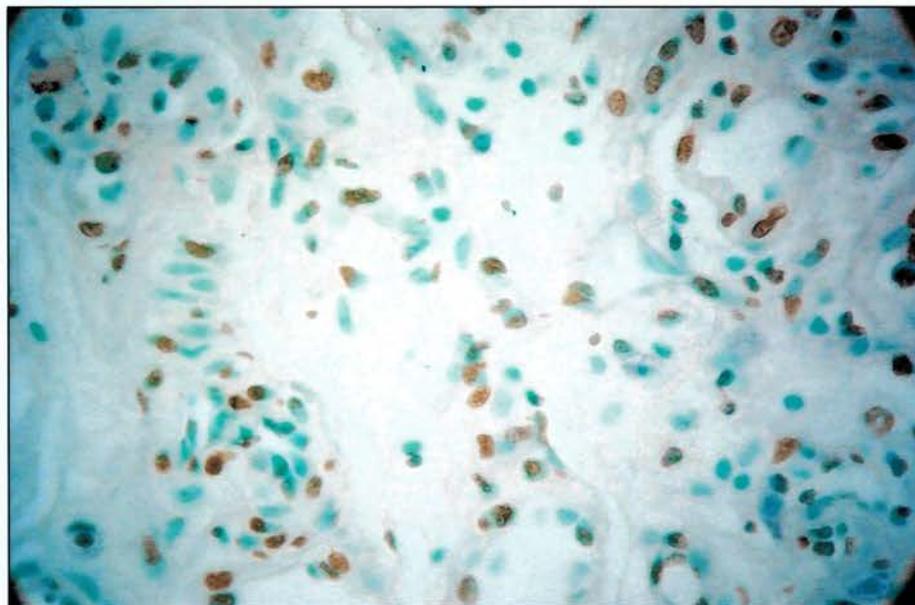


**FIGURA 24.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado da reação imunoistoquímica para Ki-67 (aumento original, 400x).

- A. Reação com positividade.
- B. Contagem das células positivas e negativas.



**FIGURA 25.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado negativo da reação imunoistoquímica de TUNEL (aumento original, 400x).



**FIGURA 26.** Hemangioma Proliferativo. Fotomicrografia mostrando resultado positivo da reação imunoistoquímica de TUNEL (aumento original, 400x).

### 3.3 VARIÁVEIS DO ESTUDO

#### A. Informações do paciente

Coletaram-se informações gerais do paciente como idade, gênero, grupo étnico, data de nascimento, data de admissão para tratamento no Hospital do Câncer.

#### B. História clínica

- Idade do paciente ao aparecimento da lesão. Consideramos as faixas etárias para o aparecimento dos primeiros indícios da lesão (ao nascimento e durante o primeiro mês de vida, após o primeiro mês de vida);
- Progressão da lesão: inalterada (quando não foi observada alteração da lesão), progressão rápida (seguindo ao aparecimento da lesão), lenta ou tardia (quando houve um intervalo de tempo entre o aparecimento da lesão e sua alteração).

#### C. Exame loco-regional

- Tamanho da lesão: até 5 cm e maior que 5 cm;
- Profundidade da lesão: superficial (comprometendo pele e mucosas) e profunda (subcutâneo e outras estruturas mais profundas);
- Ferimentos e sangramento: não ou sim.

- D. Tratamento sistêmico:** não-realizado e realizado.
- E. Tempo de tratamento sistêmico:** tempo total de duração do tratamento sistêmico (em dias) com corticóide e/ou interferon alfa.
- F. Cirurgia:** data do procedimento, idade do paciente e número do exame anatomo-patológico. Para algumas análises estatísticas, a faixa etária por ocasião da cirurgia foi considerada de acordo com as fases de evolução dos hemangiomas proliferativos: até 12 meses, 13 a 60 meses e acima de 60 meses (TAKAHASHI et al. 1994).

### **3.3.1 Classificação Clínica**

Considerou-se o diagnóstico clínico estabelecido durante o tratamento do paciente, de acordo com a classificação clínica de Curado: hemangioma plano, hemangioma fragiforme, hemangioma tuberoso, hemangioma cavernoso, linfangioma e hemangiolinfangioma (CURADO 1992).

### **3.3.2 Classificação Biológica**

O diagnóstico biológico, segundo a classificação biológica de MULLIKEN e GLOWACKI (1982), foi estabelecido pela correlação com a classificação clínica de Curado: má-formação vascular e hemangioma proliferativo.

### 3.3.3 Tratamento sistêmico

O tratamento sistêmico foi recomendado para os pacientes portadores de hemangiomas proliferativos com características alarmantes, definidos como lesões cujas características comprometem funções fisiológicas e/ou ameaçam a vida do pacientes (ENJOLRAS et al. 1990). Esta variável foi coletada como: não-tratado e tratado, em dias de tratamento com corticóide e/ou com interferon alfa, com o seguinte protocolo:

- Corticóide: prednisona oral, na dose de 4 mg por quilograma de peso corpóreo por dia, durante quatro semanas, seguido de um período de 25% de redução semanal, com término após um total de 8 a 10 semanas de tratamento,
- Interferon alfa: interferon alfa subcutâneo, na dose de 3 milhões de unidades por metro quadrado de superfície corpórea por dia.

Vale destacar que, neste estudo, não foram analisados aspectos mais detalhados sobre o tratamento sistêmico.

### 3.3.4 Reação imunoistoquímica

- **GLUT1, VEGF, NOS3, p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, FAS, FAS-L e caspase-3**

Para os marcadores GLUT1, VEGF, NOS3, p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, FAS, FAS-L e caspase-3, inicialmente a resposta foi considerada conforme os Quadros 5 e 6. Para a descrição dos resultados e para o estudo da associação entre os marcadores, faixa etária e tratamento sistêmico prévio optou-se por considerar os grupos: negativo, até 10% de positividade,

e positivo, mais que 10% de células positivas para o marcador. Os casos positivos foram então classificados quanto a intensidade fraca ou forte, de acordo com os controles positivo. Os casos não avaliáveis foram excluídos da análise da associação entre as variáveis.

- **Ki-67**

Considerou-se, para cada caso, a porcentagem de células positivas para o Ki-67. Para o estudo da associação com o tipo de anomalia vascular: má-formação vascular e hemangioma proliferativo, considerou-se a média da porcentagem para cada grupo e as faixas de positividade para o Ki-67: até 1,0% e acima de 1,0%.

- **TUNEL**

Considerou-se, para cada caso, a porcentagem de células positivas para a apoptose (técnica de TUNEL). Para o estudo da associação entre a apoptose e o tratamento sistêmico prévio, considerou-se a média de porcentagem de positividade para cada grupo.

### **3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa de computador SPSS (*Statistical Package for Social Science*), versão 10.1.

### **3.4.1 Análise descritiva**

Para descrição da casuística utilizou-se frequência - média, mediana e desvio padrão.

### **3.4.2 Análise da associação das frequências entre as variáveis**

Ao analisar a associação entre o tipo de anomalia vascular, realização de tratamento e as demais variáveis, utilizou-se o teste do qui-quadrado. Sempre que necessário, para frequências menores que cinco ou de pequeno tamanho da amostra analisada, o teste de qui-quadrado foi substituído pelo teste exato de Fisher.

Em todas as análises, os valores exatos do “p” foram obtidos a partir da distribuição do qui-quadrado, quando aplicável, excluindo os casos da categoria “ignorada” ou “não avaliável” de cada variável estudada. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

### **3.4.3 Comparação das médias**

Na comparação de médias foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

## **3.5 QUESTÕES ÉTICAS**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo sob o número 613/04. Por tratar-se de um trabalho retrospectivo, não foi elaborado um termo de consentimento.

## **4. RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS

Foram incluídos 262 pacientes com portadores de anomalias vasculares. A distribuição de acordo com a classificação foi: 13 (5,0%) pacientes com hemangiomas planos, 37 (14,1%) pacientes com hemangiomas fragiformes, 89 (34,0%) com hemangiomas tuberosos, 61 (23,3%) com hemangiomas cavernosos, 57 (21,7%) com linfangiomas e 5 (1,9%) com hemangiolinfangiomas. Os 262 pacientes foram reclassificados em: 126 pacientes (48,1%) com hemangiomas proliferativos e 136 (51,9%) com más-formações vasculares (Tabela 1).

**Tabela 1** - Número e porcentagem de pacientes segundo as classificações clínica e biológica.

<b>Tipo de Anomalia Vascular</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Hemangioma Fragiforme	37	14,1
Hemangioma Tuberoso	89	34,0
<b>Total de Hemangiomas Proliferativos</b>	<b>126</b>	<b>48,1</b>
Hemangioma Plano	13	5,0
Hemangioma Cavernoso	61	23,3
Linfangioma	57	21,7
Hemangiolinfangioma	5	1,9
<b>Total de Más-formações Vasculares</b>	<b>136</b>	<b>51,9</b>
<b>Total</b>	<b>262</b>	<b>100</b>

A idade na admissão variou entre 1 a 208 meses (média de 42,5 meses, com desvio padrão de 51,9 meses e mediana de 18,0 meses), 111 pacientes (42,4%) foram admitidos durante o primeiro ano de vida. Houve predominância de pacientes do sexo feminino (69,5%), em uma razão de 2,2 meninas para 1 menino. A maioria dos pacientes, 243 (92,7%), era da raça branca (Tabela 2).

**Tabela 2** - Número e porcentagem de pacientes segundo características demográficas.

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Idade na admissão</b>	≤ 1,0 ano	<b>111</b>	42,4
	1,1 - 5,0 anos	<b>82</b>	31,3
	> 5,0 anos	<b>69</b>	26,3
<b>Gênero</b>	Feminino	<b>182</b>	69,5
	Masculino	<b>80</b>	30,5
<b>Raça</b>	Branca	<b>243</b>	92,8
	Não branca	<b>9</b>	3,4
	Ignorada	<b>10</b>	3,8
<b>Total</b>		<b>262</b>	<b>100,0</b>

As lesões foram observadas ao nascimento ou durante o primeiro mês de vida em 203 pacientes (77,5%). O crescimento das lesões foi rápido, a partir da sua detecção, em 121 casos (46,2%). As complicações mais freqüentes foram: ferimento em 71 pacientes (27,1%) e sangramento em 64 (24,4%) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Número e porcentagem de pacientes segundo características clínicas.

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Idade ao aparecimento da lesão</b>	≤ 1 mês	<b>203</b>	77,5
	> 1 mês	<b>45</b>	17,2
	Ignorada	<b>14</b>	5,3
<b>Ritmo de crescimento da lesão</b>	Ausente	<b>20</b>	7,6
	Rápido	<b>121</b>	46,2
	Tardio / Progressivo	<b>103</b>	39,3
	Ignorado	<b>18</b>	6,9
<b>Ferimento</b>	Ausente	<b>172</b>	65,6
	Presente	<b>71</b>	27,1
	Ignorado	<b>19</b>	7,3
<b>Sangramento</b>	Ausente	<b>179</b>	68,3
	Presente	<b>64</b>	24,4
	Ignorado	<b>19</b>	7,3
<b>Tamanho das lesões</b>	≤ 5,0 cm	<b>123</b>	47,0
	> 5,0 cm	<b>107</b>	40,8
	Ignorada	<b>32</b>	12,2
<b>Profundidade das lesões</b>	Superficial	<b>34</b>	13,0
	Profunda	<b>69</b>	26,3
	Superficial/profunda	<b>143</b>	54,6
	Ignorada	<b>16</b>	6,1
<b>Topografia</b>	Segmento cefálico	<b>182</b>	69,5
	Tronco/Membros	<b>80</b>	30,5
<b>Total</b>		<b>262</b>	<b>100,0</b>

O tamanho das lesões, na admissão, foi maior que 5,0 cm em 107 pacientes (40,8%). O comprometimento superficial e profundo associado ocorreu em 143 casos (54,6%). A topografia das lesões foi segmento cefálico em 182 casos (69,5%), tronco e membros em 80 (30,5%) (Tabela 3).

A idade dos pacientes por ocasião da cirurgia variou de 1 a 310 meses, com média de 73,9 meses (desvio padrão de 55,1) e mediana de 57 meses.

## 4.2 REVISÃO DA MORFOLOGIA

O resultado da revisão da morfologia foi: 142 lesões (54,2%) com padrão má-formação, 100 (38,1%) com padrão proliferação, 19 (7,3%) com padrão fibrogorduroso e 1 (0,4%) com padrão fibrose (Tabela 4).

**Tabela 4** - Número e porcentagem de pacientes segundo a revisão da morfologia das anomalias vasculares.

<b>Morfologia</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Padrão má-formação</b>	<b>142</b>	<b>54,2</b>
<b>Padrão proliferação</b>	<b>100</b>	<b>38,1</b>
<b>Padrão fibrogorduroso</b>	<b>19</b>	<b>7,3</b>
<b>Fibrose</b>	<b>1</b>	<b>0,4</b>
<b>Total</b>	<b>262</b>	<b>100,0</b>

## 4.3 ESTUDO COM OS MARCADORES GLUT1 E KI-67 E ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O TIPO DE ANOMALIA VASCULAR E O PADRÃO MORFOLÓGICO

Encontrou-se imunorreatividade para GLUT1 em 101 (38,5%) casos (Tabela 5).

No estudo com o marcador Ki-67, o número de células contadas para cada caso variou de 92 a 2081, com média de 666,9 células (desvio padrão de 425,2 células) e mediana de 563,0 células. A positividade para o

marcador variou de 0 a 70,3%, com média de 2,7% (desvio padrão de 7,0%) e mediana de 0,8%.

**Tabela 5 - Resultado do marcador GLUT1.**

Variável	Categoria	Nº	%
GLUT 1	Negativo	159	60,7
	Positivo	101	38,5
	Não avaliável	2	0,8
<b>Total</b>		<b>262</b>	<b>100</b>

A comparação dos resultados mostrou que existe associação entre os marcadores GLUT-1 e Ki-67 ( $p < 0,001$ ). A maioria das lesões negativas para GLUT1 (68,6%) apresentou baixa porcentagem de proliferação, na faixa de zero a 1,0%, enquanto a maioria das lesões positivas para GLUT1 (71,3%) mostrou maior positividade para Ki-67, acima de 1,0% (Tabela 6).

