

ALINE CRISTINA BATISTA RODRIGUES JOHANN

**IMUNO-EXPRESSÃO DA GLUT-1 EM LESÕES
VASCULARES BENIGNAS DE BOCA**

BELO HORIZONTE

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2006

LEGENDA

Figura 1 (A) Controle interno positivo para GLUT-1: eritrócitos e perineuro positivos (estreptavidina-biotina, 400x). (B) Controle positivo para GLUT-1: vasos e células trofoblásticas da placenta positivos (estreptavidina-biotina, 200x). (C) O HEM controle foi caracterizado por um grande número de vasos (revestidos por células de núcleo arredondado, em detalhe) exibindo uma maturação inicial com dilatação do lúmen vascular (HE, 200x). (D) O HEM controle foi positivo para GLUT-1 nas células endoteliais, eritrócitos e perineuro, em detalhe (estreptavidina-biotina, 200x). (E) Um caso de GP de boca revelando numerosos capilares revestidos por células de núcleo arredondado e citoplasma escasso (em detalhe) organizado em lóbulos (HE, 200x). (F) Os vasos do GP de boca revelaram negatividade para GLUT-1, no entanto positividade foi visualizada nos eritrócitos, em detalhe. Este caso foi inicialmente diagnosticado como HEM na fase proliferativa, sendo reclassificado como GP de boca após a imuno-histoquímica (estreptavidina-biotina, 200x). (G) Um caso de MV venosa de boca caracterizado por vasos sanguíneos tortuosos delimitados por um endotélio maduro, em detalhe (HE, 200x). (H) A MV venosa de boca foi negativa para GLUT-1 nos vasos, no entanto, positividade em eritrócitos foi observada, em detalhe. Este é um caso inicialmente diagnosticado como HEM na fase involuída que foi reclassificado como MV venosa de boca após a imuno-histoquímica (estreptavidina-biotina, 200x). (I) Um caso de VAR de boca caracterizado por uma veia extensa, tortuosa e anormal delimitada por um endotélio maduro, em detalhe (HE, 200x). (J) VAR de boca apresentou-se negativa para GLUT-1 nos vasos e positiva nos eritrócitos, em detalhe (estreptavidina-biotina, 200x).

ALINE CRISTINA BATISTA RODRIGUES JOHANN

**IMUNO-EXPRESSÃO DA GLUT-1 EM LESÕES
VASCULARES BENIGNAS DE BOCA**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.**

Área de concentração: Patologia bucal

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO ALVES DE MESQUITA

BELO HORIZONTE

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2006

Johann, Aline Cristina Batista Rodrigues

J65i
2006
T

Imuno-expressão da GLUT-1 em lesões vasculares benignas de boca / Aline Cristina Batista Rodrigues Johann. 2006.

59f. : il. Color.

Orientador: Ricardo Alves de Mesquita

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia

Referências bibliográficas: f.39-43

Anexos: f.44-59

1. Hemangioma – Teses. 2. Malformações congênitas – Teses. 3. Varizes – Teses. 4. Granuloma piogênico – Teses. 5. Proteínas de transporte - Teses. 6. Vasos sanguíneos – Doenças – Teses. 7. Diagnósticos de laboratório – Técnicas – Teses. 8. Diagnóstico diferencial – Teses. 9. Doenças vasculares – Diagnóstico – Teses. 10. Boca – Histopatologia – Teses. I. Mesquita, Ricardo Alves de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Dissertação intitulada "**Imuno-expressão da GLUT-1 em lesões vasculares benignas de boca**", Área de Concentração Patologia Bucal, apresentada pela candidata **Aline Cristina Batista Rodrigues Johann**, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita
FO/UFMG – Orientador

Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez
FO/UFMG

Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsine Machado de Souza
FO/USP - SP

Profa. Dra. ISABELA ALMEIDA PORDEUS
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
FO/UFMG

Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2006.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Nogueira e Aécio,
pela vida, educação, dedicação e orientação.

Ao Ricardo, meu eterno amor, pela atenção, pelo
carinho, compreensão, inspiração e incentivo.

Aos meus irmãos pela alegria, pelo
companheirismo e pela união.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ricardo Mesquita pela oportunidade, por acreditar no meu potencial, pela dedicação, competência, disponibilidade, pelos desafios, pela paciência e, principalmente, pela orientação.

À Professora Maria Cássia, a quem pude recorrer em todos os momentos desta jornada, pelo estímulo, carinho, ensinamentos e momentos de descontração.

À Professora Maria Auxiliadora pela confiança, carinho, aprendizado e pelas oportunidades.

Ao Professor Ricardo Gomez pela disponibilidade, atenção e pelo aprendizado.

À Professora Ana Maria Lana, ao Professor Antônio Guedes e ao Professor Bernardo Gontijo pelo auxílio e pela importante contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^ª Dèsirée Silva pela disponibilidade nos momentos cruciais, pelo carinho e pela paciência.

Aos demais professores do curso de Mestrado que contribuíram para a minha formação.

À Christiane, Heloísa, Inês e ao Márcio por todo o auxílio e disponibilidade em todos os momentos.

À Bruna, ao João e à Juliana, pela alegria do trabalho em equipe e pela fundamental participação neste trabalho.

À Anacélia, ao Bruno, à Eliza, Giovana, Jeane, Joyce, Linaena, Mariela, Soraya, e Vanessa pelo companheirismo, apoio e pela contribuição para o meu crescimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio.

Aos meus avós por valorizar e incentivar os interesses intelectuais .

À Deus.

SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Hemangioma e malformação vascular.....	13
2.2 Granuloma Piogênico.....	18
2.3 Variz	18
2.4 Proteína humana transportadora de glicose do tipo eritrocítica.....	19
2.4.1 Caracterização.....	19
2.4.2 Papel no diagnóstico do hemangioma.....	20
3 OBJETIVOS	24
3.2 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
4 METODOLOGIA	25
4.1 Aspectos éticos e legais.....	25
4.2 Seleção dos casos.....	25
4.3 Reação imuno-histoquímica para a proteína humana transportadora de glicose do tipo eritrocítica.....	25
4.4 Análise e reclassificação das lesões.....	27
5 RESULTADOS	29
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	44
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	44
ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	45
ANEXO C – ACEITE DA REVISTA ORAL DISEASES.....	59

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AML	– Actina α de músculo liso
bFGF	– Fator básico de crescimento de fibroblasto
BSA	– Soro albumina bovina
CD31	– Antígeno expresso pelas células endoteliais
CD34	– Antígeno expresso pelas células hematopoiéticas precursoras
CD146	– Molécula de adesão celular de superfície
COEP	– Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	– Diaminobenzidina
DNA	– Ácido Desoxirribonucléico
Fator VIII	– Fator de von Willebrand
Fator XIIIa	– Fator de pró-coagulação XIIIa
Fcγ receptor II (CD32)	– Receptor para imunoglobulina G-2
FO	– Faculdade de Odontologia
GLUT	– Facilitadores de transporte
GLUT-1	– Proteína humana transportadora de glicose do tipo eritrocítica
GLUT-12	– Facilitadores de transporte do tipo 12
GLUT-14	– Facilitadores de transporte do tipo 14
GP	– Granuloma piogênico
HE	– Hematoxilina e eosina
HEM	– Hemangioma
HEMCNI	– Hemangioma congênito não involutivo
HEMCRI	– Hemangioma congênito rapidamente involutivo
HK	– Hemangioendotelioma kaposiforme
IGF2	– Fator de crescimento semelhante à insulina -2
ICAM-1 (CD54)	– Molécula de adesão intercelular humana-1
ISSVA	– Sociedade internacional para estudo de anomalias vasculares

kD	– kilodalton(s)
LeY	– Lewis Y
MIB 1	– Antígeno marcador de proliferação celular Ki-67
MV	– Malformação vascular
Na	– Sódio
PAS	– Ácido periódico de Schiff
PCNA	– Antígeno nuclear de proliferação celular
SGLT	– Transportadores de glicose ligados ao Na ⁺
SMC-actina	– Actina de célula muscular lisa
Tie2	– Proteína receptora de tirosina quinase
TIMP I	– Inibidor de metaloproteinases
UFMG	– Universidade Federal de Minas Gerais
VAR	– Variz
VEGF	– Fator de crescimento endotelial vascular
vWf	– Fator de von Willebrand

RESUMO

Na boca, assim como em outras regiões, o diagnóstico diferencial do hemangioma (HEM) para a malformação vascular (MV) e para o granuloma piogênico (GP) pode ser difícil. Este estudo objetivou: 1) investigar a acurácia da análise histológica dos casos de HEM, GP e MV de boca através do estudo imuno-histoquímico para proteína humana transportadora de glicose do tipo eritrocítica (GLUT-1); 2) reclassificar as lesões de acordo com a imuno-expressão dessa proteína; e 3) verificar a imuno-expressão dessa proteína em variz (VAR) de boca. Uma análise imuno-histoquímica para GLUT-1 foi realizada em 93 casos diagnosticados histologicamente como lesões vasculares benignas de boca: 19 HEM, 48 GP, 17 MV e 9 VAR. Nenhum dos casos de lesões vasculares benignas de boca foi imuno-positivo para GLUT-1. Os 19 casos diagnosticados inicialmente como HEM de boca mostraram negatividade para GLUT-1 sendo reclassificados como GP ou MV de boca. A análise histológica não foi suficiente para concluir o diagnóstico de HEM de boca pelo fato de nenhum desses ser HEM verdadeiro. Todos os casos com classificação inicial de GP e MV foram imuno-negativos para esta proteína, o que demonstrou a eficácia da análise histológica para estas lesões. As lesões classificadas como VAR de boca foram imuno-negativas para a proteína GLUT-1 nos vasos sanguíneos. GLUT-1 é um marcador efetivo e um importante auxiliar para o diagnóstico das lesões vasculares benignas de boca.

ABSTRACT

The histological differential diagnosis from oral hemangioma (HEM) to oral vascular malformation (VM) or to oral pyogenic granuloma (PG) may be difficult. This study approaches three issues: (1) to verify the accuracy of histological analysis of oral HEM, oral VM and oral PG based in immunohistochemistry to the human erythrocyte-type glucose transporter protein (GLUT-1); (2) to reclassify the lesions according to GLUT-1 expression; and (3) to investigate the immunoexpression of this glucose transporter in oral varix (VAR). Immunohistochemistry for GLUT-1 was performed in 93 histologically diagnosed cases of oral benign vascular lesions: 17 VM, 19 HEM, 9 VAR, and 48 PG. Descriptive analyses were performed. None of the cases of the oral benign vascular lesions evaluated were immunopositive to GLUT-1. The 19 cases histologically diagnosed as oral HEM that showed negative staining to GLUT-1 were reclassified as oral PG or oral VM. The histological evaluation itself was not enough to conclude the diagnosis of oral HEM since none of these cases were true HEM. All sample cases with initial VM or PG classification were negative to GLUT-1. This demonstrated the accuracy of histological diagnosis of these lesions itself. Oral VAR showed negative staining to GLUT-1 in blood vessels. GLUT-1 is an useful, effective and important auxiliary marker for the diagnosis of oral benign vascular lesions.

1 INTRODUÇÃO

Hemangioma (HEM), malformação vascular (MV), granuloma piogênico (GP) e variz (VAR) são lesões benignas de vasos sanguíneos comuns na região de cabeça e pescoço. Existem divergências relacionadas à classificação dessas lesões devido a uma nomenclatura confusa e a um sistema de classificação divergente.

Em 1982, MULLIKEN e GLOWACKI propuseram uma classificação diferenciando o termo genérico HEM, antes designado para lesões com diferentes evoluções clínicas, em duas entidades: HEM e MV. O HEM, lesão de patogenia indefinida, foi caracterizado pela rápida proliferação de células endoteliais. Essa lesão geralmente não está presente ao nascimento e, na maioria dos casos, apresenta involução espontânea. MV é uma anomalia que ocorre durante o desenvolvimento fetal provavelmente causada por um distúrbio dos fatores sinalizadores que regulam a embriogênese vascular. Essa lesão não apresenta involução espontânea e está sempre presente ao nascimento crescendo na mesma proporção do desenvolvimento do paciente.

Em 1996, a Sociedade Internacional para o Estudo das Anomalias Vasculares (International Society for the Study of Vascular Anomalies - ISSVA) aprovou um sistema de classificação modificada do modelo de MULLIKEN E GLOWACKI (1982). As lesões vasculares foram subdivididas em: (1) tumores - HEM, GP, hemangioma congênito rapidamente involutivo (HEMCRI), hemangioma congênito não involutivo (HEMCNI), hemangiopericitoma, angioma em tufo e hemangioendotelioma kaposiforme (HK); e (2) MV.

Apesar da padronização dessa classificação, alguns autores continuaram classificando, genericamente, essas lesões como HEM dificultando o estudo e o conhecimento das mesmas. O HEM pode apresentar características histológicas e clínicas similares ao GP e à MV, o que também dificulta a classificação das lesões. NORTH *et al.* (2000) identificaram a proteína humana transportadora de glicose do tipo eritrocítica (GLUT-1) como um marcador imuno-histoquímico sensível e específico para HEM de pele. Outros estudos verificaram a positividade para GLUT-1 em HEM de pele, fígado, placenta,

glândulas mamária e submandibular, genitália e, em casos isolados, na boca (2 casos nos lábios e dois na bochecha). Não existem amplos estudos que avaliem a imuno-expressão da GLUT-1 em lesões vasculares benignas de boca. Outrossim, nenhum estudo relata a imuno-expressão de GLUT-1 em VAR de boca. Desta forma, o objetivo desse estudo foi verificar a imuno-expressão da GLUT-1 em uma série de casos de lesões vasculares benignas de boca.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O HEM, a MV, o GP e a VAR são lesões benignas de vasos sanguíneos comuns na região de cabeça e pescoço. Existem divergências relacionadas à classificação dessas lesões devido a uma nomenclatura confusa e a um sistema de classificação divergente (ENJOLRAS e MULLIKEN, 1993; FISHMAN e MULLIKEN, 1993; JACKSON *et al.*, 1993; MARCHUCK, 2001; MULLIKEN e GLOWACKI, 1982; VERY *et al.*, 2002).

2.1 Hemangioma e malformação vascular

Em 1863, VIRCHOW, citado por MULLIKEN e GLOWACKI (1982), foi o primeiro autor a classificar, com base na histologia, as anomalias vasculares em: *angioma simplex*, *angioma cavernosum* e *angioma racemosum*. Segundo esse autor, qualquer um desses subtipos poderia transformar-se um no outro através da proliferação celular ou da dilatação de vasos.

Em 1935, GESCHICKTER e KEASBEY denominaram de HEM as lesões benignas de vasos sanguíneos utilizando esse termo como sinônimo de angioma. O HEM foi subdividido de acordo com as características clínicas e histopatológicas em: HEM capilar, HEM cavernoso e fístula arterio-venosa congênita. O HEM capilar foi caracterizado, ao exame clínico, por lesões elevadas e avermelhadas. Estas lesões eram compostas histologicamente por uma fina rede de capilares podendo organizar-se em lóbulos. O HEM cavernoso foi identificado, clinicamente, como uma marca de nascença na face ou como um nódulo azulado na superfície mucosa da boca. Histologicamente essa lesão era composta por vasos dilatados com paredes finas. A *fístula arterio-venosa congênita* era conseqüente à persistência da rede vascular embriogênica, manifestando-se após o nascimento, sendo histologicamente caracterizada por regiões de hipertrofia vascular com a presença de artérias e veias intercomunicantes.

PAYNE *et al.* (1966) observaram, através da clínica e de registros fotográficos, HEM de pele de cinco pacientes pediátricos possibilitando a visualização de duas fases. A fase

mais inicial da lesão foi caracterizada por uma área pálida bem demarcada e plana, tornando-se visível quando a criança chorava criando um contraste na pele adjacente à lesão. Esta fase foi identificada como “precursora” do HEM. A segunda fase foi identificada pelo aparecimento de pequenos vasos planos difusos dentro da área pálida, adquirindo gradualmente uma aparência irregular até abranger toda a área envolvida na primeira fase.

MULLIKEN e GLOWACKI (1982) estudaram os aspectos clínicos, histológicos e imuno-histoquímicos das lesões vasculares benignas e propuseram uma classificação para diferenciá-las em duas categorias: HEM e MV. O termo HEM foi restrito a lesões que exibiam proliferação celular, enquanto o termo MV referenciou as anomalias estruturais, ou seja, erros na morfogênese vascular. Foram utilizados cortes histológicos de biópsia de pele de 26 casos de HEM e 23 de MV, corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS), reticulina, tricrômio de Masson e van Gieson. Para a análise imuno-histoquímica foram utilizados o marcador da atividade da fosfatase alcalina e o fator VIII (Fator de von Willebrand) como marcadores da maturação endotelial. Para demonstrar a síntese de Ácido Desoxirribonucléico (DNA) pelos tecidos foi realizada uma auto-radiografia após a marcação com [³H] timidina.

Os autores supracitados caracterizaram o HEM como uma pequena mácula vermelha que surgia após o nascimento (em 60% dos casos), crescia rapidamente durante um período de 6 a 8 meses e regredia em um período variável. Essa lesão foi subdividida em duas fases: proliferativa e involutiva. A fase proliferativa foi caracterizada por um aumento da atividade celular endotelial com organização em ninhos, multilaminação da membrana basal do endotélio, pela presença de fosfatase alcalina e do fator VIII nas áreas de hiper celularidade e em vasos maduros, e pela identificação de síntese de DNA nas células endoteliais. A fase involutiva foi caracterizada por fibrose e diminuição da celularidade. Os canais vasculares não apresentavam camada de músculo liso e eram delimitados por um endotélio arredondado. Ilhas de depósito de gordura encontravam-se entremeadas por tecido fibroso. Nos casos de HEM que não regrediram completamente, observava-se uma coexistência de áreas de proliferação endotelial e áreas de deposição

fibro-gordurosa. Nas lesões involutivas não foi identificada síntese de DNA nas células endoteliais.

Esses autores observaram que a MV estava presente ao nascimento em 90% dos casos, sempre acompanhava o crescimento da criança, e nunca regredia. Na análise histológica foi identificado um endotélio maduro de camada basal única de células achatadas, com ciclo celular normal e rede de reticulina normal circundando os vasos. A MV era capilar, venosa, arterial, linfática ou combinada, podendo ser ainda fistulada ou não. Não foi identificada proliferação das células endoteliais na auto-radiografia de [³H] timidina. Porém evidenciou-se, imuno-histoquimicamente, a presença de fosfatase alcalina e de fator VIII nos vasos anormais. Na MV uma mudança de pressão, de fluxo, ectasia, formação vascular colateral e alterações conseqüentes de mudanças hormonais, podem ocorrer durante a fase de crescimento.

Em 1982, GLOWACKI e MULLIKEN pesquisaram a presença de mastócitos em casos de HEM e MV. A avaliação foi baseada na histologia e na incorporação com [³H] timidina nas células endoteliais. Foi observada que a fase proliferativa do HEM apresentava uma maior quantidade de mastócitos quando comparada à fase involutiva do HEM, à MV e à pele normal. Os autores postularam que o aumento do número de mastócitos poderia estar relacionado com a formação e/ ou manutenção do HEM.

MULLIKEN e YOUNG (1988) citados por TAKAHASHI *et al.* (1994) caracterizaram a evolução clínica do HEM em três fases: proliferativa, caracterizada por um crescimento rápido nos primeiros 12 meses de idade; involutiva, cessa o crescimento e inicia a regressão lenta pelos próximos 1-5 anos; e involuída, completando a regressão por volta dos 5 anos de idade em 50% dos casos, por volta dos 7 anos em mais de 70% dos casos e nos casos remanescentes de 10-12 anos. Essa última fase foi determinada pela regressão total da lesão caracterizada por poucos e finos vasos alimentadores do tipo capilar e veias drenantes revestidas por um endotélio maduro aplainado, além da deposição de gordura e fibras colágenas (MULLIKEN *et al.*, 2000).