**Tabela 6 - Associação entre os marcadores GLUT1 e Ki-67.**

Ki-67	GLUT1				Total	p*
	Negativo		Positivo			
	Nº	%	Nº	%		
≤ 1,0	109	68,6	29	28,7	138	< 0,001
> 1,0	50	31,4	72	71,3	122	
<b>Total</b>	<b>159</b>	<b>100,0</b>	<b>101</b>	<b>100,0</b>	<b>260</b>	

\* Nível descritivo do teste de associação pelo  $\chi^2$ , excluindo os casos não avaliáveis.

#### 4.3.1 Associação dos marcadores GLUT1 e Ki-67 e o tipo de anomalia vascular

A maioria das más-formações vasculares (99,3%) foi negativa para GLUT1. No grupo de hemangiomas proliferativos, a maioria dos casos (80,6%) foi positiva para o marcador. A associação entre a imunorreatividade para GLUT1 e o tipo de anomalia vascular foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7 - Associação entre tipo de anomalia vascular e o marcador GLUT1.**

GLUT1	Malformações Vasculares		Hemangiomas Proliferativos		Total	p*
	Nº	%	Nº	%		
Negativo	135	99,3	24	19,4	159	< 0,001
Positivo	1	0,7	100	80,6	101	
<b>Total</b>	<b>136</b>	100,0	<b>124</b>	100,0	<b>260</b>	

\* Nível descritivo do teste de associação pelo  $\chi^2$ , excluindo os casos não avaliáveis.

O teste de comparação entre as médias de positividade para o Ki-67 mostrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de anomalias vasculares (teste de Mann-Whitney:  $p < 0,001$ ). O grupo de má-formação teve média de 1,94% enquanto os hemangiomas proliferativos, 3,60%.

No estudo com o marcador Ki-67, por faixa de positividade, foi observado que a maioria dos casos (69,9%) de má-formação vascular apresentou positividade na faixa de zero a 1,0%. Para os hemangiomas proliferativos, concentrou-se um maior número de casos (64,3%) na faixa de

positividade acima de 1,0%. A associação entre a faixa de porcentagem de positividade para Ki-67 e o tipo de anomalia vascular foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8** - Associação entre Ki-67 e tipo de anomalia vascular.

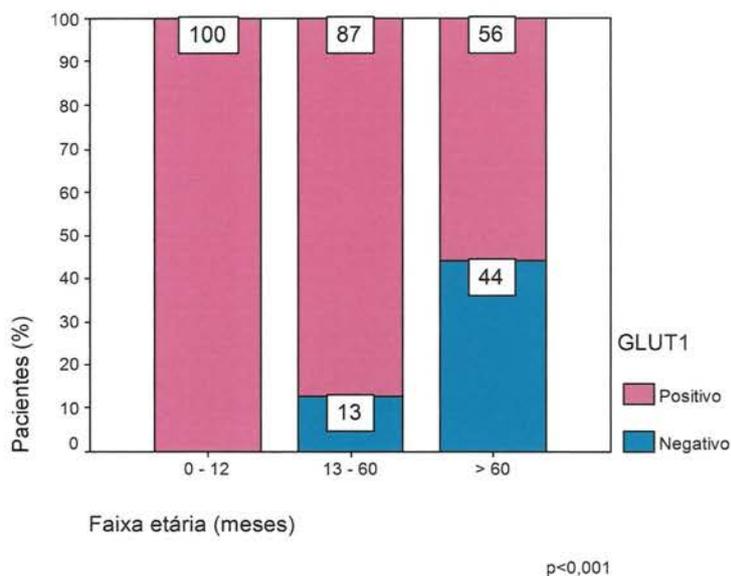
Ki-67	Malformações Vasculares		Hemangiomas Proliferativos		Total	p*
	Nº	%	Nº	%		
≤ 1,0%	95	69,9	45	35,7	140	< 0,001
> 1,0%	41	30,1	81	64,3	122	
<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>100,0</b>	<b>126</b>	<b>100,0</b>	<b>262</b>	

\* Nível descritivo do teste de associação pelo  $\chi^2$ .

#### 4.3.2 Estudo com os marcadores GLUT1 e Ki-67 nos hemangiomas proliferativos

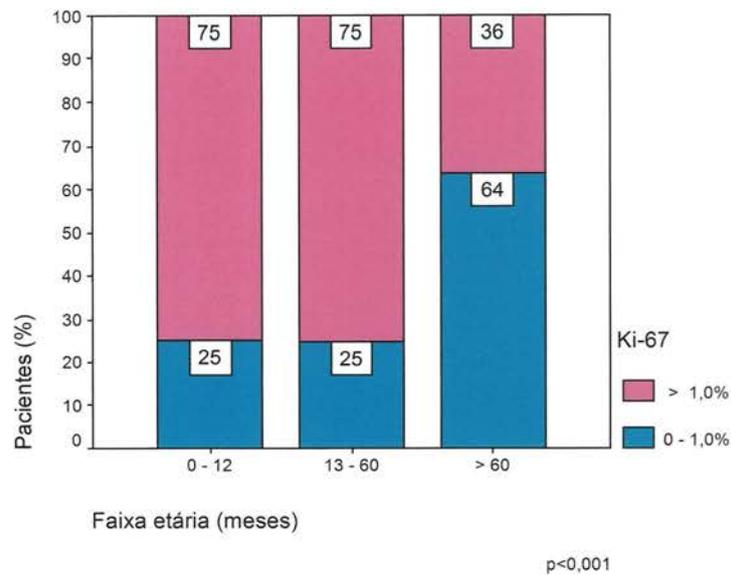
A distribuição da imunorreatividade para GLUT1 nos hemangiomas proliferativos, segundo a faixa etária, pode ser vista na Figura 27.

Todos os casos de hemangiomas proliferativos operados entre zero e 12 meses foram positivos para o marcador GLUT1. A maioria dos casos operados entre 13 e 60 meses foi positiva, mas apenas metade dos casos operados acima dos 60 meses foi positiva para o marcador ( $p < 0,001$ ).



**Figura 27** - Porcentagem de pacientes com hemangioma proliferativo, segundo GLUT1, por faixa etária.

Também nos hemangiomas proliferativos, a distribuição dos resultados do Ki-67, nas diferentes faixas etárias, mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Figura 28). Verificou-se que, nestas lesões, a porcentagem de casos na faixa acima de 1,0% de positividade para Ki-67 decresceu na fase de resolução (acima de 60 meses).



**Figura 28** - Porcentagem de pacientes com hemangioma proliferativo, segundo a faixa de positividade para Ki-67, por faixa etária.

#### 4.3.3 Associação entre tipo de anomalia vascular, padrão morfológico e GLUT1

A distribuição dos casos com diagnóstico clínico/biológico de má-formação vascular e hemangioma proliferativo, segundo o padrão morfológico e o marcador GLUT1 pode ser vista na Tabela 9.

Dos 136 casos diagnosticados clinicamente como má-formação vascular, de acordo com a classificação biológica, 122 foram classificados como padrão morfológico de má-formação, sendo apenas 1 positivo para GLUT1. Ainda dentro do grupo de má-formação vascular, 13 casos foram classificados como padrão morfológico de proliferação, todos negativos para GLUT1; um único caso foi classificado como padrão de fibrose, também negativo para GLUT1.

Dos 126 casos diagnosticados clinicamente como hemangiomas proliferativos, conforme a classificação biológica, 20 casos foram classificados como padrão morfológico de má-formação, 13 negativos e 7 positivos para GLUT1. Ainda dentro do grupo de hemangiomas proliferativos, 87 foram selecionados como padrão morfológico de proliferação, sendo apenas 1 caso negativo para GLUT1; 19 casos foram classificados como padrão fibrogorduroso, 12 negativos e 7 positivos para o marcador.

**Tabela 9** - Número e porcentagem de pacientes segundo a classificação clínica, padrão morfológico e o marcador GLUT1.

Classificação Clínica	Revisão Morfológica	GLUT					
		Total		Negativo		Positivo	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Má-formação Vascular	Má-formação	122	89,7	121	89,7	1	100,0
	Proliferação	13	9,6	13	9,6	0	-
	Fibrogorduroso	0	-	0	-	0	-
	Fibrose	1	0,7	1	0,7	0	-
	<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>100,0</b>	<b>135</b>	<b>100,0</b>	<b>1</b>	<b>100,0</b>
Hemangioma Proliferativo	Má-formação	20	15,9	13	50,0	7	7,0
	Proliferação	87	69,0	1	3,8	86	86,0
	Fibrogorduroso	19	15,1	12	46,2	7	7,0
	Fibrose	0	-	0	-	0	-
	<b>Total</b>	<b>126</b>	<b>100,0</b>	<b>26</b>	<b>100,0</b>	<b>100</b>	<b>100,0</b>
<b>Total</b>		<b>262</b>		<b>161</b>		<b>101</b>	

## 4.4 ESTUDO COM OS MARCADORES DE ANGIOGÊNESE E DE APOPTOSE NOS HEMANGIOMAS PROLIFERATIVOS

### 4.4.1 Características demográficas e clínicas

Para o estudo dos marcadores VEGF, NOS3, p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, FAS, FAS-L e caspase-3 foram incluídos 118 pacientes com hemangiomas fragiformes e tuberosos, ambos hemangiomas proliferativos, de acordo com a classificação biológica.

A idade dos pacientes por ocasião da cirurgia variou de 8 a 141 meses, com média de 49,8 (desvio padrão de 27,2) e mediana de 47,0 meses.

Encontrou-se uma maior proporção de pacientes do sexo feminino (razão de 5,9:1) e a maioria da raça branca (92,4%). Cerca de um terço dos pacientes (33,1%) recebeu tratamento sistêmico com corticóide e/ou interferon antes da cirurgia (Tabela 10).

O tratamento sistêmico foi recomendado para os pacientes com lesões alarmantes, segundo critérios já descritos na literatura (ENJOLHAS et al. 1990). O tempo total de tratamento sistêmico foi computado em dias, somando todo o tempo de tratamento com corticóide e/ou interferon alfa, e variou de 6 a 567 dias, com média de 127,9 dias (desvio padrão de 124,3 dias) e mediana de 82,5 dias.

**Tabela 10** - Número e porcentagem de pacientes segundo características demográficas.

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Gênero</b>	Feminino	<b>101</b>	85,6
	Masculino	<b>17</b>	14,4
<b>Raça</b>	Branca	<b>109</b>	92,4
	Não branca	<b>3</b>	2,5
	Ignorada	<b>6</b>	5,1
<b>Raça</b>	Branca	<b>109</b>	92,4
	Não branca	<b>3</b>	2,5
	Ignorada	<b>6</b>	5,1
<b>Diagnóstico Clínico</b>	Fragiforme	<b>37</b>	31,4
	Tuberoso	<b>81</b>	68,6
<b>Tratamento Sistêmico</b>	Não	<b>79</b>	66,9
	Sim	<b>39</b>	33,1
<b>Total</b>		<b>118</b>	<b>100,0</b>

#### **4.4.2 Estudo com os marcadores de angiogênese e de apoptose nos hemangiomas proliferativos**

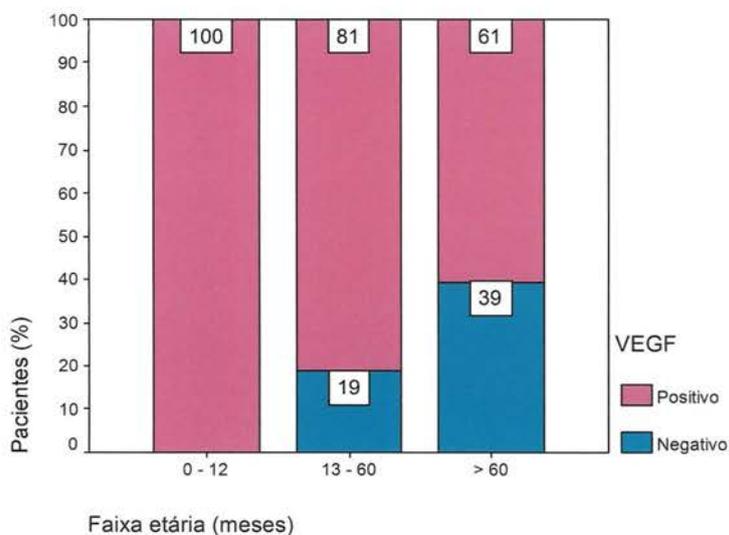
##### **4.4.2.1 VEGF**

Foi possível analisar a imunorreatividade ao VEGF em 117 casos, encontrando uma positividade fraca em 7 casos (5,9%) e forte em 82 casos (69,6%) (Tabela 11).

**Tabela 11 - Número e porcentagem de pacientes segundo VEGF.**

VEGF	Nº	%
Negativo	28	23,7
Positivo fraco	7	5,9
Positivo	82	69,6
Não avaliável	1	0,8
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

A distribuição do resultado de VEGF, de acordo com a faixa etária, mostrou positividade para o marcador em todas as fases de evolução dos hemangiomas proliferativos, com diferença estatisticamente significativa nas diferentes faixas etárias ( $p=0,026$ ) (Figura 29). Verificou-se que o aumento da faixa etária reduz a positividade para VEGF.