TAKAHASHI *et al.* (1994) refinaram a classificação histológica de MULLIKEN e

GLOWACKI (1982) com o auxílio da imuno-histoquímica. Foram analisados 38 HEM nas três fases clínicas e 5 MV (arterio-venosa, arterio-capilar-venosa, venosa, capilar-venosa e linfática). Os autores identificaram as expressões do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), do fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF), da colagenase tipo IV, da urokinase, de inibidores de metaloproteinases (TIMP I), da actina de célula muscular lisa (SMC-actina), do CD31 (Antígeno expresso pelas células endoteliais) e do vWf (Fator de von Willebrand); e a presença de mastócitos. Na fase proliferativa foram identificadas, grande expressão de PCNA, colagenase tipo IV, bFGF, VEGF, urokinase, CD31 e vWf; uma menor quantidade de mastócitos e de expressão de SMC-actina; e ainda a ausência de TIMP I. Foi observada, na fase involutiva, a proeminente expressão de TIMP I, bFGF, urokinase; e uma menor expressão de VEGF, PCNA e colagenase tipo IV. Na fase involuída, a expressão de VEGF, colagenase tipo IV, PCNA, bFGF, urokinase e TIMP I encontraram-se diminuídas, assim como a marcação para CD31, vWf, SMC-actina e mastócitos. Os autores sugeriram que a expressão desses marcadores tem um papel regulador do crescimento e da regressão do HEM. Também foi encontrado nos casos de MV um resultado similar aos casos de HEM involuído, demonstrando que as MV não apresentam atividade proliferativa.

Em 1996, a Sociedade Internacional para o Estudo das Anomalias Vasculares (International Society for the Study of Vascular Anomalies - ISSVA) aprovou e padronizou um sistema de classificação modificado de MULLIKEN e GLOWACKI (1982). As lesões vasculares foram subdivididas em: (1) tumores - HEM, GP, HEMCRI, HEMCNI, hemangiopericitoma, angioma em tufo e HK; e (2) MV (ENJOLRAS e MULLIKEN, 1997).

A classificação de ISSVA de 1996 proporcionou a padronização da nomenclatura possibilitando a substituição de termos antigos por termos simplificados (tabela 1).

Tabela 1- Correspondência entre a terminologia de ISSVA de 1996 e outras terminologias

ISSVA (1996)		Outras terminologias
Hemangioma		Hemangioma capilar ^{&, *}
		Hemangioma morango ^{&, *}
		Hemangioma juvenil ^{&, *}
		Hemangioma celular ^{&, *}
	Em derme profunda	Hemangioma cavernoso ⁺
Malformação vascular	Capilar	Mancha vinho do Porto [#]
		Hemangioma plano [~]
		Nevus flammeus neonatorum [#]
		Mancha salmão ⁺
	Venosa	Hemangioma cavernoso ^{&, +}
		Hemangioma venoso
	Arterio-venosa	
	Arterial	
	Linfática	Hemangio-linfangioma ^{&}
		Linfangioma ^{&}

[&]MULLIKEN e GLOWACKI, 1982; ^{*}ENJOLRAS e MULLIKEN, 1993; ⁺HAND e FRIEDEN (2002); [#] MULLIKEN *et al.*, 2000; [~]GONTIJO *et al.*, 2003.

Apesar da padronização da classificação da ISSVA em 1996, alguns autores continuaram classificando, genericamente, essas lesões como HEM dificultando estudo das mesmas, sendo um obstáculo ao completo entendimento das lesões vasculares (MARCHUCK, 2001; VERY *et al.*, 2002). Além disso, o HEM pode apresentar características clínicas e histológicas similares ao GP e à MV, o que leva a erros no diagnóstico (NORTH *et al.*, 2000; LEON-VILLAPALOS *et al.*, 2005).

2.2 Granuloma piogênico (GP)

O GP é caracterizado como uma proliferação de células endoteliais de natureza inflamatória, comum na boca. O GP de boca apresenta-se, clinicamente, como um nódulo róseo a arroxeadado, liso ou lobulado, séssil ou pedunculado, que não regride espontaneamente e sangra facilmente. Histologicamente essa lesão é composta por células endoteliais organizadas em capilares delimitados por fina camada de células endoteliais, e um infiltrado de células inflamatórias agudas e crônicas. Essa lesão pode apresentar organização lobular sendo denominada de hemangioma capilar lobular ou não ser organizado em lóbulos, o hemangioma capilar não lobular (EPIVATIANOS *et al.* 2005). O HEM pode apresentar similaridades histológicas com GP (NORTH *et al.*, 2000, 2001a; FISHMAN e MULLIKEN, 1993) e, segundo FRIEDEN e ESTERLY (1992) essa similaridade pode ocorrer quando o HEM apresenta uma organização lobular.

FREITAS *et al.* (2005) compararam a imuno-expressão de VEGF, de vWf e de CD31 entre HEM e GP de boca (15 casos cada); identificando a densidade de microvasos a partir da marcação de CD31 e de vWf. Não foi observada entre essas lesões nenhuma diferença significativa na expressão total de VEGF, de vWF e de CD31; nem no índice de angiogênese. Foram observadas imuno-positividade para todos os marcadores em 100% dos casos de GP e HEM de boca. Esses autores afirmaram que a positividade para esses marcadores e a ausência de diferença entre os índices de angiogênese refletem as similaridades clínicas e histológicas de GP e de HEM. Além disso foi demonstrado que a quantificação microvascular não é útil no diagnóstico diferencial dessas lesões.

2.3 Variz

A VAR é uma lesão benigna, adquirida, relacionada com a alteração do tecido de suporte do vaso ou conseqüente de uma alteração no fluxo sangüíneo. Essa lesão é caracterizada, histologicamente, como veia tortuosa anormal e extensa. Clinicamente, a VAR de boca apresenta-se como um nódulo vermelho a arroxeadado, comumente encontrado

na língua, lábio e mucosa jugal; e acomete principalmente a sétima década de vida (ETTINGER e MADERSON, 1974; SOUTHAM e ETTINGER, 1974; NEVILLE *et al.*, 2004). Existem poucos trabalhos interessados no estudo de VAR de boca na literatura, além disso, os poucos que existem se direcionam especificamente às VAR sublinguais (ETTINGER e MADERSON, 1974; SOUTHAM e ETTINGER, 1974). Não existem relatos da imunexpressão de GLUT-1 em VAR.

2.4 Proteína humana transportadora de glicose do tipo eritrocítica (GLUT-1)

2.4.1 Caracterização

Em mamíferos, a oxidação de glicose é responsável pela maior fonte de energia metabólica celular. A membrana plasmática é impermeável a moléculas polares como a glicose, necessitando assim de proteínas carreadoras para transportá-las para o meio intracelular (BELL *et al.*, 1990; BROWN, 2000; OLSON e PESSIN, 1996). A glicose entra na célula eucarióta através de dois tipos de proteínas carreadoras: os transportadores de glicose ligados ao Na⁺ (SGLT) e os facilitadores de transporte (GLUT). Os SGLT transportam glicose acoplando sua captura com a do sódio (BELL *et al.*, 1990; SCHEEPERS *et al.*, 2004). GLUT funciona regulando o movimento bilateral da glicose entre os espaços extra e intracelular assegurando que um suprimento constante de glicose circulante esteja disponível para o metabolismo através de difusão facilitada (OLSON e PESSIN, 1996). A difusão facilitada é uma forma de transporte passivo no qual a proteína carreadora facilita a passagem de moléculas, se prendendo quimicamente a elas transportando-as assim através da membrana (GUYTON e HALL, 1996).

A família do GLUT é composta por quatorze tipos: GLUT-1 ao GLUT-12, transportador HMIT-H⁺ ligado ao mio-inositol e GLUT-14. Essas proteínas diferem entre si na expressão tecidual, na função, na especificidade de substrato, nas características cinéticas, e apresentam mecanismos de regulação diferentes (WU e FREEZE, 2002).

GLUT-1, uma proteína de 45-55 kD, apresenta um modelo conformacional de doze segmentos transmembrana α -hélice, um amino- e um carboxi-terminal intracelular, um grande "loop" intracelular, e um sítio de N-glicosilação no primeiro "loop" extracelular. O gene GLUT-1 localiza-se no cromossomo 1 (1p35.31.3) (KLEPPER e VOIT, 2002). A expressão deste gene é supra-regulada por uma variedade de agentes e condições: fatores séricos e de crescimento, transformação oncogênica, inóforos de cálcio, hormônio da tireóide; e em resposta a redução na concentração externa de glicose, hipóxia e inibição da fosforilação oxidativa (BEHROOZ e ISMAIL-BEIGI, 1999).

YOUNES *et al.* (1997) realizaram um estudo imuno-histoquímico para a proteína GLUT-1 em tecidos normais e em neoplasias epiteliais benignas e malignas de diversas regiões (cérebro, mama, cólon, bexiga, esôfago, coração, rim, fígado, pulmão, tecido linfóide, ovário, pâncreas, paratireóide, placenta, próstata, músculo, pele, intestino delgado, estômago, testículos, tireóide e útero). Casos com 100% das células negativas para GLUT-1 foram considerados negativos, os demais casos foram positivos. Os autores observaram que a marcação positiva para GLUT-1 foi sempre intensa e de membrana. Em tecidos normais, a imuno-marcação de GLUT-1 foi observada no perineuro, microvasos do cérebro (barreira hemato-encefálica), centros germinativos de tecidos linfóides reativos, células trofoblásticas e microvasos da placenta, eritrócitos e túbulos renais. A maioria das neoplasias epiteliais benignas mostrou imuno-negatividade, enquanto que uma grande parte dos carcinomas foi positiva.