$p=0,026$

**Figura 29 - Porcentagem de pacientes segundo VEGF, por faixa etária.**

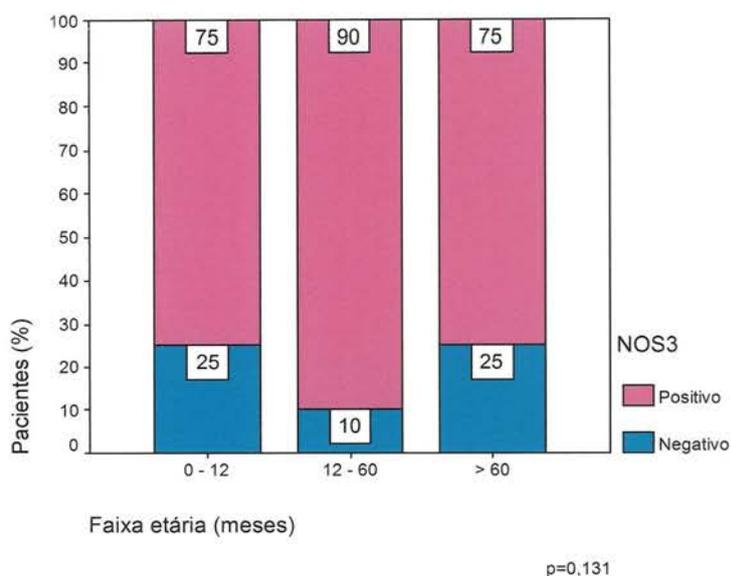
#### 4.4.2.2 NOS3

Foi possível analisar a imunorreatividade ao NOS3 em 115 casos, encontrando uma positividade fraca em 34 casos (28,8%) e forte em 64 casos (54,3%) (Tabela 12).

**Tabela 12 - Número e porcentagem de pacientes segundo NOS3.**

<b>NOS3</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	<b>17</b>	<b>14,4</b>
<b>Positivo fraco</b>	<b>34</b>	<b>28,8</b>
<b>Positivo</b>	<b>64</b>	<b>54,3</b>
<b>Não avaliável</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

A distribuição do resultado do NOS3, segundo a faixa etária, mostrou positividade para o marcador em todas as fases de evolução dos hemangiomas proliferativos, sem diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias ( $p=0,131$ ) (Figura 30).



**Figura 30** - Porcentagem de pacientes segundo NOS3, por faixa etária.

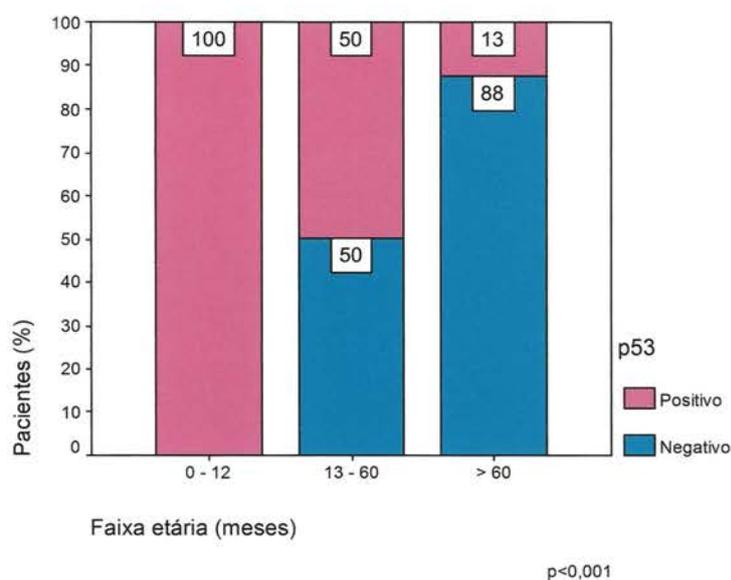
#### 4.4.2.3 p53

Foi possível analisar a imunorreatividade ao p53 em 112 casos, encontrando positividade forte em 46 (39,0%) (Tabela 13).

**Tabela 13** - Número e porcentagem de pacientes segundo p53.

p53	Nº	%
<b>Negativo</b>	<b>66</b>	<b>55,9</b>
<b>Positivo</b>	<b>46</b>	<b>39,0</b>
<b>Não avaliável</b>	<b>6</b>	<b>5,1</b>
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

A distribuição do resultado de p53, levando-se em conta a faixa etária, mostrou positividade para o marcador em todas as fases de evolução dos hemangiomas proliferativos, com diferença estatisticamente significativa nas várias faixas etárias ( $p < 0,001$ ) (Figura 31). Verificou-se que o aumento da faixa etária reduz a positividade para p53.



**Figura 31** - Número de pacientes segundo p53, por faixa etária.

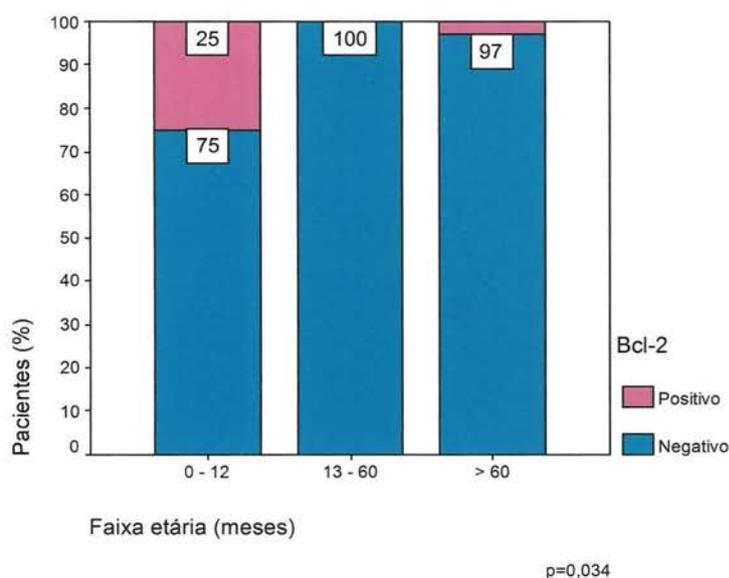
#### 4.4.2.4 Bcl-2

Foi possível analisar a imunorreatividade ao Bcl-2 em 117 casos, a maioria negativa, encontrando positividade fraca em apenas 2 casos (1,7 %) (Tabela 14).

**Tabela 14 - Número e porcentagem de pacientes segundo Bcl-2.**

Bcl-2	Nº	%
Negativo	115	97,5
Positivo fraco	2	1,7
Positivo	0	-
Não avaliável	1	0,8
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

A distribuição do resultado de Bcl-2, conforme a faixa etária, mostrou 25% de positividade na faixa etária de zero a 12 meses e 3% na faixa acima de 60 meses, com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,034$ ) (Figura 32).

**Figura 32 - Número de pacientes segundo Bcl-2, por faixa etária.**

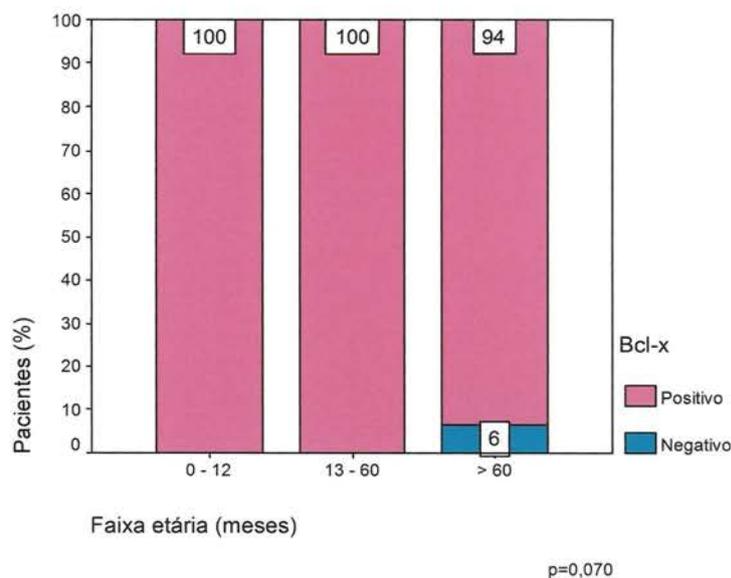
#### 4.4.2.5 Bcl-X

Foi possível analisar a imunorreatividade ao Bcl-X em 114 casos, encontrando positividade fraca em 22 (18,6%) e forte em 90 casos (76,3%) (Tabela 15).

**Tabela 15** - Número e porcentagem de pacientes segundo Bcl-X.

Bcl-X	Nº	%
Negativo	2	1,7
Positivo fraco	22	18,6
Positivo	90	76,3
Não avaliável	4	3,4
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

A distribuição do resultado de Bcl-X, segundo a faixa etária, mostrou positividade para o marcador em todas as fases de evolução dos hemangiomas proliferativos, sem diferença estatisticamente significativa entre as diferentes faixas etárias ( $p=0,070$ ) (Figura 33).



**Figura 33** - Número de pacientes segundo Bcl-X, por faixa etária.

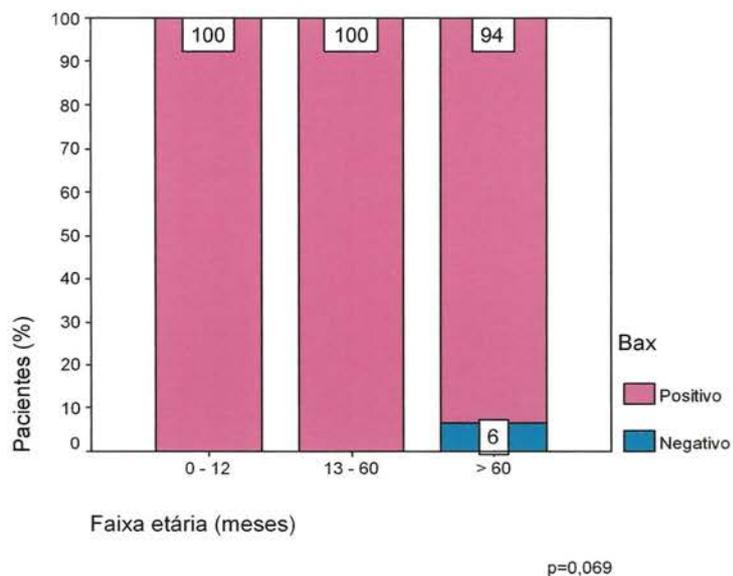
#### 4.4.2.6 Bax

Foi possível analisar a imunorreatividade a Bax em 115 casos, encontrando uma positividade forte em 106 casos (89,9%) e fraca em 7 casos (5,9%) (Tabela 16).

**Tabela 16** - Número e porcentagem de pacientes segundo Bax.

Bax	Nº	%
Negativo	2	1,7
Positivo fraco	7	5,9
Positivo	106	89,9
Não avaliável	3	2,5
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

A distribuição do resultado de Bax, considerando-se a faixa etária, mostrou positividade para o marcador em todas as fases de evolução dos hemangiomas proliferativos, sem diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias ( $p=0,069$ ) (Figura 34).



**Figura 34** - Número de pacientes segundo Bax, por faixa etária.

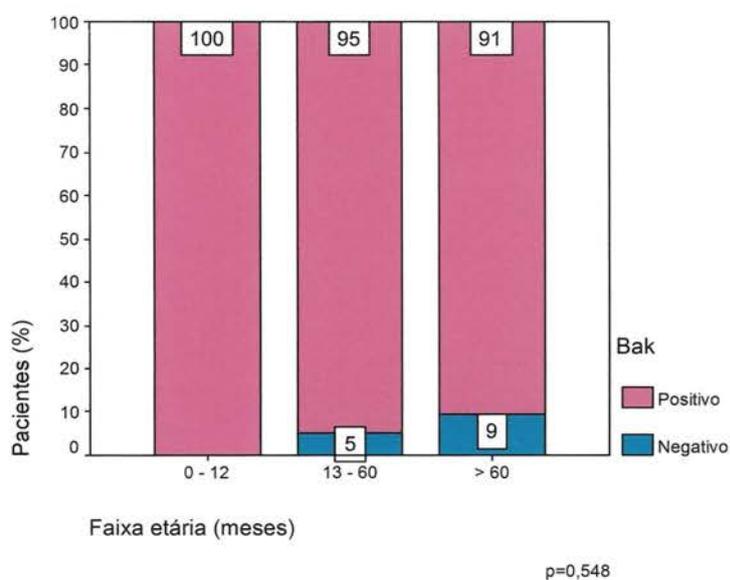
#### 4.4.2.7 Bak

Foi possível analisar a imunorreatividade ao Bak em 116 casos, encontrando positividade em 109 casos (92,4%) (Tabela 17).

**Tabela 17 - Número e porcentagem de pacientes segundo Bak.**

Bak	Nº	%
Negativo	7	5,9
Positivo fraco	0	-
Positivo	109	92,4
Não avaliável	2	1,7
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

A distribuição do resultado de Bak, segundo a faixa etária, mostrou positividade para o marcador em todas as fases de evolução dos hemangiomas proliferativos, sem diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias ( $p=0,548$ ) (Figura 35).

**Figura 35 - Número de pacientes segundo Bak, por faixa etária.**

#### 4.4.2.8 FAS

Foi possível analisar a imunorreatividade ao FAS nos 118 casos, encontrando imunorreatividade em 100,0% (Tabela 18).

**Tabela 18** - Número e porcentagem de pacientes segundo FAS.

FAS	Nº	%
Negativo	0	-
Positivo	118	100,0
Não avaliável	0	-
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

Todos os casos foram positivos para FAS, independente da faixa etária.

#### 4.4.2.9 FAS-L

Foi possível analisar a imunorreatividade ao FAS-L nos 118 casos, encontrando positividade focal em 100,0% (Tabela 19).

**Tabela 19** - Número e porcentagem de pacientes segundo FAS-L.

FAS-L	Nº	%
Negativo	0	-
Positivo focal	118	100,0
Não avaliável	0	-
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

Todos os casos foram positivos para FAS-L, independente da faixa etária.

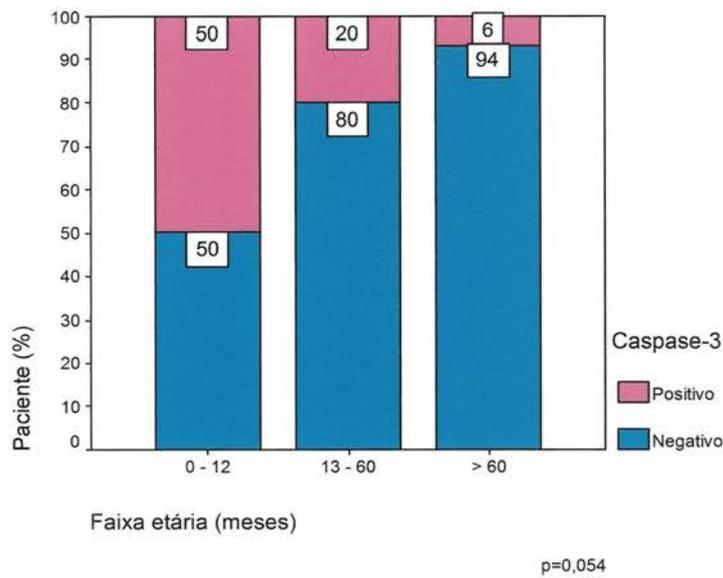
#### 4.4.2.10 Caspase-3

Foi possível analisar a imunorreatividade à caspase-3 em 115 casos, encontrando positividade fraca (focal) em 14 casos (11,9%) e forte em 6 casos (5,1%) (Tabela 20).

**Tabela 20** - Número e porcentagem de pacientes segundo caspase-3.

<b>Caspase-3</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	<b>95</b>	<b>80,5</b>
<b>Positivo fraco</b>	<b>14</b>	<b>11,9</b>
<b>Positivo</b>	<b>6</b>	<b>5,1</b>
<b>Não avaliável</b>	<b>3</b>	<b>2,5</b>
<b>Total</b>	<b>118</b>	<b>100,0</b>

A distribuição do resultado da caspase-3, segundo a faixa etária, mostrou positividade para o marcador em todas as fases de evolução dos hemangiomas proliferativos, porém sem diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias ( $p=0,054$ ) (Figura 36).



**Figura 36** - Número de pacientes segundo caspase 3, por faixa etária.

#### 4.4.3 Associação entre os marcadores de angiogênese e de apoptose e tratamento sistêmico prévio nos hemangiomas proliferativos

As Tabelas 21 e 22 mostram a associação entre tratamento sistêmico prévio e o resultado do estudo imunohistoquímico com os marcadores VEGF, NOS3, p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax, Bak, FAS, FAS-L e caspase-3.

**Tabela 21** - Associação entre tratamento prévio e os marcadores VEGF, NOS3, p53, Bcl-2, Bcl-X e Bax.

Variável	Categoria	Não Tratados		Tratados		Total	p*
		Nº	%	Nº	%		
VEGF	Negativo	21	26,9	7	17,9	28	<b>=0,201</b>
	Positivo	57	73,1	32	82,1	89	
	Total	78	100,0	39	100,0	117	
NOS3	Negativo	12	15,8	5	12,8	17	<b>= 0,450</b>
	Positivo	64	84,2	34	87,2	98	
	Total	76	100,0	39	100,0	115	
P53	Negativo	44	60,3	22	56,4	66	<b>= 0,422</b>
	Positivo	29	39,7	17	43,6	46	
	Total	73	100,0	39	100,0	112	
Bcl-2	Negativo	77	98,7	38	97,4	115	<b>= 0,557</b>
	Positivo	1	1,3	1	2,6	2	
	Total	78	100,0	39	100,0	117	
Bcl-X	Negativo	0	-	2	5,3	2	<b>= 0,109</b>
	Positivo	76	100,0	36	94,7	112	
	Total	76	100,0	38	100,0	114	
Bax	Negativo	2	2,6	0	-	2	<b>= 0,435</b>
	Positivo	74	97,4	39	100,0	113	
	Total	76	100,0	39	100,0	115	

\*Nível descritivo do teste de associação pelo  $\chi^2$ , excluindo os casos não avaliáveis.

**Tabela 22** - Associação entre tratamento prévio e os marcadores Bak, FAS, FAS-L e Caspase-3.

Variável	Categoria	Não Tratados		Tratados		Total	p*
		Nº	%	Nº	%		
<b>Bak</b>	Negativo	<b>4</b>	5,2	<b>3</b>	7,7	<b>7</b>	<b>= 0,436</b>
	Positivo	<b>73</b>	94,8	<b>36</b>	92,3	<b>109</b>	
	Total	<b>77</b>	100,0	<b>39</b>	100,0	<b>116</b>	
<b>FAS</b>	Negativo	<b>0</b>	-	<b>0</b>	-	<b>0</b>	<b>-</b>
	Positivo	<b>79</b>	100,0	<b>39</b>	100,0	<b>118</b>	
	Total	<b>79</b>	100,0	<b>39</b>	100,0	<b>118</b>	
<b>FAS-L</b>	Negativo	<b>0</b>	-	<b>0</b>	-	<b>0</b>	<b>-</b>
	Positivo	<b>79</b>	100,0	<b>39</b>	100,0	<b>118</b>	
	Total	<b>79</b>	100,0	<b>39</b>	100,0	<b>118</b>	
<b>Caspase-3</b>	Negativo	<b>61</b>	80,3	<b>34</b>	87,2	<b>95</b>	<b>= 0,256</b>
	Positivo	<b>15</b>	19,7	<b>5</b>	12,8	<b>20</b>	
	Total	<b>76</b>	100,0	<b>39</b>	100,0	<b>115</b>	

\*Nível descritivo do teste de associação pelo  $\chi^2$ , excluindo os casos não avaliáveis.

Não houve diferenças estatisticamente significativas na imunorreatividade destes marcadores e a realização de tratamento prévio com drogas sistêmicas para nenhum dos marcadores.

## **4.5 ESTUDO DA APOPTOSE, COM A TÉCNICA DE TUNEL, NOS HEMANGIOMAS PROLIFERATIVOS**

### **4.5.1 Características demográficas e clínicas**

Neste grupo de 36 pacientes que fizeram o TUNEL, houve um predomínio de pacientes do sexo feminino (11 meninas para 1 menino) e também prevaleceu a raça branca (94,4%). Quanto ao diagnóstico clínico, 12 pacientes (33,3%) eram portadores de hemangiomas fragiformes e 24 (66,7%) de hemangiomas tuberosos. Na revisão morfológica, 2 espécimes (5,6%) foram classificados como padrão má-formação, 32 (88,8%) como padrão proliferação e 2 (5,6%) como padrão fibrogorduroso. A topografia das lesões foi segmento cefálico em 33 casos (91,6%), tronco e membros em 3 (8,4%) (Tabela 23).

A idade dos pacientes por ocasião da cirurgia variou de 8 a 67 meses, com média de 27,9 meses (desvio padrão de 16,0) e mediana de 24,0 meses.

Esta etapa do estudo incluiu 22 (61,1%) pacientes não tratados e 14 (38,9%) pacientes tratados previamente com corticóide e/ou interferon. O tempo total de tratamento sistêmico variou de 23 a 298 dias, com média de 107,3 dias (desvio padrão de 83,5 dias) e mediana de 77,0 dias.

**Tabela 23** - Número e porcentagem de pacientes segundo características demográficas.

Variável	Categoria	Nº	%
<b>Gênero</b>	Feminino	3	91,7
	Masculino	33	8,3
<b>Raça</b>	Branca	34	94,4
	Ignorada	2	5,6
<b>Diagnóstico Clínico</b>	Fragiforme	12	33,3
	Tuberoso	24	66,7
<b>Revisão morfológica</b>	Padrão má-formação	2	5,6
	Padrão proliferação	32	88,8
	Padrão fibrogorduroso	2	5,6
<b>Topografia</b>	Segmento cefálico	33	91,6
	Tronco/ Membros	3	8,4
<b>Tratamento Sistêmico</b>	Não	22	61,1
	Sim	14	38,9
<b>Total</b>		<b>36</b>	<b>100,0</b>

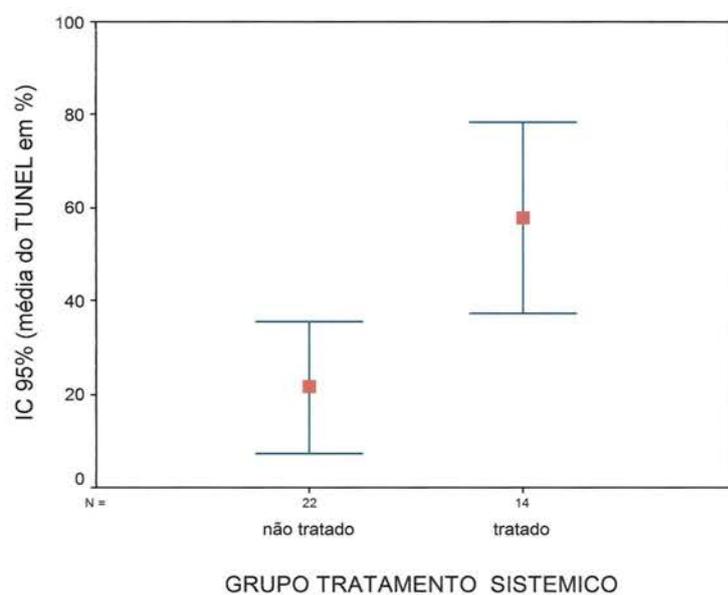
#### 4.5.2 Estudo da apoptose, com a técnica de TUNEL

O número de células contadas para cada caso variou de zero a 500. A porcentagem de células em apoptose variou de zero a 97,0%, com média de 35,5% (desvio padrão de 37,5%) e mediana de 9,1%.

#### 4.5.3 Associação da apoptose, técnica de TUNEL, e tratamento sistêmico prévio nos hemangiomas proliferativos

Encontrou-se uma média de células em apoptose de 21,5%, no grupo de pacientes não tratados e de 57,7% no grupo de pacientes tratados.

Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias, como se pode ver na Figura 37,  $p(\text{Mann-Whitney})=0,004$ .



**Figura 37** - Médias de porcentagem de apoptose e respectivos intervalos de 95% de confiança.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

As anomalias vasculares são os tumores mais freqüentes da infância. Apesar da grande freqüência, a patogênese destas lesões não está totalmente esclarecida. Apresentam diversidade clínica e, durante décadas, o diagnóstico baseado em dados de história e exame físico norteou a conduta terapêutica.

Em meados do século passado, as anomalias vasculares, quando tratadas, sofriam intervenções radicais, com radioterapia e cirurgia; mesmo para os casos operados, o padrão morfológico nem sempre possibilitava o esclarecimento exato do comportamento biológico e do prognóstico de cada caso.

A partir da publicação de LISTER, em 1938, demonstrando a regressão espontânea de algumas lesões, é que a comunidade científica passou a considerar a conduta expectante para os pacientes assintomáticos.

No Brasil, durante este período de poucos recursos diagnósticos, contava-se com a classificação clínica, que bem definia os diversos tipos de anomalias vasculares, orientando o diagnóstico, o prognóstico e a conduta terapêutica. Porém, a análise do resultado das terapêuticas disponíveis dependia de parâmetros clínicos, dificilmente mensuráveis. A profusão de modalidades terapêuticas descritas concorria para aumentar a dificuldade em estabelecer protocolos e comparar resultados.

Os primeiros estudos, constatando a atuação da corticoterapia nas anomalias vasculares, surgiram na década de sessenta e, ainda que houvesse questionamento sobre a efetividade da terapêutica, a corticoterapia se mantém como uma importante arma no tratamento dos hemangiomas alarmantes, até hoje.

O advento da biologia molecular e as pesquisas sobre a angiogênese, o conhecimento do equilíbrio entre proliferação e apoptose celular propiciaram um avanço no entendimento da patogênese de inúmeras doenças, fundamentais para o campo das anomalias vasculares.

Podemos dizer que a base para o conhecimento das anomalias vasculares se sustentou na distinção entre as lesões transitórias e as permanentes. A classificação clínica já reconhecia os hemangiomas fragiformes e tuberosos, como passíveis de regressão espontânea, diferentemente dos hemangiomas planos, cavernosos e dos linfangiomas, mais propensos à progressão lenta e gradual. Embora na prática clínica optássemos por estabelecer um diagnóstico inicial, havia a preocupação de sempre acompanhar cada caso, atenciosamente, não raro surpreendendo uma evolução inesperada.

No campo da terapêutica, a dificuldade de mensurar a atuação das drogas disponíveis provocou atraso na padronização das condutas. Os pacientes eram tratados de acordo com a especialidade da equipe prestadora do atendimento: os clínicos adotavam a conduta expectante, os cirurgiões optavam pela cirurgia, os radiologistas ampliavam as indicações da embolização e os radioterapeutas irradiavam, de tal forma que nem

sempre cada paciente recebia a melhor opção terapêutica para o tipo de lesão que portava.

Na década de oitenta, a classificação biológica propôs a divisão das anomalias vasculares em apenas dois grupos, hemangiomas e máscaras, com o objetivo de facilitar o diagnóstico e a distinção entre as lesões transitórias e as permanentes. Desde então, as publicações se sucederam, relatando lesões cujo comportamento não se enquadrava nos dois grupos biológicos propostos inicialmente (ZUKERBERG et al. 1993; BOON et al. 1996; REQUENA e SANGUEZA 1997; SARKAR et al. 1997; GARZON et al. 2000; ENJOLRAS et al. 2001; BERENQUER et al. 2003; LYONS et al. 2004; NORTH et al. 2004). Como consequência, a classificação biológica foi modificada e o grupo de lesões proliferativas foi denominado “tumores vasculares”, incluindo junto aos hemangiomas proliferativos, o *tufted hemangioma*, os hemangiomas congênitos entre outros (ENJOLRAS e MULLIKEN 1997).

Posteriormente, a formação das equipes multidisciplinares propiciou um aprimoramento nas condutas, buscando o reconhecimento precoce das complicações e a escolha da modalidade terapêutica mais apropriada para cada tipo de lesão. Paralelamente, os avanços na biologia molecular disponibilizaram recursos que agora permitem avaliar a resposta das anomalias vasculares ao tratamento com drogas, antes mensurada apenas com parâmetros clínicos (ZAREM e EDGERTON 1967; FOST e ESTERLY 1968; EDGERTON 1976; ENJOLRAS et al. 1990; EZEKOWITZ et al. 1992; CHEN et al. 2000).