2.4.2 Papel da GLUT-1 no diagnóstico do hemangioma (HEM)

NORTH *et al.* (2000) avaliaram a GLUT-1 como um marcador imuno-histoquímico para diferenciar o HEM do GP e da MV. Esses autores afirmaram que alguns patologistas confundem o HEM na fase proliferativa com outras lesões proliferativas como o GP. Os autores ainda afirmaram que é extremamente difícil distinguir, histologicamente, o HEM, nas fases em involução e involuída, da MV venosa ou arterio-venosa. A expressão de GLUT-1 em pele normal, 143 casos de HEM de pele, 66 casos de MV de pele, 20 casos de GP e 12

casos de angiossarcomas foi avaliada imuno-histoquimicamente. Eritrócitos e perineuro foram utilizados como controle interno positivo. Esses autores identificaram GLUT-1 em mais de 50% dos microvasos lesionais de 97% dos casos de HEM. A marcação estava presente em todas as fases do HEM. A ausência de imuno-reatividade microvascular para GLUT-1 foi observada nos casos de MV, de GP, em tecido de granulação e em hemangioendotelioma. Esses autores ainda observaram imuno-positividade focal para GLUT-1 em 3 dos 12 angiossarcomas. Os autores afirmaram que a GLUT-1 é um marcador imuno-histoquímico confiável e altamente específico para HEM.

NORTH *et al.* (2001a), com o objetivo de investigarem as possíveis similaridades entre os vasos sanguíneos do HEM e da placenta, avaliaram a expressão de antígenos vasculares associados a placenta: GLUT-1, Lewis Y (LeY), merosina e Fc γ receptor II. (receptor para imunoglobulina G-2). Foram avaliados 66 casos de HEM, 26 MV, 13 GP, 6 angiomias em tufo, 7 hemangioendoteliomas epitelióide, 1 HK, 14 angiossarcomas e de placenta. Foi observada imuno-positividade para GLUT-1 nos vasos de 100% dos casos de HEM e da placenta. 35% dos casos de angiossarcoma apresentaram marcação focal. Não foi observada marcação para GLUT-1 nos casos de MV, GP, angiomia em tufo, hemangioendotelioma. Imuno-reatividade intensa para Fc γ receptor II e LeY foi identificada em vasos da placenta e de HEM em todas as fases. Nenhuma marcação vascular para Fc γ receptor II e LeY foi identificada nos casos de MV, GP, angiomia em tufo, HK e vasos cerebrais. 35% dos casos de angiossarcoma e 28% dos casos de hemangioendotelioma epitelióide apresentaram marcação fraca à moderada para LeY. Foi identificada imuno-reatividade intensa para merosina na membrana basal vascular de 100% dos casos de HEM, dos vasos cerebrais e da placenta. As demais lesões não apresentaram marcação. Esses autores observaram que o perfil imuno-histoquímico do HEM é similar ao da placenta, sugerindo uma relação entre a placenta e o HEM.

NORTH *et al.* (2001b) caracterizaram 43 lesões vasculares, com base nos achados histológicos e imuno-histoquímicos para GLUT-1 e LeY em cinco categorias: HEM (25

casos), HEMCNI (6 casos), GP (10 casos), angioma em tufo (1 caso) e HK (1 caso). Os casos HEM apresentaram marcação vascular positiva para GLUT-1 e LeY. Não foi identificada a imuno-expressão de GLUT-1 e LeY em HEMCNI, MV, GP, angioma em tufo e HK.

Li *et al.* (2003) avaliaram a expressão de CD146, merosina, Fc γ receptor II e GLUT-1 em HEM de pele. Todos os HEM apresentaram intensa positividade para Fc γ receptor II, merosina e GLUT-1. Os casos de HEM revelaram negatividade nas células endoteliais para CD146. No entanto, os autores observaram marcação positiva nos pericitos dos HEM e ainda relataram que as células endoteliais normais expressam CD146. Considerando que CD146 não está envolvido somente na adesão das células endoteliais como também na transdução de sinais e regulação das funções celulares, os autores postularam que a expressão em baixos níveis dessas moléculas pode contribuir com o fenótipo do HEM.

DYDUCH *et al.* (2004) avaliaram a expressão de GLUT-1 em 26 casos de HEM, 15 casos de GP, 9 casos HEM epitelióide. 17 dos casos de HEM (65%) apresentaram positividade para GLUT-1 nos vasos. Os casos de GP e HEM epitelióide foram negativos.

MO *et al.* (2004) utilizaram imuno-histoquímica para identificação da proteína GLUT-1 em 19 casos de lesões vasculares hepáticas (HEM e MV). Os autores encontraram, nos casos de HEM, imuno-reatividade para GLUT-1 no endotélio dos vasos, mesmo na fase involutiva, e ausência de reatividade em artérias, arteríolas e veias de maior calibre. Nos casos de MV hepática não se observou imuno-reatividade para GLUT-1. Esses autores concluíram que a imuno-positividade para GLUT-1 em HEM hepático é uma ferramenta útil para distinguir essa lesão de MV hepática.

LYONS *et al.* (2004) avaliaram a imuno-expressão GLUT-1 e LeY em 14 casos de HK e em HEM. Foram observadas ausência de marcação vascular de GLUT-1 e de LeY em HK e marcação positiva nos casos de HEM.

NGUYEN *et al.* (2004) verificaram intensa imuno-positividade para GLUT-1, em células endoteliais de 100% de casos de HEM localizados em tronco, genitália e na cabeça incluindo a boca: 2 casos no lábio e 2 na mucosa jugal.

DRUT e DRUT (2004) investigaram, através de imuno-histoquímica, a expressão da proteína GLUT-1 e da actina α de músculo liso (AML) em HEM de placenta (2 casos), pele (8 casos), fígado (1 caso), glândula mamária (1 caso) e glândula submandibular (1 caso). Foi observada imuno-reatividade para GLUT-1 e AML em todos os casos. Os autores concluíram que a expressão de GLUT-1 não é restrita ao HEM de pele. Além disso, postulou-se que dois tipos celulares compõem esses tumores: as células endoteliais e os pericitos.

LEON-VILLAPALOS *et al.* (2005) avaliaram a expressão de GLUT-1 através de um estudo imuno-histoquímico em 19 casos de HEM, 2 de HEMCNI, 29 de MV e 4 de GP. Foi observada intensa imuno-reatividade para essa proteína nas células endoteliais em 95% dos casos de HEM, e ausência de marcação em HEMCNI, MV e GP. Os autores concluíram que a GLUT-1 distingue o HEM da MV e do GP, que a expressão dessa proteína parece ser independente da atividade proliferativa, e que esse marcador é confiável e específico para HEM.

HERNÁNDEZ *et al.* (2005) classificaram 11 casos de lesões vasculares do fígado com base na expressão de GLUT-1 independente de seu diagnóstico histológico. Em seguida, os autores compararam os resultados da expressão de GLUT-1 com o diagnóstico histológico e observaram que a histologia das lesões positivas para esta proteína correspondia a do HEM. A maioria das lesões vasculares negativas para GLUT-1 era congênita e provavelmente representava HEMCRI e HEMCNI. Verificou-se que as lesões positivas para GLUT-1 apresentavam maior taxa de proliferação que as negativas.

A GLUT-1 foi selecionada para avaliar as lesões vasculares benignas de boca neste estudo por ser: 1) amplamente estudada em lesões vasculares, 2) sensível e específica no diagnóstico de HEM, e 3) de fácil aplicabilidade. A expressão de GLUT-1 em HEM é intensa e de membrana nas células endoteliais. Até o presente momento, nenhum amplo estudo caracterizando a imuno-expressão da GLUT-1 em lesões vasculares benignas de boca foi realizado. Além disso, não existem registros na literatura da avaliação da expressão de GLUT-1 em VAR.

3 OBJETIVOS

3. 1 Objetivo geral

Verificar a imuno-expressão da GLUT-1 em lesões vasculares benignas de boca

3. 2 Objetivos específicos

3.2.1 Investigar a acurácia da análise histológica de casos de HEM, GP e MV de boca com base no estudo imuno-histoquímico para GLUT-1.

3.2.2 Reclassificar as lesões de acordo com a expressão da GLUT-1.

3.2.3 Verificar a imuno-expressão da GLUT-1 em VAR de boca.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos e legais

Esse estudo foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) sob o número 467/04 (Anexo A).

4.2 Seleção dos casos

A amostra incluiu a totalidade de casos de MV, HEM, GP, hemangioma capilar lobular e VAR registrados nos arquivos do Serviço de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG), no período de 1997 a 2004. Foram excluídos os casos de localização diferente da boca, ou cujos blocos de inclusão em parafina estavam ausentes ou foram insuficientes para o desenvolvimento das análises histológicas e imuno-histoquímicas.

4.3 Reação imuno-histoquímica para a proteína humana transportadora de glicose do tipo eritrocítica (GLUT-1)

A identificação da proteína GLUT-1 foi feita utilizando-se a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase, realizada no Serviço de Patologia Bucal da FO-UFMG.

A partir das lesões previamente fixadas em formol a 10% e emblocadas em parafina, obtiveram-se cortes histológicos de 4 µm de espessura estendidos em lâminas tratadas por uma mistura de 30 gramas gelatina (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil, código 628) com 3 gramas de sulfato de cromo e potássio (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil, código 728) diluídos em três litros de água quente. Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol: um de 30 minutos em estufa à 55°C e outro de 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram hidratados em banhos decrescentes de etanol (100%, 90% e 70%) por 5 minutos cada. Para remoção do pigmento de formol, os cortes foram imersos por dez minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% e etanol a 95%, e lavadas em cinco banhos de água destilada.

Para a recuperação antigênica os cortes foram imersos em solução de Ácido cítrico (Lab Synth, Diadema, Brasil, código A2270) 10 mM em pH 6,0 e incubados na panela a vapor por 30 minutos a uma temperatura entre 95°C e 98°C. Após a recuperação, os cortes foram mantidos por 20 minutos em temperatura ambiente para resfriar, sendo lavados, em seguida, em cinco banhos de água destilada.