Recentemente, com o advento do marcador GLUT1, proclamado como efetivo para diagnosticar os hemangiomas proliferativos, materializou-se a possibilidade de confirmar o diagnóstico das anomalias vasculares (NORTH et al. 2000).

Diante deste quadro, foi elaborado este projeto visando rever os casos de anomalias vasculares atendidos no Hospital do Câncer, centro de referência nacional para tratamento destas lesões e detentor de considerável casuística. Foram resgatados 262 casos de anomalias vasculares, submetidos a procedimento cirúrgico em um período de 14 anos.

## **5.1 REVISÃO MORFOLÓGICA, GLUT1 E KI-67**

A revisão das lâminas foi realizada e os casos foram classificados pela morfologia: padrão má-formação (54,2%), padrão proliferação (38,1%), padrão fibrogorduroso (7,3%) e padrão fibrose (0,4%).

Em seguida, foi realizado o estudo imunoistoquímico com os marcadores GLUT1 e Ki-67. Para todo o grupo de anomalias vasculares, encontramos positividade para GLUT1 em 38,5% e uma positividade média de 2,7% para Ki-67, com associação estatisticamente significativa entre estes marcadores ( $p < 0,001$ ), correlação não encontrada no estudo de NORTH et al. (2000).

O marcador GLUT1 confirmou tratar-se de um recurso fidedigno para o diagnóstico dos hemangiomas proliferativos, tal como NORTH et al. relataram em 2000. Encontramos positividade para GLUT1 na maioria dos

hemangiomas proliferativos: 100 casos (80,6%), em contraste com as más-formações vasculares, a quase totalidade dos casos negativos para o marcador ( $p < 0,001$ ).

Sob o ponto de vista do ciclo celular, as anomalias vasculares ou são estáveis, como as más-formações, ou evoluem com o ciclo celular acelerado, conforme a fase inicial dos hemangiomas proliferativos.

MULLIKEN et al. (1982), ao publicarem a proposta da classificação biológica das anomalias vasculares, mencionavam o ciclo celular acelerado nos hemangiomas proliferativos. Outros autores também encontraram expressão de Ki-67 na fase de progressão dos hemangiomas proliferativos (IWATA et al 1996; MANCINI e SMOLLER 1996; TAN et al. 2000). O presente estudo constatou uma diferença estatisticamente significativa na porcentagem média de células coradas pelo Ki-67 entre as anomalias vasculares. As más-formações vasculares se concentraram na faixa de positividade entre 0 e 1,0%, ou seja, com baixa proliferação celular, e a maioria dos hemangiomas proliferativos ficou na faixa de positividade acima de 1,0% ( $p < 0,001$ ).

Observou-se que todos os casos de hemangiomas proliferativos operados durante os primeiros 12 meses de vida, na fase proliferativa, foram positivos para GLUT1, com redução da positividade nas fases subseqüentes ( $p < 0,001$ ). Para NORTH et al. (2000), nos hemangiomas proliferativos, a positividade para GLUT1 persiste inalterada em todas as fases destas lesões.

Durante a leitura das lâminas, observou-se que, na fase de regressão, os focos de células endoteliais, identificados em meio ao tecido fibrogorduroso, persistiam positivos para GLUT1. A total ausência de imunorreatividade para o marcador GLUT1, nos casos operados mais tardiamente, refletiu a substituição das células endoteliais hemangiomas por tecido fibrogorduroso.

Nos hemangiomas proliferativos, analisou-se também a distribuição da positividade para Ki-67, segundo a faixa etária. Encontramos uma maior percentagem de pacientes (75,0%) na faixa de positividade acima de 1,0% para Ki-67 nas fases iniciais, seguida de redução de pacientes nesta faixa (36,0%) na fase de resolução da lesão, com diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias ( $p < 0,001$ ). TAN et al. (2000) e NORTH et al. (2000) encontraram redução progressiva da positividade para Ki-67 nas faixas etárias. Também MANCINI e SMOLLER (1996) relataram positividade para MIB1, marcador de proliferação, na fase inicial da lesão, seguida de decréscimo da positividade nas fases subseqüentes.

A inclusão do Ki-67 no nosso estudo tinha por objetivo atuar como uma contraprova que validasse a efetividade do marcador GLUT1 em distinguir os hemangiomas proliferativos. Porém, os resultados do marcador GLUT1 foram contundentes e dispensaram maiores considerações.

Procedeu-se à análise da correlação entre o diagnóstico inicial, que reflete a visão do clínico, a revisão da morfologia, mostrando a visão do patologista e a resposta ao GLUT1.

No grupo com 136 espécimes provenientes de pacientes diagnosticados clinicamente como hemangiomas planos, cavernosos, linfangiomas e hemangiolinfangiomas - má-formação vascular, encontramos 122 casos com padrão má-formação na morfologia, 121 destes com concordância total, tanto na morfologia como na imunorreatividade negativa para o GLUT1. Revendo as divergências, encontramos 1 caso diagnosticado clínica e morfológicamente como má-formação, porém positivo para GLUT1. A revisão dos dados clínicos deste caso revelou história progressiva de rápido desenvolvimento após o nascimento e regressão parcial até o momento da cirurgia, compatível com hemangioma proliferativo, configurando, portanto, um equívoco no diagnóstico clínico. Desde o início do acompanhamento do caso, havia incertezas quanto ao diagnóstico preciso e o GLUT1 foi fundamental para o esclarecimento definitivo. Outra divergência relevante dentro do grupo de má-formações foi o encontro de 13 casos com discordância por apresentar padrão morfológico proliferação, ainda que não imunorreativos para GLUT1. A revisão desses casos mostrou tratar-se de granulomas piogênicos (padrão proliferação) em pacientes portadores de má-formações, configurando uma associação freqüente e já descrita na literatura (REQUENA e SANGUEZA 1997). Atualmente, na classificação biológica modificada, os granulomas piogênicos foram incluídos, juntamente com os hemangiomas proliferativos, em um novo grupo mais abrangente, denominado como tumores vasculares (ENJOLRAS e MULLIKEN 1997).

No grupo com 126 espécimes provenientes de pacientes diagnosticados clinicamente como hemangiomas proliferativos, encontramos

87 com padrão proliferação, 86 destes com concordância total, tanto na revisão morfológica como na positividade para GLUT1. Revendo as divergências, encontramos 1 caso com padrão morfológico de proliferação, porém negativo para GLUT1. A morfologia de proliferação faz concluir que as células endoteliais são efetivamente negativas para o marcador, mostrando tratar-se de outro tipo de anomalia vascular com predomínio de capilares que se assemelham ao aspecto do hemangioma proliferativo, negativos para GLUT1, tal como o *tufted hemangioma*, descrita como lesão de comportamento incerto (JONES e ORKIN 1989; REQUENA e SANGUEZA 1997). Ainda como divergência, encontramos 20 hemangiomas proliferativos com padrão morfológico de má-formação. Destes, 13 foram negativos, enquanto 7 ainda mantinham positividade para GLUT1. Da mesma forma, encontramos 19 casos com padrão fibrogorduroso na morfologia, 12 já sem imunorreatividade para GLUT1 e 7 positivos para GLUT1. A reavaliação clínica destes hemangiomas com padrão morfológico de má-formação e fibrogorduroso, confirmou tratar-se de hemangiomas proliferativos em fase de regressão, já refletida no padrão morfológico, alguns casos ainda mantinham células endoteliais com imunorreatividade para GLUT1. Para estes casos, já com alteração do padrão inicial de proliferação, a análise exclusiva da morfologia poderia levar a um diagnóstico anatomopatológico equivocado de má-formação vascular.

A correlação entre diagnóstico clínico, morfologia e resposta ao GLUT1 mostrou a variedade de combinações com as quais podemos nos defrontar perante as anomalias vasculares. Ainda assim, concluímos que, na

maior parte dos casos, o diagnóstico estabelecido pela classificação clínica foi correto e corroborado pela revisão morfológica e pelo marcador GLUT1. No entanto, para alguns casos duvidosos, o GLUT1 foi decisivo para o esclarecimento do diagnóstico e deve ser realizado para casos com dados clínicos inconclusivos.

## **5.2 MARCADORES DE ANGIOGÊNESE E DE APOPTOSE**

Na segunda parte do presente estudo, optou-se por estudar moléculas envolvidas com o processo da angiogênese e da apoptose, visando buscar a participação destas na patogênese dos hemangiomas proliferativos.

O VEGF é um fator angiogênico que atua como potente indutor de mitose das células endoteliais (LEUNG et al 1989; COHEN 2002). Foi uma das primeiras moléculas descritas nos hemangiomas proliferativos (FOLKMAN e KLAGSBRUN 1987). O estudo dos hemangiomas proliferativos publicado por TAKAHASHI et al. (1994), com imunistoquímica, encontrou alta imunorreatividade para VEGF somente na fase proliferativa, ou seja, durante os primeiros 12 meses de vida. Da mesma forma, CHANG et al. (1999) obtiveram um pico de expressão de VEGF também na fase proliferativa. No presente estudo, diferentemente dos resultados mencionados, encontramos positividade para VEGF na maioria dos casos, distribuídos nas diferentes fases de evolução dos hemangiomas proliferativos, com diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias ( $p=0,026$ ). Todos os casos operados no primeiro ano de vida foram

positivos para o marcador, com redução desta porcentagem nas faixas etárias subsequentes.

O tratamento prévio com corticóide e interferon alfa não determinou diferença significativa na positividade para o marcador VEGF ( $p=0,201$ ). Da mesma forma, outra publicação, analisando apenas um caso, mostrou que o tratamento com triancinolona intralesional foi seguido de acelerada regressão, porém sem alteração da expressão de VEGF (HASAN et al. 2000).

A angiogênese é fundamental na manutenção dos processos fisiológicos. Além VEGF, o NO tem sido relacionado com este fenômeno (SHEN et al. 1998). KIMURA e ESUMI (2003) mostraram que o NO estimula a angiogênese atuando na expressão de VEGF.

Considerando a superexpressão de VEGF na patogênese dos hemangiomas proliferativos e as evidências da possível ação do NO mediando esta superexpressão, levantou-se a hipótese da participação do NO como indutor da superexpressão de VEGF na angiogênese observada durante a progressão destes hemangiomas (DULAK e JOZKOWICZ 2003). Até os dias de hoje não encontramos estudos relatando a participação do NO e da sua sintase, NOS3, na evolução dos hemangiomas proliferativos. O resultado do estudo de GHIGO et al. (1995) sugere a participação de NO, liberado por NOS3, na patogênese dos hemangiomas proliferativos.

O presente estudo encontrou positividade para NOS3 em 83,0% casos de hemangiomas proliferativos, independente da faixa etária ( $p=0,131$ ) ou

da realização tratamento sistêmico prévio ( $p=0,450$ ). Estes resultados indicam a participação de NOS3 na patogênese dos hemangiomas proliferativos, possivelmente liberando NO, este por sua vez mediando a superexpressão de VEGF, como foi sugerido por GHIGO et al (1995).

Quanto ao p53, já é bastante conhecida a sua atuação impedindo o desenvolvimento do câncer, promovendo a indução da apoptose (NARESH et al. 1997). Porém, nos hemangiomas proliferativos, a participação do p53 ainda não foi devidamente explorada. Apenas IWATA et al. 1996 não encontraram imunorreatividade para p53 em uma pequena série de 7 casos.

No trabalho que desenvolvemos, encontramos positividade para p53 em 39,0% dos hemangiomas proliferativos, sugerindo a participação desta molécula em pelo menos uma parte dos casos. Na análise da positividade por faixa etária observamos que todos os pacientes operados durante o primeiro ano de vida foram positivos para p53, metade dos pacientes operados durante a fase de involução (13 aos 60 meses) foram positivos para o marcador e apenas 13,0% dos pacientes operados após os 60 meses foram positivos para p53 ( $p<0,001$ ).

Estes resultados nos levaram a questionar se o acúmulo de p53 representa uma atuação deficiente desta molécula na fase inicial do desenvolvimento, favorecendo a proliferação endotelial peculiar destes hemangiomas.

No desenvolvimento dos hemangiomas proliferativos, vimos que a angiogênese pode ser mediada por VEGF e NO, ativado por NOS3. Este

trabalho encontrou positividade para as moléculas VEGF, NOS3 e p53 nos hemangiomas proliferativos. Então, de acordo com os relatos da literatura, por um lado podemos ter a presença do NO potencializando HIF1 na indução da superexpressão de VEGF e promovendo a angiogênese.

Sabemos que alguns autores tem ressaltado a atuação contraditória de NO, ora estimulando a angiogênese, ora induzindo a apoptose, na dependência da concentração liberada (KIMURA e ESUMI 2003). Este estudo encontrou, nos hemangiomas proliferativos, moléculas que podem ser indutoras tanto da angiogênese, como VEGF e NOS3, como da apoptose, como p53 e também NOS3, esta última sempre atuando na liberação de NO (NISHIO e WATANABE 1998; SHEN et al. 1998; KIMURA e ESUMI 2003). A manutenção da positividade de NOS3 durante as diferentes fases de evolução dos hemangiomas proliferativos não permitiu a correlação da molécula NO com a angiogênese da fase proliferativa bem como da apoptose crescente das fases de involução e resolução. No futuro, estudos mais aprofundados poderão esclarecer a devida participação destas moléculas na patogênese dos hemangiomas proliferativos, quer seja na proliferação exacerbada, quer na apoptose que se segue.

Na literatura, são inúmeros os relatos da participação de fatores relacionados com a apoptose na patogênese do câncer (NARESH et al. 1997; RODRIGUEZ-VILLANUEVA et al. 1998; BRUCKHEIMER et al. 2000). No que se refere aos hemangiomas, os dados sobre a apoptose são escassos.

Em um estudo realizado por RAZON et al. (1998), os resultados mostraram que, nos hemangiomas proliferativos, a apoptose se inicia por volta de um ano de idade e atinge o apogeu aos 2 anos.

HASAN et al. (2000) estudaram um paciente tratado com corticóide intralesional e verificaram, após o tratamento, aumento da expressão do gene citocromo b, participante da via mitocondrial da apoptose. Posteriormente, estes autores confirmaram o aumento desta molécula na fase de involução dos hemangiomas, tratados ou não (HASAN et al. 2001).

Ao procurar esclarecimentos sobre a participação da apoptose na regressão dos hemangiomas proliferativos e ao observar a escassez de relatos conclusivos na literatura, optamos por estudar as vias mitocondrial, receptor de morte e efetora da apoptose.

Para efeito deste estudo, privilegiamos pesquisar a imunorreatividade dos hemangiomas proliferativos aos marcadores Bcl-2 e Bcl-X, fatores inibidores da apoptose, Bax, Bak, FAS, FAS-L e caspase-3, fatores pró-apoptose.

Diferentemente do estudo de MANCINI e SMOLLER (1996), encontramos 25% de positividade para Bcl-2 apenas nos casos operados no primeiro ano de vida, o restante dos casos foi praticamente negativo para o marcador, com diferença estatisticamente significativa entre as faixas etárias ( $p=0,034$ ). Em princípio, esperávamos uma intensa atuação de Bcl-2 bloqueando a apoptose e favorecendo a sobrevivência das células endoteliais em intensa proliferação. Porém, a falta de imunorreatividade para o

marcador sugere que a progressão destes hemangiomas se dê mais por uma já demonstrada superexpressão de fatores angiogênicos.

Quanto ao Bcl-X, outra molécula inibidora da apoptose homóloga de Bcl-2, a superexpressão está relacionada com alguns tipos de câncer, como os carcinomas primários de cólon (KRAJEWSKA et al. 1996).

Nossa pesquisa observou também que a quase totalidade dos casos foi positiva para Bcl-X, tanto nas fases iniciais de evolução dos hemangiomas proliferativos como nas fases tardias. Não se pode concluir que houve a participação efetiva desta molécula inibindo a apoptose nas fases iniciais, tendo em vista a persistência da positividade do marcador nas fases de involução e regressão das lesões.

Quanto aos fatores pró-apoptose, encontramos positividade para Bax, Bak, FAS e FAS-L em praticamente todos os hemangiomas proliferativos, demonstrando a intensa atividade pró-apoptose, tanto pela via mitocondrial como pela via receptor de morte. Interessante não termos encontrado a mesma positividade para a caspase-3, representante da via efetora, presente em apenas 17% dos casos.

A positividade encontrada para os marcadores pró-apoptose em praticamente todo o grupo reflete a intensa participação destas moléculas nas diferentes fases dos hemangiomas proliferativos após o segundo semestre de vida.

Neste ponto da discussão, vale lembrar que, na presente casuística, não está representada a fase inicial de evolução dos hemangiomas

proliferativos, ou seja, os primeiros 6 meses. Portanto os resultados apresentados não refletem o período inicial de intensa proliferação celular. Contudo, podemos afirmar que durante a fase de desaceleração da progressão, no segundo semestre de vida, e durante as fases de involução e resolução, os hemangiomas proliferativos evoluem com positividade para todas as moléculas pró-apoptose das vias mitocondrial e receptor de morte incluídas neste estudo, quais sejam Bax, Bak, FAS e FAS-L. A associação entre a positividade destes marcadores com a faixa etária e com tratamento sistêmico prévio não encontrou diferença significativa, de tal forma que a imunorreatividade para estes marcadores independe da idade ou de tratamento prévio.

Com a intenção de quantificar a apoptose nos nossos casos incluiu-se na metodologia a técnica de TUNEL, empregada nas pesquisas científicas para detecção de células em apoptose (ANSARI et al. 1993; HOTZ et al. 1999).

Nas anomalias vasculares, HASAN et al. (2001), estudando 11 casos de hemangiomas, detectaram aumento na expressão do citocromo b nos hemangiomas em involução, porém não observaram diferença entre os tratados ou não. FRISCHER et al. (2004), compararam um espécime de hemangioma em proliferação com outro em involução e encontraram um número maior de células em apoptose na lesão em fase de involução, pela técnica de TUNEL.

Neste estudo analisamos a porcentagem de células em apoptose em 36 espécimes de hemangiomas proliferativos tratados e não tratados

previamente com corticóide e/ou interferon alfa. A associação entre apoptose e tratamento sistêmico prévio mostrou diferença estatisticamente significativa. Os pacientes não tratados tiveram uma média de células em apoptose de 21,5%, mais baixa do que os pacientes tratados, 57,7%. Concluiu-se que o tratamento sistêmico prévio, com corticóide e/ou interferon alfa, determinou uma maior porcentagem de células em apoptose, da mesma forma que SGONC et al. (1998) encontraram um índice de apoptose aumentado nas células endoteliais tratadas previamente com interferon alfa.

Portanto, durante décadas, a abordagem das anomalias vasculares foi norteadada exclusivamente pelas evidências clínicas. A observação dos hemangiomas proliferativos, a progressão inicial desenfreada e a resolução inexorável faziam supor que o desenvolvimento destas lesões fosse ocasionado por uma proliferação endotelial eficiente e intensa e que a resolução se desse por um processo não menos intenso e eficiente.

Os avanços na biologia molecular possibilitaram confirmar as diferenças entre os tipos de lesões e demonstrar que algumas, efetivamente, regredem, enquanto outras não, algumas respondem a drogas, outras não, reforçando a necessidade de uma abordagem terapêutica diferente para cada grupo.

Os resultados deste estudo confirmam a efetividade do marcador GLUT1 para o diagnóstico diferencial entre as lesões, a presença do fenômeno da apoptose na regressão dos hemangiomas proliferativos e,

finalmente, confirmam a atuação de drogas, como o corticóide e o interferon alfa, na aceleração da apoptose e na indução da regressão destas lesões.

Muitos pontos persistem sem esclarecimento, deixando aberto um campo de pesquisa a ser trilhado, especialmente para buscar os fatores que determinam os processos até então demonstrados.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6 CONCLUSÕES

- A. O estudo com os marcadores GLUT-1 e Ki-67 encontrou diferença entre os hemangiomas proliferativos e as máis-formações vasculares. O marcador GLUT1 foi expresso com alta frequência e confirmou-se fidedigno para o diagnóstico dos hemangiomas proliferativos.
- B. Nos hemangiomas proliferativos, as proteínas ligadas à angiogênese, VEGF e NOS3, e à apoptose Bcl-X, Bax, Bak, FAS e FAS-L foram expressas com alta frequência, corroborando a hipótese de que podem desempenhar um importante papel na patogênese destas lesões. Houve um acúmulo de p53 em um terço dos casos e apenas 17% dos casos foram positivos para a caspase-3, representante da via efetora da apoptose. Não encontramos expressão de Bcl-2, proteína inibidora da apoptose. O tratamento sistêmico prévio não determinou alteração na expressão dos marcadores de angiogênese e apoptose.
- C. Nos hemangiomas proliferativos, o tratamento sistêmico prévio com corticóide e/ou interferon alfa determinou um aumento na porcentagem de células em apoptose, justificando a melhora observada clinicamente.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science** 1998; 281:1322-6.

Amir J, Metzker A, Krikler R, Reisner SH. Strawberry hemangioma in preterm infants. **Pediatr Dermatol** 1986; 3:331-2.

Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labeling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. **J Pathol** 1993; 170:1-8.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. **Science** 1998; 281:1305-8.

Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. **Cell** 1985; 41:899-906.

Benjamin LE, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:8761-6.

Berenguer B, Mulliken JB, Enjolras O, et al. Rapidly involuting congenital hemangioma: clinical and histopathologic features. **Pediatr Dev Pathol** 2003; 6:495-510.

Biesecker LG, Happle R, Mulliken JB, Weksberg B, Graham JM, Viljoen DL, Cohen MM. Proteus Syndrome: diagnostic criteria, differential diagnosis, and patient evaluation. **Am J Med Genet** 1999; 84:389-95.

Boon LM, Enjolras O, Mulliken JB. Congenital hemangioma: evidence of accelerated involution. **J Pediatr** 1996; 128:329-35.

Bowers RE, Graham EA, Tomlinson KM. The natural history of the strawberry nevus. **Arch Dermatol** 1960; 82:667-80.

Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. **Development** 1992; 114:521-32.

Breugem CC, van der Horst CMAM, Hennekam RCM. Progress toward understanding vascular malformation. **Plast Reconstr Surg** 2000; 107:1509-23.

Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology** 1990; 17:489-503.

Bruckheimer EM, Cho SH, Sarkiss M, Herrmann J, McDonnell TJ. The Bcl-2 gene family and apoptosis. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 1998; 62:75-105.

Bruckheimer EM, Brisbay S, Johnson DJ, Gingrich JR, Greenberg N, McDonnell TJ. Bcl-2 accelerates multistep prostate carcinogenesis in vivo. **Oncogene** 2000; 19:5251-8.

Burton BK, Schulz CJ, Angle B, Burd LI. An increased incidence of haemangiomas in infants born following chorionic villus sampling (CVS). **Prenat Diagn** 1995; 15:209-14.

Campos HGA, Curado JH. Angiodisplasias. In: Maffei FHA, Lastória S, Yoshida WB, Rollo HA, editores. **Doenças vasculares periféricas**. Rio de Janeiro: MEDSI; 2002. p.1737-60.

Cattoretti G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D. P53 expression in breast cancer. **Int J Cancer** 1988; 41:178-83.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **J Pathol** 1992; 168:357-63.

Chang J, Most D, Bresnick S, et al. Proliferative hemangiomas: analysis of cytokine gene expression and angiogenesis. **Plast Reconstr Surg** 1999; 103:1-9.

Chen MT, Yeong EK, Horng SY. Intralesional corticosteroid therapy in proliferating head and neck hemangiomas: a review of 155 cases. **J Pediatr Surg** 2000; 35:420-3.

Cohen MM, Jr. Vasculogenesis, angiogenesis, hemangiomas, and vascular malformations. **Am J Med Genet** 2002; 108:265-74.

Curado JH. Tratamento dos hemangiomas e linfangiomas. In: Mélega JM, Zanini SA, Psillaks JM. editores. **Cirurgia plástica: reparadora e estética**. Rio de Janeiro: MEDSI; 1992. p.177-80.

Desbarats J, Duke RC, Newell MK. Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4+ T cells. **Nat Med** 1998; 4:1377-82.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature** 1992; 356:215-21.

Dulak J, Jozkowicz A. Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies. **Antioxid Redox Signal** 2003; 5:123-32.

Edgerton MT. The treatment of hemangiomas: with special reference to the role of steroid therapy. **Ann Surg** 1976; 183:517-32.

Edwards P, Cendan JC, Topping DB, et al. Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth in vitro, but stimulates tumorigenesis and experimental lung metastasis in vivo. **J Surg Res** 1996; 63:49-52.

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. **Annu Rev Cell Biol** 1991; 7:663-98.

Enjolras O, Riche MC, Merland JJ. Facial port-wine stains and Sturge-Weber syndrome. **Pediatrics** 1985; 76:48-51.

Enjolras O, Riche MC, Merland JJ, Escande JP. Management of alarming hemangiomas in infancy: a review of 25 cases. **Pediatrics** 1990; 85:491-8.

Enjolras O, Herbreteau D, Lemarchand F, et al. Hemangiomas and superficial vascular malformations: classification]. **J Mal Vasc** 1992; 17:2-19.

Enjolras O, Mulliken JB. Vascular tumors and vascular malformations (new issues). **Adv Dermatol** 1997; 13:375-423.

Enjolras O, Mulliken JB, Boon LM, Wassef M, Kozakewich HP, Burrows PE. Noninvoluting congenital hemangioma: a rare cutaneous vascular anomaly. **Plast Reconstr Surg** 2001; 107:1647-54.

Ezekowitz RA, Mulliken JB, Folkman J. Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy. **N Engl J Med** 1992; 326:1456-63.

Farrell CL, Yang J, Pardridge WM. GLUT-1 glucose transporter is present within apical and basolateral membranes of brain epithelial interfaces and in microvascular endothelia with and without tight junctions. **J Histochem Cytochem** 1992; 40:193-9.

Finn MC, Glowacki J, Mulliken JB. Congenital vascular lesions: clinical application of a new classification. **J Pediatr Surg** 1983; 18:894-900.

Folkman J. Tumor angiogenesis. **Adv Cancer Res** 1974; 19:331-58.

Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. **Int Rev Exp Pathol** 1976; 16:207-48.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. **Science** 1987; 235:442-7.

Fost NC, Esterly NB. Successful treatment of juvenile hemangiomas with prednisone. **J Pediatr** 1968; 72:351-7.

Frischer JS, Huang J, Serur A, Kadenhe A, Yamashiro DJ, Kandel JJ. Biomolecular markers and involution of hemangiomas. **J Pediatr Surg** 2004; 39:400-4.

Froehner SC, Davies A, Baldwin SA, Lienhard GE. The blood-nerve barrier is rich in glucose transporter. **J Neurocytol** 1988; 17:173-8.

Gallo O, Masini E, Morbidelli L, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:587-96.

Garzon MC, Enjolras O, Frieden IJ. Vascular tumors and vascular malformations: evidence for an association. **J Am Acad Dermatol** 2000; 42:275-9.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol** 1992; 119:493-501.

Ghigo D, Arese M, Todde R, et al. Middle T antigen-transformed endothelial cells exhibit an increased activity of nitric oxide synthase. **J Exp Med** 1995; 181:9-19.

Gorczyca W, Markiewski M, Kram A, Tuziak T, Domagala W. Immunohistochemical analysis of bcl-2 and p53 expression in breast carcinomas: their correlation with Ki-67 growth fraction. **Virchows Arch** 1995; 426:229-33.

Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Jr., Giaccia AJ. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. **Mol Cell Biol** 1994; 14:6264-77.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. **Science** 1998; 281:1309-12.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes Dev** 1999; 13:1899-911.

Guicciardi ME, Gores GJ. The death receptor family and extrinsic pathway. In: Yin X, Dong Z, editors. **Essentials of apoptosis: A guide for basic and clinical research**. Totowa: Human Press; 2003. p.67-84.

Harik SI, Kalaria RN, Andersson L, Lundahl P, Perry G. Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions. **J Neurosci** 1990; 10:3862-72.