Seguiu-se então o bloqueio da atividade de ligação à avidina endógena segundo o protocolo de MILLER *et al.* (1999). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com dois banhos de peróxido de hidrogênio a 10 volumes por 15 minutos sendo, em seguida, lavados em cinco banhos de água destilada.

Posteriormente, os cortes foram imersos em três banhos em solução tampão de Tris-hidroxi-metil-aminometano (TRIS-HCL - Nuclear, Diadema, Brasil, código 318768), pH 7,4 por cinco minutos. Os cortes foram incubados em anticorpo anti-GLUT-1 (Dako, Carpinteria, USA, código A3536) diluído (1:200) em solução tampão BSA (Soro albumina bovina - Sigma Chemical CO, St. Louis, USA, código A9647), mantidos em câmara úmida, à 4°C, durante dezoito horas. Os cortes foram lavados em três banhos de cinco minutos em solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4. Seguiu-se a incubação do anticorpo secundário (LSAB® System, Biotinylated link, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA, código K0675) à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos. Os cortes foram novamente lavados em três banhos de cinco minutos em solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4; e incubados em estreptavidina-peroxidase (LSAB® System, Streptavidin-HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA, código K0675), à temperatura ambiente em câmara úmida por 30 minutos. Os cortes foram imersos em três banhos de cinco minutos em solução tampão TRIS-HCL, pH 7,4.

A revelação foi executada com a solução cromógena de 25 mg de 3,3' diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical, St. Louis, USA, código D5637) diluídos em 100 ml de tampão TRIS-HCL, pH 7,4, acrescido de 1,20 ml de peróxido de hidrogênio 10 volumes por 5 minutos. Os cortes foram lavados em um banho de TRIS-HCL, pH 7,4 e cinco de água destilada.

A contra-coloração foi feita com solução de hematoxilina de Mayer filtrada por quatro minutos. Em seguida foi lavada com um banho de água destilada e com um banho de solução aquosa de hidróxido de amônio a 10%, sendo imediatamente lavados em cinco banhos de água destilada. Seguiu-se a desidratação em soluções de etanol em concentrações crescentes: 70%, 90% e 100% (cinco minutos) e mais duas vezes a 100% (dez minutos), diafanizadas em um banho de cinco e outro de dez minutos em xilol. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e Permount (Fisher Scientific®, Fair Lawn, USA, código SP15-500).

Foram considerados como controle interno positivo os eritrócitos e perineuros dos cortes das lesões vasculares benignas de boca (figura 1A). Dois outros controles positivos foram usados: placenta, cedida pela Professora Dra. Ana Maria Arruda Lana do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina legal da Faculdade de Medicina da UFMG; e um caso de HEM na fase involutiva, cedido pelo Professor Dr. Antônio Carlos Martins Guedes do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG. Na placenta foi observada positividade em eritrócitos, trofoblastos e células endoteliais microvasculares (figura 1B); e no caso de HEM na fase involutiva (localizado no lábio de um paciente de 2 anos de idade) foi observada positividade em células endoteliais vasculares e eritrócitos (figura 1C e D)

4.4 Análise e reclassificação das lesões

Análise da imuno-marcação foi realizada por um único observador através de um microscópio de luz (Carl Zeiss – Axiostar 1122-100) com aumento final de 400X. Foi considerada marcação positiva para GLUT-1 quando as células endoteliais apresentavam marcação equivalente a marcação do perineuro e negativas quando completamente ausentes.

As lesões foram reavaliadas e submetidas à análise histológica para reclassificação. Considerando que as lesões de nossa amostra não eram congênitas e que GLUT-1 é um

marcador sensível e específico para o HEM, aquelas lesões com ausência de marcação e que apresentaram diagnóstico inicial de HEM de boca foram reclassificadas.

A lesão foi classificada como MV de boca quando morfológicamente composta por vasos sangüíneos tortuosos delimitados por endotélio maduro achatado além de ser imunonegativos para GLUT-1 (ENJOLRAS e MULLIKEN, 1997; HERNÁNDEZ *et al.*, 2005; LEON-VILLAPALOS *et al.*, 2005; MO *et al.*, 2004; MULLIKEN e YOUNG, 1988; NORTH *et al.*, 2000 e 2001a). A lesão foi classificada como GP de boca quando foi morfológicamente composta por células endoteliais organizadas em capilares delimitados por fina camada de células endoteliais, por um infiltrado de células inflamatórias agudas e crônicas, e quando imunonegativa para GLUT-1 (EPIVATIANOS *et al.*, 2005; NORTH *et al.*, 2001a). A lesão foi classificada como HEM de boca quando revelou proliferação de células endoteliais arredondadas organizadas em lóbulos, formando vasos sangüíneos dilatados, ou quando composta por poucos vasos remanescentes delimitados por um endotélio maduro achatado (MULLIKEN e YOUNG, 1988; ENJOLRAS e MULLIKEN, 1997). Imuno-positividade para GLUT-1 também foi observada (DRUT e DRUT, 2004; HERNÁNDEZ *et al.*, 2005; LEON-VILLAPALOS *et al.*, 2005; MO *et al.*, 2004; NGUYEN *et al.*, 2004; NORTH *et al.*, 2000 e 2001a). A lesão foi classificada como VAR de boca quando composta por um a três vasos sangüíneos tortuosos e extensivos delimitados por endotélio maduro achatado (SOUTHAM e ETTINGER, 1974).

5 RESULTADOS

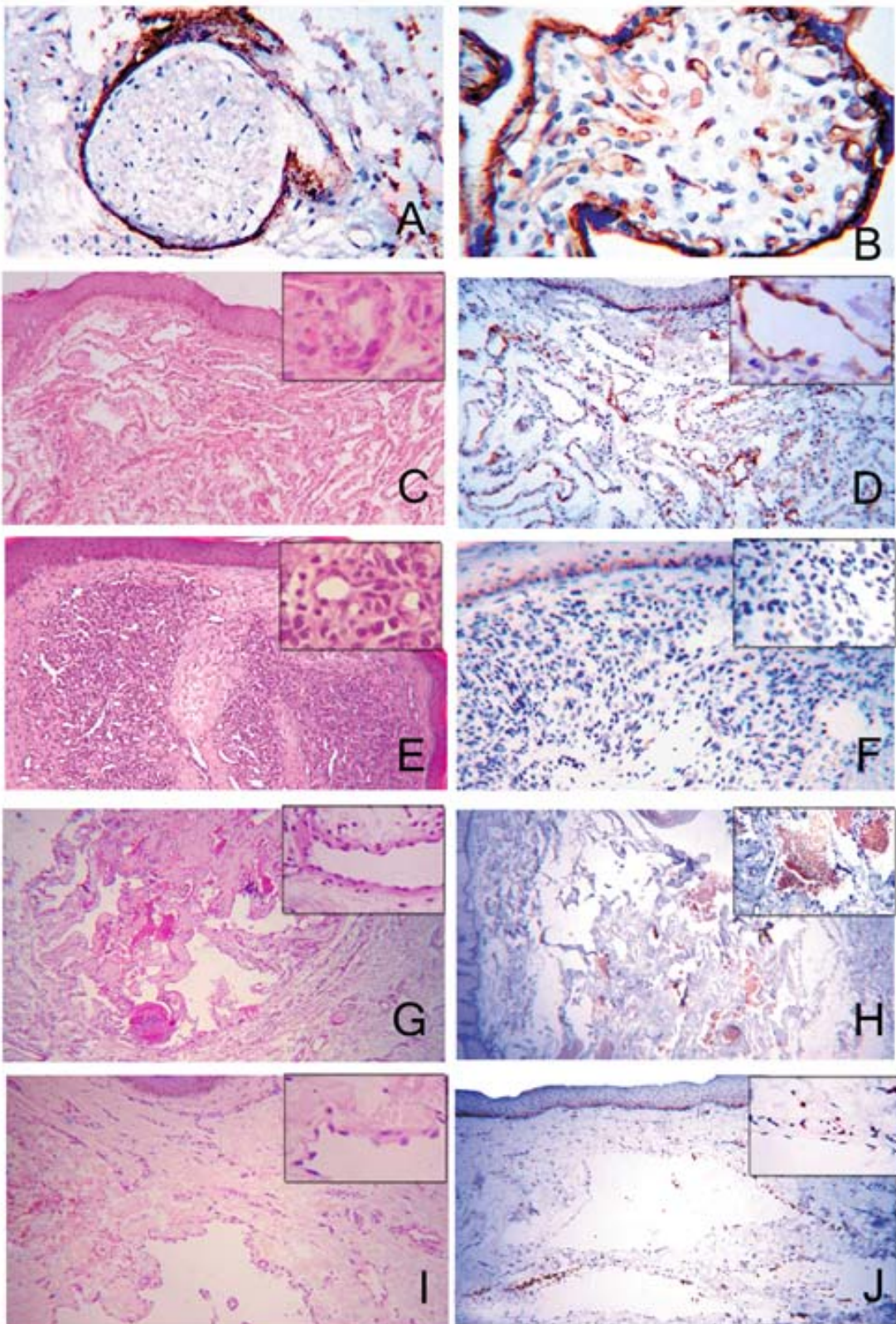
Foram selecionados 17 casos com diagnóstico histológico prévio de MV, 19 casos de HEM, 9 casos de VAR e 48 casos de GP de boca. Nenhuma das lesões era congênita de acordo com informações obtidas nas fichas de biópsia.

Nenhum dos casos de lesões vasculares benignas de boca avaliadas apresentou imuno-positividade para GLUT-1 no endotélio dos vasos sanguíneos.

As lesões com diagnóstico inicial de HEM de boca foram reclassificados como GP (9 casos; Figuras 1E e F), ou como MV (10 casos; Figuras 1G e H).

Todos os casos da amostra com diagnóstico inicial de GP e MV apresentaram imuno-negatividade para GLUT-1 no endotélio dos vasos sanguíneos.

As VAR de boca também revelaram ausência de marcação para GLUT-1 no endotélio dos vasos sanguíneos (figuras 1I e J).