Hasan Q, Tan ST, Gush J, Peters SG, Davis PF. Steroid therapy of a proliferating hemangioma: histochemical and molecular changes. **Pediatrics** 2000; 105:117-20.

Hasan Q, Tan ST, Gush J, Davis PF. Altered mitochondrial cytochrome b gene expression during the regression of hemangioma. **Plast Reconstr Surg** 2001; 108:1471-6.

Hecker M, Boese M, Schini-Kerth VB, Mulsch A, Busse R. Characterization of the stable L-arginine-derived relaxing factor released from cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells as an NG-hydroxyl-L-arginine-nitric oxide adduct. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1995; 92:4671-5.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature** 2000; 407:770-6.

Hitchcock CL. Ki-67 staining as a means to simplify analysis of tumor cell proliferation. **Am J Clin Pathol** 1991; 96:444-6.

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:6961-5.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. **Nucleic Acids Res** 1994; 22:3551-5.

Holmdahl K. Cutaneous hemangiomas in premature and mature infants. **Acta Paediatr** 1955; 44:370-9.

Hotz MA, Bosq J, Zbaeren P, et al. Spontaneous apoptosis and the expression of p53 and Bcl-2 family proteins in locally advanced head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1999; 125:417-22.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-anti-peroxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am J Clin Pathol** 1981; 75:734-8.

Iwata J, Sonobe H, Furihata M, Ido E, Ohtsuki Y. High frequency of apoptosis in infantile capillary haemangioma. **J Pathol** 1996; 179:403-8.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. **Cell** 1997; 88:347-54.

Jansson T, Wennergren M, Powell TL. Placental glucose transport and GLUT 1 expression in insulin-dependent diabetes. **Am J Obstet Gynecol** 1999; 180:163-8.

Jones EW, Orkin M. Tufted angioma (angioblastoma). A benign progressive angioma, not to be confused with Kaposi's sarcoma or low-grade angiosarcoma. **J Am Acad Dermatol** 1989; 20:214-25.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972; 26:239-57.

Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. **Acta Biochim Pol** 2003; 50:49-59.

Krajewski S, Krajewska M, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. **Cancer Res** 1996; 56:2849-55.

Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:589-98.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science** 1989; 246:1306-9.

Li LM, Kilbourn RG, Adams J, Fidler IJ. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. **Cancer Res** 1991; 51:2531-5.

Lincoln JH. **Nitric oxide in health and disease**. Cambridge: Cambridge University Press; 1997. Nitric oxide: introduction and historical background; p.3-11.

Lister WA. The natural history of strawberry nevus. **Lancet** 1938; 1:1429-34.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell** 2001; 104:487-501.

Lyons LL, North PE, Mac-Moune LF, Stoler MH, Folpe AL, Weiss SW. Kaposiform hemangioendothelioma: a study of 33 cases emphasizing its pathologic, immunophenotypic, and biologic uniqueness from juvenile hemangioma. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:559-68.

Mahle C, Schwartz M, Popek E, Bocklage T. Intra-abdominal lymphangiomas in children and adults. Assessment of proliferative activity. **Arch Pathol Lab Med** 1997; 121:1055-62.

Malkin D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 1993; 66:83-92.

Mancini AJ, Smoller BR. Proliferation and apoptosis within juvenile capillary hemangiomas. **Am J Dermatopathol** 1996; 18:505-54.

McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). **Nature** 1991; 349:254-6.

Mendes RV, Martins AR, de Nucci G, Murad F, Soares FA. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunoreactivity by B-cell non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma. **Histopathology** 2001; 39:172-8.

Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB. In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. **J Cell Biol** 1989; 108:671-82.

Miwa K, Asano M, Horai R, Iwakura Y, Nagata S, Suda T. Caspase 1-independent IL-1 $\beta$  release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. **Nat Med** 1998; 4:1287-92.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. **Oncogene** 1994; 9:1799-805.

Muller M, Wilder S, Bannasch D, et al. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. **J Exp Med** 1998; 188:2033-45.

Mulliken JB, Zetter BR, Folkman J. In vitro characteristics of endothelium from hemangiomas and vascular malformations. **Surgery** 1982; 92:348-53.

Mulliken JB, Glowacki J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. **Plast Reconstr Surg** 1982; 69:412-22.

Murphy BM, Martin SJ. Caspases: Structure, activation pathway, and substrates. In: Yin X, Dong Z, editors. **Essentials of apoptosis: a guide for basic and clinical research**. Totowa: Human Press; 2003. p.3-12.

Nagata S. A death factor-the other side of the coin. **Behring Inst Mitt** 1996; (97):1-11.

Nakamura T. Apoptosis and expression of Bax/Bcl-2 proteins in pyogenic granuloma: a comparative study with granulation tissue and capillary hemangioma. **J Cutan Pathol** 2000; 27:400-5.

Naresh KN, O'Connor GT, Soman CS, et al. A study of p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and p21 in Hodgkin's disease at presentation and relapse. **Hum Pathol** 1997; 28:549-55.

Nishio E, Watanabe Y. No induced apoptosis accompanying the change of oncoprotein expression and the activation of CPP32 protease. **Life Sci** 1998; 62:239-45.

North PE, Waner M, Mizeracki A, Mihm MC, Jr. GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. **Hum Pathol** 2000; 31:11-22.

North PE, Waner M, Mizeracki A, et al. A unique microvascular phenotype shared by juvenile hemangiomas and human placenta. **Arch Dermatol** 2001; 137:559-70.

North PE. Vascular neoplasia. **Pathol Inter** 2004; 54:S58.

North PE, Kahn T, Cordisco MR, Dadras SS, Detmar M, Frieden IJ. Multifocal lymphangioendotheliomatosis with thrombocytopenia: a newly recognized clinicopathological entity. **Arch Dermatol** 2004; 140:599-606.

O'Connors SL, Briones F, Chari NS, Cho SH, Hamm RL, Kadowaki Y, Lee S, Spurgers KB, McDonnell TJ. Apoptosis and cancer: pathogenic and therapeutic implications. In: Yin X, Dong Z, editors. **Essentials of apoptosis: a guide for basic and clinical research**. Totowa: Human Press; 2003. p.177-99.

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. **Biochem Biophys Res Commun** 1992; 189:824-31.

Pratt AG. Birthmarks in infants. **Arch Dermatol** 1967; 67:302-5.

Razon MJ, Kraling BM, Mulliken JB, Bischoff J. Increased apoptosis coincides with onset of involution in infantile hemangioma. **Microcirculation** 1998; 5:189-95.

Requena L, Sanguenza OP. Cutaneous vascular proliferation. Part II. Hyperplasias and benign neoplasms. **J Am Acad Dermatol** 1997; 37:887-919.

Risau W, Sariola H, Zerwes HG, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. **Development** 1988; 102:471-8.

Rodriguez-Villanueva J, Greenhalgh D, Wang XJ, et al. Human keratin-1.bcl-2 transgenic mice aberrantly express keratin 6, exhibit reduced sensitivity to keratinocyte cell death induction, and are susceptible to skin tumor formation. **Oncogene** 1998; 16:853-63.

Sarkar M, Mulliken JB, Kozakewich HP, Robertson RL, Burrows PE. Thrombocytopenic coagulopathy (Kasabach-Merritt phenomenon) is associated with Kaposiform hemangioendothelioma and not with common infantile hemangioma. **Plast Reconstr Surg** 1997; 100:1377-86.

Schlingemann RO, Hofman P, Klooster J, Blaauwgeers HG, Van der GR, Vrensen GF. Ciliary muscle capillaries have blood-tissue barrier characteristics. **Exp Eye Res** 1998; 66:747-54.

Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. **J Biol Chem** 2000; 275:7337-42.

Sgonc R, Fuerhapter C, Boeck G, Swerlick R, Fritsch P, Sepp N. Induction of apoptosis in human dermal microvascular endothelial cells and infantile hemangiomas by interferon-alpha. **Int Arch Allergy Immunol** 1998; 117:209-14.

Sheikh MS, Fornace AJ, Jr. Role of p53 family members in apoptosis. **J Cell Physiol** 2000; 182:171-81.

Shen YH, Wang XL, Wilcken DE. Nitric oxide induces and inhibits apoptosis through different pathways. **FEBS Lett** 1998; 433:125-31.

Slee EA, Harte MT, Kluck RM, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J Cell Biol** 1999; 144:281-92.

Smoller BR, Van de RM, Lebrun D, Warnke RA. bcl-2 expression reliably distinguishes trichoepitheliomas from basal cell carcinomas. **Br J Dermatol** 1994; 131:28-31.

Swerlick RA, Cooper PH. Pyogenic granuloma (lobular capillary hemangioma) within port-wine stains. **J Am Acad Dermatol** 1983; 8:627-30.

Takahashi K, Mulliken JB, Kozakewich HP, Rogers RA, Folkman J, Ezekowitz RA. Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. **J Clin Invest** 1994; 93:2357-64.

Takigawa M, Nishida Y, Suzuki F, Kishi J, Yamashita K, Hayakawa T. Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). **Biochem Biophys Res Commun** 1990; 171:1264-71.

Tan ST, Velickovic M, Ruger BM, Davis PF. Cellular and extracellular markers of hemangioma. **Plast Reconstr Surg** 2000; 106:529-38.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. **Science** 1984; 226:1097-9.

Ueki T, Takeuchi T, Nishimatsu H, et al. Silencing of the caspase-1 gene occurs in murine and human renal cancer cells and causes solid tumor growth in vivo. **Int J Cancer** 2001; 91:673-9.

Wiedemann HR, Burgio GR, Aldenhoff P, Kunze J, Kaufmann HJ, Schirg E. The proteus syndrome. Partial gigantism of the hands and/or feet, nevi, hemihypertrophy, subcutaneous tumors, macrocephaly or other skull anomalies and possible accelerated growth and visceral affections. **Eur J Pediatr** 1983; 140:5-12.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol** 1980; 68:251-306.

Yu Y, Flint AF, Mulliken JB, Wu JK, Bischoff J. Endothelial progenitor cells in infantile hemangioma. **Blood** 2004; 103:1373-5.

Zarem HA, Edgerton MT. Induced resolution of cavernous hemangiomas following prednisolone therapy. **Plast Reconstr Surg** 1967; 39:76-83.

Zetter BR. Angiogenesis. State of the art. **Chest** 1988; 93(3 Suppl):159S-66S.

Zukerberg LR, Nickoloff BJ, Weiss SW. Kaposiform hemangioendothelioma of infancy and childhood: an aggressive neoplasm associated with Kasabach-Merritt syndrome and lymphangiomatosis. **Am J Surg Pathol** 1993; 17:321-8.

**ANEXO I**

Nº	Idade (meses)	Diag. Clínico	Diag. Biol.	Revisão Morfol.	Trat. Sist.	GLUT1	Ki-67 (%)	VEGF	NOS3	p53	Bcl-2	Bcl-X	Bax	Bak	FAS	FAS-L	Casp.3	TUNEL (%)
1	70	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	21	L	MF	MF		N	6,12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	24	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	4	L	MF	PROL		N	5,33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
5	14	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	111	HC	HP	MF		N	0,35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7	177	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	110	L	MF	MF		N	3,72	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	26	L	MF	MF		N	0,72	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	14	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	108	HC	MF	MF		N	1,13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	76	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	26	HT	HP	MF		N	12,44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	127	HL	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	51	HT	HP	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	105	L	MF	MF		N	2,75	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	59	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	38	HT	HP	PROL		P	5,48	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
19	33	HC	MF	MF		N	4,68	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20	163	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21	32	HF	HP	PROL		P	3,05	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
22	51	HF	HP	PROL		P	1,8	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
23	119	HT	HP	MF		N	0	N	PF	N	N	P	N	P	P	P	N	.
24	31	HT	HP	PROL	63	P	6,41	P	PF	N	N	PF	PF	P	P	P	N	97,00
25	15	L	MF	MF		N	0,41	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26	125	HC	MF	MF		N	1,81	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27	13	HC	MF	MF		N	7,59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28	78	HF	HP	PROL		P	0,16	N	PF	N	N	PF	N	P	P	P	N	.
29	123	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30	135	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Nº	Idade (meses)	Diag. Clínico	Diag. Biol.	Revisão Morfol.	Trat. Sist.	GLUT1	Ki-67 (%)	VEGF	NOS3	p53	Bcl-2	Bcl-X	Bax	Bak	FAS	FAS-L	Casp.3	TUNEL (%)
211	161	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
212	22	L	MF	MF	335	N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
213	17	HT	HP	PROL		P	9,4	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	2,00
214	310	HF	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
215	68	L	MF	MF	30	N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
216	183	HC	MF	MF		N	0,93	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
217	62	HF	HP	FIBROG		P	0,43	P	P	N	N	P	P	P	P	P	NA	1,00
218	136	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
219	51	HT	HP	MF		P	3,04	P	P	NA	N	P	P	P	P	P	Pfc	4,08
220	168	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
221	52	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
222	31	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
223	90	HC	MF	PROL		N	2,72	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
224	24	L	MF	FIBROSE		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
225	71	HT	HP	MF		P	2,2	P	PF	N	N	PF	P	P	P	P	N	.
226	144	HC	MF	PROL		N	3,36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
227	81	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
228	8	HF	HP	PROL		P	0	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	2,00
229	34	HC	MF	MF	195	N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
230	124	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
231	204	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
232	24	HT	HP	PROL	154	P	6,3	P	PF	P	N	P	P	P	P	P	Pfc	0,40
233	43	HC	MF	MF		P	4,66	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
234	155	HC	MF	MF		N	1,26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
235	8	HF	HP	PROL		P	5,53	P	P	P	N	P	P	P	P	P	Pfc	2,00
236	236	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
237	45	HF	HP	PROL		P	4,22	P	PF	P	N	P	P	P	P	P	N	.
238	70	HL	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
239	42	HC	MF	MF		N	5,15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
240	81	HT	HP	MF		P	1,94	P	P	P	PF	P	P	P	P	P	Pfc	.

Nº	Idade (meses)	Diag. Clínico	Diag. Biol.	Revisão Mortol.	Trat. Sist.	GLUT1	Ki-67 (%)	VEGF	NOS3	p53	Bcl-2	Bcl-X	Bax	Bak	FAS	FAS-L	Casp.3	TUNEL (%)
61	193	HC	MF	MF		N	0,3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
62	110	HP	MF	MF		N	0,21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
63	150	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
64	17	HF	HP	PROL		P	2,93	P	P	NA	N	P	P	P	P	P	N	70,80
65	47	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
66	196	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
67	174	HC	MF	MF		N	1,07	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
68	81	HF	HP	FIBROG		N	0	N	NA	NA	N	NA	NA	P	P	P	NA	.
69	39	L	MF	MF	436	N	1,47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
70	131	HC	MF	MF		N	0,17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
71	44	HT	HP	FIBROG		P	2,28	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
72	140	HC	MF	MF		N	0,51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
73	50	HF	HP	PROL		P	0,7	PF	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
74	8	HT	HP	PROL		P	7,69	P	N	P	N	P	P	P	P	P	PFc	88,74
75	100	HC	MF	MF		N	0,67	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76	78	HT	HP	PROL		P	1,68	P	N	N	N	P	P	P	P	P	N	.
77	61	HC	MF	MF		N	3,27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
78	69	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
79	18	L	MF	PROL		N	2,16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
80	53	HT	HP	PROL	42	P	2,16	P	N	N	N	P	P	P	P	P	N	.
81	112	HF	HP	PROL		P	0,31	P	N	N	N	PF	P	P	P	P	N	.
82	47	HT	HP	PROL		P	1,31	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
83	37	HF	HP	PROL		P	2,17	P	N	N	N	P	P	P	P	P	N	.
84	27	L	MF	MF		N	3,85	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
85	13	HT	HP	PROL		P	0	PF	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	1,78
86	79	HT	HP	FIBROG	56	N	4	N	P	N	N	PF	P	N	P	P	N	.
87	37	IIT	IIP	PROL	308	P	0	P	N	N	N	PF	P	P	P	P	N	.
88	61	HT	HP	FIBROG	88	P	0	P	N	N	N	P	P	P	P	P	N	.
89	67	HT	HP	FIBROG		N	3,07	PF	N	N	N	PF	P	P	P	P	N	.
90	28	L	MF	MF		N	5,17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Nº	Idade (meses)	Diag. Clínico	Diag. Biol.	Revisão Mortol.	Trat. Sist.	GLUT1	Ki-67 (%)	VEGF	NOS3	p53	Bcl-2	Bcl-X	Bax	Bak	FAS	FAS-L	Casp.3	TUNEL (%)
91	50	HT	HP	FIBROG		N	70,37	N	N	P	N	PF	PF	P	P	P	N	.
92	61	HT	HP	PROL		N	41,43	N	PF	N	N	NA	NA	NA	P	P	N	.
93	57	HF	HP	FIBROG		N	10,18	N	N	N	N	PF	PF	P	P	P	N	.
94	50	HT	HP	PROL		P	3,71	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	P	.
95	68	HT	HP	FIBROG	120	N	4,02	N	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
96	60	HF	HP	FIBROG		N	0,74	N	N	N	N	P	P	P	P	P	N	.
97	87	HT	HP	FIBROG		P	0	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
98	78	L	MF	MF		N	4,73	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
99	19	L	MF	MF	70	N	1,86	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
100	52	HT	HP	FIBROG		P	12,96	N	P	P	N	P	P	N	P	P	N	.
101	29	HT	HP	PROL	193	P	8,09	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	22,20
102	79	L	MF	MF		N	0,83	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
103	37	HF	HP	PROL		P	2,92	P	P	P	N	PF	P	P	P	P	N	.
104	70	HP	MF	PROL		N	8,63	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
105	60	HF	HP	MF		N	0	N	PF	NA	N	PF	P	P	P	P	N	.
106	141	HF	HP	MF		N	0	N	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
107	86	HT	HP	MF	56	N	0	N	P	N	N	N	P	N	P	P	N	.
108	42	HT	HP	PROL	42	P	1,43	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
109	58	HT	HP	FIBROG		N	0	N	PF	N	N	PF	PF	N	P	P	N	.
110	136	HP	MF	PROL		N	4,12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
111	56	HT	HP	MF	412	N	1,08	P	P	N	N	NA	PF	P	P	P	N	.
112	26	L	MF	MF		N	0,87	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
113	37	L	MF	MF		N	0,88	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
114	47	L	MF	MF		N	0,84	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
115	24	HT	HP	PROL		P	4,72	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	PFc	3,40
116	48	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
117	23	HT	HP	PROL	31	P	0,89	P	PF	P	N	P	P	P	P	P	PFc	64,00
118	73	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
119	36	HT	HP	PROL		P	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
120	47	HT	HP	PROL		P	0,17	N	PF	P	N	P	P	P	P	P	N	.

Nº	Idade (meses)	Diag. Clínico	Diag. Biol.	Revisão Mortol.	Trat. Sist.	GLUT1	Ki-67 (%)	VEGF	NOS3	p53	Bcl-2	Bcl-X	Bax	Bak	FAS	FAS-L	Casp.3	TUNEL (%)
121	36	HL	MF	PROL		N	3,36											
122	62	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
123	1	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
124	146	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
125	27	HT	HP	PROL		P	3,66	PF	P	P	N	P	P	P	P	P	P	.
126	50	HT	HP	PROL	241	P	2,65	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
127	91	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
128	50	HT	HP	PROL	77	P	2,3	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
129	57	HT	HP	PROL	41	P	1,16	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
130	25	HF	HP	PROL		P	1,1	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P	2,00
131	53	HT	HP	PROL		P	4,09	N	N	N	N	NA	P	N	P	P	N	.
132	131	HT	HP	MF	55	N	0	PF	P	N	N	P	P	N	P	P	N	.
133	27	HT	HP	MF		N	0	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
134	129	L	MF	MF		N	2,37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
135	136	L	MF	MF		N	4,02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
136	110	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
137	77	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
138	10	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
139	40	HF	HP	PROL		P	1,16	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
140	71	HT	HP	MF	28	N	0	P	N	N	N	P	P	P	P	P	N	.
141	14	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
142	55	HT	HP	PROL		P	1,83	PF	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
143	154	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
144	175	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
145	55	HT	HP	PROL		P	3,89	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
146	35	HF	HP	FIBROG		NA	0	NA	NA	NA	NA	P	NA	NA	P	P	NA	.
147	210	HP	MF	MF		N	0,83	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
148	17	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
149	30	HT	HP	PROL		P	1,72	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
150	26	HT	HP	PROL	23	P	0	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	76,00

Nº	Idade (meses)	Diag. Clínico	Diag. Biol.	Revisão Morfol.	Trat. Sist.	GLUT1	Ki-67 (%)	VEGF	NOS3	p53	Bcl-2	Bcl-X	Bax	Bak	FAS	FAS-L	Casp.3	TUNEL (%)
151	182	HP	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
152	84	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
153	97	HT	HP	PROL		P	1,23	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
154	76	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
155	209	HC	MF	MF		N	2,4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
156	27	HT	HP	PROL		P	2,45	P	P	N	N	P	P	P	P	P	P	1,40
157	56	HT	HP	PROL		P	0,52	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
158	51	HT	HP	PROL	383	P	0,94	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
159	101	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
160	31	HT	HP	PROL	61	P	2,23	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	63,40
161	84	HT	HP	FIBROG		N	0	P	P	N	N	PF	P	P	P	P	N	.
162	52	HC	MF	MF		N	1,25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
163	135	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
164	27	HF	HP	PROL		P	1,58	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
165	178	HP	MF	PROL		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
166	34	HT	HP	PROL	181	P	0	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
167	85	HT	HP	PROL		P	0,19	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
168	72	HL	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
169	76	HC	MF	MF		N	0,86	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
170	55	HT	HP	PROL		P	2,5	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	65,96
171	84	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
172	19	HT	HP	PROL		P	5,54	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	62,91
173	21	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
174	134	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
175	17	HT	HP	PROL		P	3,41	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
176	45	HT	HP	PROL		P	2,15	N	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
177	155	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
178	43	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
179	214	HP	MF	PROL		N	0,29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
180	124	L	MF	MF		N	0,51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Nº	Idade (meses)	Diag. Clínico	Diag. Biol.	Revisão Morfol.	Trat. Sist.	GLUT1	Ki-67 (%)	VEGF	NOS3	p53	Bcl-2	Bcl-X	Bax	Bak	FAS	FAS-L	Casp.3	TUNEL (%)
181	25	HF	HP	PROL	139	P	1,41	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	2,40
182	36	HT	HP	PROL		P	4,52	P	NA	P	N	P	P	P	P	P	N	.
183	46	HT	HP	PROL	182	P	2,78	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
184	21	HT	HP	PROL		P	1,51	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	0,20
185	15	HF	HP	PROL		P	8,44	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	2,60
186	32	HF	HP	PROL		P	6,55	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.
187	34	HT	HP	PROL		P	4,19	P	PF	P	N	P	P	P	P	P	N	.
188	24	HT	HP	PROL		P	1,65	P	PF	P	N	P	P	P	P	P	PFc	62,40
189	81	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
190	92	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
191	29	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
192	172	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
193	78	HT	HP	FIBROG		NA	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
194	129	HC	MF	MF		N	3,9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
195	27	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
196	182	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
197	68	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
198	34	HF	HP	PROL		P	2,49	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
199	58	L	MF	MF		N	3,16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
200	20	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
201	27	HT	HP	PROL		P	0	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
202	26	HC	MF	MF		N	0,42	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
203	121	HT	HP	MF	60	N	4,63	PF	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
204	22	HT	HP	PROL	90	P	10,86	P	P	P	N	P	P	P	P	P	PFc	.
205	70	L	MF	MF		N	1,44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
206	15	L	MF	MF		N	0,95	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
207	21	HF	HP	PROL		P	5,99	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	PFc	3,17
208	8	HT	HP	PROL		P	11,82	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
209	106	HC	MF	MF		N	2,88	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
210	73	HC	MF	MF		N	0	P	N	N	N	P	PF	P	P	P	N	.

Nº	Idade (meses)	Diag. Clínico	Diag. Biol.	Revisão Mortol.	Trat. Sist.	GLUT1	Ki-67 (%)	VEGF	NOS3	p53	Bcl-2	Bcl-X	Bax	Bak	FAS	FAS-L	Casp.3	TUNEL (%)
211	161	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
212	22	L	MF	MF	335	N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
213	17	HT	HP	PROL		P	9,4	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	2,00
214	310	HP	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
215	68	L	MF	MF	30	N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
216	183	HC	MF	MF		N	0,93	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
217	62	HF	HP	FIBROG		P	0,43	P	P	N	N	P	P	P	P	P	NA	1,00
218	136	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
219	51	HT	HP	MF		P	3,04	P	P	NA	N	P	P	P	P	P	Pfc	4,08
220	168	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
221	52	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
222	31	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
223	90	HC	MF	PROL		N	2,72	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
224	24	L	MF	FIBROSE		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
225	71	HT	HP	MF		P	2,2	P	PF	N	N	PF	P	P	P	P	N	.
226	144	HC	MF	PROL		N	3,36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
227	81	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
228	8	HF	HP	PROL		P	0	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	2,00
229	34	HC	MF	MF	195	N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
230	124	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
231	204	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
232	24	HT	HP	PROL	154	P	6,3	P	PF	P	N	P	P	P	P	P	Pfc	0,40
233	43	HC	MF	MF		P	4,66	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
234	155	HC	MF	MF		N	1,26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
235	8	HF	HP	PROL		P	5,53	P	P	P	N	P	P	P	P	P	Pfc	2,00
236	236	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
237	45	HF	HP	PROL		P	4,22	P	PF	P	N	P	P	P	P	P	N	.
238	70	HL	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
239	42	HC	MF	MF		N	5,15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
240	81	HT	HP	MF		P	1,94	P	P	P	PF	P	P	P	P	P	Pfc	.

Nº	Idade (meses)	Diag. Clínico	Diag. Biol.	Revisão Mortol.	Trat. Sist.	GLUT1	Ki-67 (%)	VEGF	NOS3	p53	Bcl-2	Bcl-X	Bax	Bak	FAS	FAS-L	Casp.3	TUNEL (%)
241	33	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
242	30	L	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
243	62	HT	HP	MF		P	4,08	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
244	28	HT	HP	MF	298	P	3,79	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	9,40
245	95	HC	MF	MF		N	2,93	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
246	34	HT	HP	PROL	567	P	2,13	P	P	P	N	P	P	P	P	P	P	.
247	37	L	MF	MF	784	N	1,39	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
248	91	HT	HP	MF	56	P	3,49	P	PF	N	N	P	P	P	P	P	N	.
249	151	L	MF	MF		N	3,73	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
250	35	HT	HP	PROL		P	2,2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
251	61	HT	HP	MF	6	N	3,07	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
252	148	HC	MF	MF		N	0,58	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
253	197	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
254	58	L	MF	MF		N	12,04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
255	28	L	MF	MF		N	59,38	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
256	173	HC	MF	MF		N	0	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
257	43	HT	HP	PROL	120	P	1,82	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	.
258	20	HT	HP	PROL	41	P	5,25	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	53,80
259	132	HC	MF	MF		N	0,34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
260	10	HF	HP	PROL	57	P	12,33	P	P	P	PF	P	P	P	P	P	N	94,80
261	14	HF	HP	PROL	35	P	20,29	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	96,20
262	38	HF	HP	MF	103	P	3,55	P	P	P	N	P	P	P	P	P	N	.

FIBROG Fibrogorduroso

FIBROSE Fibrose

HC Hemangioma Caveroso

HF Hemangioma Fragiforme

HL Hemangioliinfangioma

HP Hemangioma Plano

HP Hemangioma Proliferativo

HT Hemangioma Tuberoso

L Linfangioma

MF Má-formação

N Negativo

NA Não Avaliável

P Positivo

PF Positivo Fraco

PFc Positivo Fraco Focal

PROL Proliferação