6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram selecionados 17 casos com diagnóstico histológico prévio de MV, 19 casos de HEM, 9 casos de VAR e 48 casos de GP de boca. Essas lesões foram submetidas à análise imuno-histoquímica para a proteína GLUT-1. Nenhum dos casos de lesões vasculares benignas de boca avaliadas apresentou imuno-positividade para GLUT-1 no endotélio dos vasos sanguíneos. Na literatura, os únicos casos de HEM que apresentam imuno-negatividade são HEMCNI e HEMCRI (BERENGER *et al.*, 2003; ENJOLRAS *et al.*, 2001; MULLIKEN e ENJOLRAS, 2004; NORT *et al.*, 2001b), mas nenhuma das lesões avaliadas neste estudo era representativa destas entidades por não serem congênitas. Foi necessário, então, uma reclassificação com base nos achados imuno-histoquímicos e histológicos das lesões inicialmente diagnosticadas como HEM de boca. Nove dos 19 casos com diagnóstico inicial de HEM correspondiam ao GP e 10 à MV. Isso reflete que análise histológica não é suficiente para a correta conclusão do diagnóstico de HEM de boca. No entanto, todos os casos da amostra com diagnóstico inicial de GP e MV apresentaram imuno-negatividade para GLUT-1 no endotélio dos vasos sanguíneos, o que demonstrou a acurácia do diagnóstico histológico para essas lesões. Todos os casos de VAR de boca apresentaram imuno-negatividade para GLUT-1.

A marcação observada nas células endoteliais da placenta e do HEM controle foi equivalente à marcação observada no perineuro. Nas demais lesões analisadas neste estudo a marcação foi completamente ausente. Isto está de acordo com as observações de NORTH *et al.* (2000) que verificaram que a imuno-expressão endotelial de GLUT-1 é um fenômeno de “tudo ou nada”, sendo equivalente à marcação observada no perineuro ou completamente ausente.

A metodologia do nosso estudo assemelha-se a dos estudos desenvolvidos por NORTH *et al.* (2001b) e HERNÁNDEZ *et al.* (2005), no entanto, alguns dos resultados são diferentes. NORTH *et al.* (2001b) caracterizaram 43 lesões vasculares com base na análise histológica e imuno-histoquímica para GLUT-1. No entanto, esses autores eliminaram as MV

no momento da triagem das lesões, presentes no nosso estudo. Além disso, em nosso estudo não encontramos casos de HEMCNI, angioma em tufo, nem HK e, ao contrário do nosso estudo, que avaliou somente lesões de boca, esses autores estudaram lesões de cabeça, pescoço, tronco, extremidades superiores e inferiores. Além do mais, 100% dos casos HEM foram positivos no estudo acima citado, o oposto do nosso com 100% dos casos negativos, não se tratando de HEM verdadeiros. Já HERNÁNDEZ *et al.* (2005) classificaram 11 casos de lesões vasculares do fígado com base na expressão de GLUT-1 independente de seu diagnóstico histológico. Em seguida esses autores compararam os resultados da expressão de GLUT-1 com o diagnóstico histológico e observaram que a histologia das lesões positivas para GLUT-1 correspondia com a do HEM. Em nosso estudo não encontramos nenhum caso de HEM GLUT-1 positivo, além disso, essas lesões localizavam-se em fígado, ao passo que em nosso estudo a localização era em boca.

Foi observada imuno-positividade para GLUT-1 nas células endoteliais de 100% dos casos de HEM nos estudos de NORTH *et al.* (2001 a e 2001b), Li *et al.* (2003), MO *et al.* (2004), LYONS *et al.* (2004), NGUYEN *et al.* (2004), DRUT e DRUT (2004). NORTH *et al.* (2001a e 2001b) e LI *et al.* (2003) verificaram imuno-positividade nas células endoteliais de todos os HEM de pele avaliados. MO *et al.* (2004) identificaram intensa marcação de GLUT-1, em células endoteliais, em 100% de casos de HEM de fígado. LYONS *et al.* (2004) observaram intensa imuno-reatividade para GLUT-1, em células endoteliais, em 100% casos de HEM não identificando a localização. NGUYEN *et al.* (2004) verificaram intensa imuno-positividade para GLUT-1, em células endoteliais, em 100% de casos de HEM localizados no tronco, na genitália e na cabeça, incluindo a boca: 2 casos no lábio e 2 na bochecha. DRUT e DRUT (2004) observaram intensa imuno-reatividade para GLUT-1 em células endoteliais em 100% de casos de HEM de placenta, pele, fígado, glândulas mamárias e submandibulares. No presente estudo, eliminando o HEM controle, nenhum caso com diagnóstico inicial de HEM foi imuno-positivo para GLUT-1, resultado diferente ao encontrado nos estudos supracitados. Assim, não foi encontrado em nossa amostra nenhum caso de HEM verdadeiro.

Casos de HEM negativos para GLUT-1 foram identificados por NORTH *et al.* (2000), DYDUCH *et al.* (2004), LEON-VILLAPALOS *et al.* (2005). NORTH *et al.* (2000) verificaram que quatro lesões classificadas histologicamente como HEM foram imuno-negativas para GLUT-1. Considerando que duas dessas lesões eram congênitas, não apresentavam crescimento pós-natal e apresentavam histologicamente uma proliferação de capilares organizada em lóbulos celulares bem desenvolvidos demarcados por espessos septos conjuntivos, os autores sugeriram que se tratavam, possivelmente, de GP. As outras duas lesões também eram congênitas e foram removidas de crianças mais velhas. Os autores classificaram-nas como HEM involuído. Esses mesmos autores inferiram que é extremamente difícil diferenciar HEM involuído de MV, por isso acreditamos que esses dois casos foram, possivelmente, MV.

DYDUCH *et al.* (2004) encontraram 9 dos 26 casos de HEM (35%) negativos para GLUT-1. Esses autores classificaram uma dessas lesões como HEMCNI e afirmaram que, apesar de GLUT-1 ser altamente específica para HEM, a ausência de marcação em lesões vasculares não exclui o diagnóstico de uma variante do HEM. Somente dois tipos de HEM são negativos para GLUT-1: HEMCRI e HEMCNI (BERENGER *et al.*, 2003; ENJOLRAS *et al.*, 2001; MULLIKEN e ENJOLRAS, 2004; NORT *et al.*, 2001b), provavelmente esses casos se enquadravam nessas lesões ou não eram verdadeiros HEM.

LEON-VILLAPALOS *et al.* (2005) observaram ausência de marcação para GLUT-1 nas células endoteliais em 5% dos 19 casos de HEM. Os autores acreditam que esse único caso de HEM negativo para GLUT-1 possa ter perdido a expressão de GLUT-1 com a involução. Entretanto esta hipótese contradiz os achados consagrados de NORTH *et al.* (2000 e 2001a) e MO *et al.* (2004) que encontraram marcação positiva em todas as fases de desenvolvimento do HEM. Assim como nesses estudos, os casos da nossa amostra inicialmente diagnosticados como HEM de boca foram reclassificados com base nos achados imuno-histoquímicos e histológicos em GP e MV.

Somente dois tipos de HEM são negativos para GLUT-1: HEMCRI e HEMCNI. HEMCRI encontra-se completamente formado após o nascimento e apresenta rápida

involução no início da infância. Essa lesão é caracterizada histologicamente pela proliferação de células endoteliais organizadas em lóbulos de diferentes tamanhos com áreas involuídas sem lóbulos. Os vasos sanguíneos são formados por células endoteliais arredondadas e membrana basal fina na fase inicial e espessada na fase de regressão rápida. HEMCNI apresenta-se completamente formada ao nascimento e não cresce na vida pós-natal. Essa lesão é composta por pequenos vasos organizados em pequenos a grandes lóbulos separados por feixes de tecido denso fibroso anormal e microfístulas arterio-venosas. As células endoteliais apresentam-se arredondadas e os vasos revelam finas membranas basais (BERENGER *et al.*, 2003; ENJOLRAS *et al.*, 2001; MULLIKEN e ENJOLRAS, 2004; NORT *et al.*, 2001b). Nenhum dos casos avaliados no nosso estudo era congênito, não correspondendo a nenhuma dessas lesões.

Foi observada ausência de imuno-reatividade microvascular para GLUT-1 em 100% de casos de MV nos estudos de NORTH *et al.* (2000, 2001a e 2001b), MO *et al.* (2004) e LEON-VILLAPALOS *et al.* (2005). Apesar desses estudos não serem realizados em boca seus resultados foram semelhantes ao do nosso estudo, uma vez que todos os casos da nossa amostra com diagnóstico inicial de MV de boca foram imuno-negativos para GLUT-1, o que demonstrou a acurácia do diagnóstico histológico para os casos de MV. Entretanto, neste estudo, a análise histológica não foi suficiente para a conclusão do diagnóstico de HEM de boca, uma vez que 10 dos 19 casos diagnosticados inicialmente como HEM se tratavam de MV. Isso demonstra que o diagnóstico histológico diferencial entre HEM e MV pode ser difícil. Isso se deve às similaridades histológicas que o HEM, nas fases em involução e involuída, apresenta com a MV (NORTH *et al.*, 2000, 2001a; LEON-VILLAPALOS *et al.*, 2005).

Imuno-negatividade microvascular para GLUT-1 foi identificada em 100% de casos de GP observados nos estudos de NORTH *et al.* (2000, 2001a e 2001b), DYDUCH *et al.* (2004) e LEON-VILLAPALOS *et al.* (2005). Apesar desses casos não serem localizados em boca, o presente estudo também revelou ausência de marcação para GLUT-1 em GP de boca o que demonstrou a acurácia da análise histológica para essas lesões. Nove casos

inicialmente diagnosticados como HEM de boca eram, na realidade, GP. Isso demonstra que o HEM pode apresentar similaridades histológicas com GP (NORTH *et al.*, 2000, 2001a; FISHMAN e MULLIKEN, 1993). FRIEDEN e ESTERLY (1992) enfatizam que o HEM na fase proliferativa pode apresentar uma organização lobular assemelhando-se ao GP.

NORTH *et al.* (2000) propuseram que a proteína GLUT-1 poderia auxiliar o crescimento celular por transportar glicose, vitamina C, galactose, água, glicopeptídeos e outras moléculas para as células, podendo auxiliar a proliferação do HEM. Além disso, na vida pós-natal, a presença de GLUT-1 em células que deveriam ser negativas para esta proteína está associada a um aumento da atividade proliferativa e da necessidade energética, podendo exercer um papel importante na fase proliferativa de HEM (YOUNES *et al.* 1997). Entretanto, a persistência desse transportador na fase involuída sugere que essa expressão não é uma adaptação temporária do aumento da demanda de glicose devido à alta taxa de mitose (NORTH *et al.*, 2000). YOUNES *et al.* (1997) ainda postularam que essa ausência de detecção da GLUT-1 na maioria dos tecidos humanos normais e nas neoplasias epiteliais benignas sugere duas hipóteses: 1) essa proteína está sendo degradada rapidamente no tecido humano normal e/ou 2) o anticorpo ou o método de detecção não é sensível o suficiente para identificar a GLUT-1 na maioria dos tecidos normais, cuja expressão pode ser pequena.

NORTH *et al.* (2001a) propuseram que a presença de GLUT-1 em HEM e em microvasos placentários sugere dois mecanismos patogênicos possíveis para o HEM: (1) a colonização do mesênquima por angioblastos aberrantes com fenótipo semelhante ao das células endoteliais da placenta, ou (2) que seja originado de células placentárias embolizadas que alcançam os tecidos fetais.

No primeiro mecanismo, essa diferenciação aberrante pode ser resultante de mutação somática ou da expressão alterada de fatores regulatórios da proliferação celular. Isto é reforçado pelo estudo de BOYE *et al.* (2001) que demonstraram que células endoteliais derivadas de HEM são de origem clonal comum e que essas células, mesmo depois de isoladas da lesão, exibiam proliferação e migração aumentadas, mantinham o

padrão de crescimento rápido encontrado no neonato e ainda que a migração dessas células ao invés de ser inibida endostatina, uma proteína inibidora da angiogênese, era estimulada, sugerindo um fenótipo celular alterado. O estudo de BISCHOFF (2002), baseado na biologia molecular, manteve a hipótese de que o HEM é originário de uma mutação somática ocorrida em uma única célula progenitora. A identificação desta mutação somática e a demonstração de como ela causa o HEM aguardam provas formais. Além disso, BERG *et al.* (2001) evidenciaram que a formação do HEM está associada com eventos mutacionais somáticos, e sugeriu que o *locus* do cromossoma 5q está envolvido em casos esporádicos de HEM. Outrossim, LI *et al.* (2003) sugeriram que a expressão alterada de proteínas relacionadas com a angiogênese como E-selectina, Tie2 (proteína receptora de tirosina quinase), VEGF, bFGF, IGF2 (fator de crescimento semelhante à insulina-2) e CD146 podem ser derivadas de alterações genética das células no HEM.

O segundo mecanismo é reforçado pelo estudo de North *et al.* (2001a) que identificaram a expressão de outras proteínas (Fc γ receptor II - CD32, Merosina e LeY) em ambas as células endoteliais do HEM e da placenta. KORGUN *et al.* (2005) sugerem que a obtenção de glicose via GLUT-1 da circulação materna não é necessária somente para as funções maternas como também para a proliferação, invasão e implantação do trofoblasto. Considerando esta hipótese e adicionando a possibilidade sugerida por NORTH *et al.* (2001a) que o HEM poderia ser originado de células placentárias embolizadas que alcançam os tecidos fetais, a GLUT-1 poderia ter um papel na proliferação, invasão e implantação das células do HEM. Futuras investigações da participação da GLUT-1 na patogênese do HEM deverão ser realizadas.

As pesquisas direcionadas ao HEM se baseiam na neovascularização ou angiogênese, ou seja, vasos pré-existentes emitindo botões capilares, produzindo novos vasos. Entretanto, o papel da vasculogênese, formação da rede vascular a partir de células endoteliais precursoras – os angioblastos, nos HEM tem sido alvo de pouco estudo. KLEINMAN *et al.* (2003) verificaram que os níveis de células endoteliais precursoras circulantes são aumentados em crianças com HEM e que essas células revelam

positividade para marcadores do HEM (Fc γ receptor II, GLUT-1 e merosina). A partir dessas observações, esses autores sugeriram um papel para as células endoteliais precursoras circulantes na patogênese do HEM, além de postular que níveis aumentados dessas células em crianças com HEM podem contribuir para o rápido crescimento pós-natal deste tumor.

No presente estudo, os casos de VAR de boca foram negativos para GLUT-1. Isto está de acordo com a hipótese de que essas lesões são conseqüentes de alterações estruturais relacionadas com a alteração do tecido de suporte do vaso ou conseqüente a uma alteração no fluxo sanguíneo (ETTINGER e MADERSON, 1974; SOUTHAM e ETTINGER, 1974).

Considerando que o HEM apresenta involução espontânea e que a MV e o GP não apresentam, a distinção entre essas lesões é importante para o tratamento, para o prognóstico e na avaliação de respostas a novas terapias. A decisão de tratamento do HEM deve ser baseada no estágio evolutivo da lesão. O médico deve avaliar se é possível fazer o acompanhamento da lesão até a regressão completa ou determinar se é necessário intervir por causa de uma complicação (sangramento, dor ou problemas estéticos). Por outro lado, MV não apresenta involução espontânea. Então, o médico deve avaliar se a lesão pode causar problemas para o paciente e decidir a abordagem mais adequada (LEON-VILLAPALOS *et al.*, 2005; MO *et al.*, 2004). Como o GP é uma lesão reativa seu tratamento compreende tanto de remoção da lesão quanto do controle do trauma indutor (AL-KHATEEB e ABABNEH, 2003).

O estudo imuno-histoquímico da GLUT-1 é um método diagnóstico discriminante e de fácil aplicabilidade. O diagnóstico preciso das lesões vasculares benignas de boca tem importantes implicações clínicas: 1) o correto tratamento, 2) a adequada comunicação entre a equipe multidisciplinar (dentistas, dermatologistas, patologistas, radiologistas, pediatras e cirurgiões), 3) a compreensão do comportamento biológico dessas lesões, e 4) desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Além disso, é muito importante divulgar o uso deste marcador nas comunidades médica e odontológica.

7 CONCLUSÕES

- 7.1 Nenhum dos casos de lesões vasculares de boca foi imuno-positivo para GLUT-1.
- 7.2 Os 19 casos diagnosticados inicialmente como HEM de boca mostraram negatividade para GLUT-1 sendo reclassificados como GP ou MV de boca, pois o GLUT-1 é um marcador efetivo e importante auxiliar para o diagnóstico das lesões vasculares benignas de boca. A análise histológica não foi suficiente para concluir o diagnóstico de HEM de boca pelo fato de nenhum desses ser HEM verdadeiro.
- 7.3 Todos os casos com classificação inicial de GP e MV foram imuno-negativos para esta proteína, o que demonstrou a eficácia da análise histológica para estas lesões.
- 7.4 As lesões classificadas como VAR de boca foram imuno-negativas para a proteína GLUT-1 nos vasos sanguíneos.

REFERÊNCIAS

1. AL-KHATEEB, T.; ABABNEH, K. Oral pyogenic granuloma in Jordanians: a retrospective analysis of 108 cases. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 61, n. 11, p. 1285-8, Nov. 2003.
2. BEHROOZ, A.; ISMAIL-BEIGI, F. Stimulation of glucose transport by hypoxia: signals and mechanisms. *News Physiol. Sci.*, v. 14, p. 105-10, Jun. 1999.
3. BELL, G.I. *et al.* Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, v. 13, n. 3, p. 198-208, Mar. 1990.
4. BERENQUER, B. *et al.* Rapidly involuting congenital hemangioma: clinical and histopathologic features. *Pediatr. Dev. Pathol.*, v. 6, n. 6, p. 495-510, Nov-Dec. 2003.
5. BERG, J. N. *et al.* Evidence for loss heterozygosity of 5q in sporadic haemangiomas: are somatic mutations involved in haemangioma formation? *J. Clin. Pathol.*, v. 54, n. 3, p. 249-52, Mar. 2001
6. BISCHOFF, J. Monoclonal expansion of endothelial cells in hemangioma: an intrinsic defect with extrinsic consequences? *Trends. Cardiovasc. Med.*, v. 12, n. 5, p. 220-4, Jul. 2002.
7. BOYE, E. *et al.* Clonality and altered behavior of the endothelial cells from hemangiomas. *J. Clin. Invest.*, v. 107, n. 6, p. 745-52, Mar. 2001.
8. BROWN, G. K. Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.*, v. 23, n. 3, p. 237-46, May. 2000.
9. DRUT, R. M.; DRUT, R. Extracutaneous infantile haemangioma is also Glut1 positive. *J. Clin. Pathol.*, v. 57, n. 11, p. 1197-200, Nov. 2004
10. DYDUCH, G.; OKON, K.; MIERZYNSKI, W. Benign vascular proliferations – an immunohistochemical and comparative study. *Pol. J. Pathol.*, v.55, n. 2, p. 59-64, 2004.
11. ENJOLRAS, O.; MULLIKEN, J. B. The current management of vascular birthmarks. *Pediatr. Dermatol.*, v. 10, n. 4, p. 311-33, Dec. 1993.

12. ENJOLRAS, O.; MULLIKEN, J. B. Vascular tumors and vascular malformations (new issues). *Adv. Dermatol.*, v. 13, p. 375-423, 1997.
13. ENJOLRAS, O. *et al.* Noninvoluting congenital hemangioma: a rare cutaneous vascular anomaly. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 107, n. 7, p. 1647-54, Jun. 2001.
14. EPIVATIANOS, A. *et al.* Pyogenic granuloma of the oral cavity: comparative study of its clinicopathological and immunohistochemical features. *Pathol. Int.*, v. 55, n. 7, p. 391-7, Jul. 2005.
15. ETTINGER, R. L.; MADERSON, R. D. A clinical study of sublingual varices. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.38, n.4, p. 540-5, Oct. 1974.
16. FREITAS, T. M. *et al.* Assessment of angiogenic markers in oral hemangiomas and pyogenic granulomas. *Exper. Mol. Pathol.*, v. 79, p. 79-85, Apr. 2005.
17. FRIEDEN, I. J.; ESTERLY, N. B. Pyogenic granulomas masquerading as strawberry hemangiomas. *Pediatrics*, v. 90, n. 6, p. 989-91, Dec. 1992.
18. FISHMAN, S. J.; MULLIKEN, J. B. Hemangiomas and vascular malformations of infancy e childhood. *Pediatr. Clin. North. Am.*, v. 40, n. 6, p. 1177-200, Dec.1993.
19. GESCHICKTER, C. F.; KEASBEY, L.E. Tumors of blood vessels. *Am. J. Cancer*, v.23, n. 3, p. 568-91, Mar. 1935.
20. GLOWACKI, J.; MULLIKEN, J. B. Mast cells in hemangiomas and vascular malformations. *Pediatrics*, v. 70, n. 1, p. 48-51, Jul. 1982.
21. GONTIJO, B.; SILVA, C. M.; PEREIRA, L. P. Hemangioma da infância. *An. Bras. Dermatol.*, v. 78, n.6, p. 651-73, nov. /dez. 2003.
22. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Transporte de íons e de moléculas através da membrana celular. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de fisiologia médica*. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1996. Cap. 4, p. 41-52.
23. HAND, J. L.; FRIEDEN, I. J. Vascular Birthmarks of infancy: resolving nosologic confusion. *Am. J. Med. Genet.*, v.108, n. 4,p. 257-64, Apr. 2002.

24. HERNÁNDEZ, F. *et al.* The role of GLUT1 immunostaining in the diagnosis and classification of liver vascular tumors in children. *J. Pediatr. Surg.*, v. 40, n. 5, p. 801-4, May. 2005.
25. JACKSON, I. T. *et al.* Hemangiomas, vascular malformations, and lymphovenous malformations: classification and methods of treatment. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 91, n. 7, p. 1216-30, Jun. 1993.
26. KLEINMAN *et al.* Increased circulating AC133+ CD34+ endothelial progenitor cells in children with hemangioma. *Lymphat. Res. Biol.*, v. 1, n. 4, p.301-7, 2003.
27. KLEPPER, J.; VOIT, T. Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain- a review. *Eur. J. Pediatr.*, v. 161, n. 6, p. 295-304, Jun. 2002.
28. KORGUN, E. T. *et al.* Do glucose transporters have other roles in addition to placental glucose transport during early pregnancy? *Histochem. Cell Biol.*, v. 123, n. 6, p. 621-9, Jun. 2005.
29. LEON-VILLAPALOS, J.; WOLFE, K.; KANGESU, L. GLUT-1: an extra diagnostic tool to differentiate between haemangiomas and vascular malformations. *Br. J. Plast. Surg.*, v. 58, n.3 , p. 348-52, Apr. 2005.
30. LI, Q. *et al.* Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J. Pathol.*, v. 201, n. 2, p. 296-302, Oct. 2003.
31. LYONS, L. L. *et al.* Kaposiform hemangioendothelioma: a study of 33 cases emphasizing its pathologic, immunophenotypic, and biologic uniqueness from juvenile hemangioma. *Am. J. Surg. Pathol.*, v. 28, n. 5, p. 559-68, May. 2004.
32. MARCHUK, D. A. Pathogenesis of hemangioma, *J. Clin. Invest.*, v. 107, n.6, p.665-6, Mar. 2001.
33. MILLER, R. T. *et al.* Blocking of endogenous avidin-binding activity in immunohistochemistry: the use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. *Appl. Imm. Mol. Morphol.*, v.7, n.1, p. 63-65, 1999.

34. MO, J. Q.; DIMASHKIEH, H. H.; BOVE, K. E. GLUT1 endothelial reactivity distinguishes hepatic infantile hemangioma from congenital hepatic vascular malformation with associated capillary proliferation. *Human Pathol.*, v. 35, n. 2, p. 200-9, Feb. 2004.
35. MULLIKEN, J. B.; ENJOLRAS, O. Congenital hemangiomas and infantile hemangiomas: missing links. *J. Am. Acad. Derm.*, v. 50, n. 6, p. 875-82, Jun. 2004.
36. MULLIKEN, J. B.; FISHMAN, S. J.; BURROWS, P. E. Vascular anomalies. *Curr. Probl. Surg.*, v. 37, n. 8, p. 517-84, Aug. 2000.
37. MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 69, n. 3, p. 412-22, Mar. 1982.
38. MULLIKEN, J. B.; YOUNG, A. E. *Vascular birthmarks: hemangiomas e vascular malformations*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1988, p.41-62 *apud* TAKAHASHI, K. *et al*. Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *J. Clin. Invest.*, v. 93, n. 6 , p. 2357-64, Jun 1994.
39. NEVILLE, B. W. *et al*. Defeitos do desenvolvimento da região maxilofacial e oral. In: NEVILLE, B. W. *et al*. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2004. Cap. 1, p. 13-14.
40. NGUYEN, V. A. *et al*. Infantile hemangioma is a proliferation of beta 4-negative endothelial cells adjacent to HLA-DR-positive cells with dendritic cell morphology. *Hum. Pathol.*, v. 35 n. 6, p. 739-44, Jun. 2004.
41. NORTH, P. E. *et al*. Glut1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Hum. Pathol.*, v. 31, n. 1, p. 11-22, Jan. 2000.
42. NORTH, P. E., *et al*. A unique microvascular phenotype shared by juvenile hemangiomas and human placenta. *Arch. Dermatol.*, v. 137, n. 5, p. 559-70, May. 2001 (a).

43. NORTH, P. E. *et al* Congenital nonprogressive hemangioma: a distinct clinicopathologic entity unlike infantile hemangioma. *Arch. Dermatol.*, v. 137, n. 12, p. 1607-20, Dec. 2001 (b).
44. OLSON AL, PESSIN JE. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 16, p. 235-56, 1996.
45. PAYNE, M. M. *et al*. The precursor to the hemangioma. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 38, n. 1, p. 64-7, Jul. 1966.
46. SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHURMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.*, v. 28, n. 5, p. 364-71, Sep-Oct. 2004.
47. SOUTHAM, J. C.; ETTINGER, R. L. A histologic study of sublingual varices. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 38, n. 6, p. 879-86, Dec.1974.
48. TAKAHASHI, K. *et al*. Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *J. Clin. Invest.*, v. 93, n. 6 , p. 2357-64, Jun 1994.
49. VERY, M. *et al*. Hemangiomas and vascular malformations: analysis of diagnostic accuracy. *Laryngoscope*, v. 112, n. 4, p. 612-5, Apr. 2002.
50. VIRCHOW, R. Angioma in die Krankhaften Geschwülste. Vol 3.Berlin: Hirshwald, 1863: 306-425 apud MULLIKEN, J. B.; GLOWACKI, J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast. Reconstr. Surg.*, v. 69, n. 3, p. 412-22, Mar. 1982.
51. WU, X.; FREEZE, H. GLUT14, a duplication of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*, v. 80, n. 6, p. 553-7, Dec. 2002.
52. YOUNES, M. *et al*. Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage 1 nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer*, v. 80, n. 6, p. 1046-51, Sep. 1997.

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


Parecer nº. ETIC 467/04

Interessado: Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 15 de dezembro de 2004, após análise as solicitações à diligência, o projeto de pesquisa intitulado « **Estudo de uma Série de Casos de Malformações Vasculares e Hemangiomas do Serviço de Patologia e Semiologia da FO-UFMG** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

ANEXO B – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

TITLE: GLUT-1 in oral benign vascular lesions

SHORT TITLE: GLUT-1 and vascular lesions

KEY WORDS: Hemangioma, vascular malformation, varix, pyogenic granuloma, human erythrocyte-type glucose transporter protein.

AUTHORS:

1. Aline Cristina Batista Rodrigues JOHANN, DDS, graduate student¹
2. Juliana Tito SALLA, undergraduate student¹
3. Ricardo Santiago GOMEZ, PhD¹
4. Maria Cássia Ferreira de AGUIAR, PhD¹
5. Bernardo GONTIJO, PhD²
6. Ricardo Alves MESQUITA, PhD¹

¹Department of Oral Surgery, Medicine and Pathology, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

²Department of Dermatology, School of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

ABSTRACT

Aim: To investigate the accuracy of histological diagnosis of oral hemangioma, oral vascular malformation and oral pyogenic granuloma according to immunohistochemical evaluation of the human erythrocyte-type glucose transporter protein (GLUT-1), and to observe the immunoexpression of this protein in oral varix.

Materials and Methods: Immunohistochemistry for GLUT-1 was performed in 93 histologically diagnosed cases of oral benign vascular lesions: 17 vascular malformations, 19 hemangiomas, 9 varix, and 48 pyogenic granulomas. Descriptive analyses were performed.

Results: None of the cases of the oral benign vascular lesions evaluated were immunopositive to GLUT-1. The 19 cases histologically diagnosed as oral hemangioma that showed negative staining to GLUT-1 were reclassified as oral pyogenic granuloma or oral vascular malformations. The histological evaluation itself it is not enough to obtain the correct diagnosis of oral HEM since none of the sample cases were true hemangioma. All sample cases with initial vascular malformation or pyogenic granulomas classification were negative to GLUT-1 what demonstrate the accuracy of histological diagnosis of these lesions itself. Oral varix showed negative staining to GLUT-1 in blood vessels.

Conclusions: GLUT-1 is a useful, effective and important auxiliary marker for the diagnosis of oral benign vascular lesions.

CLINICAL RELEVANCE

This study showed that histological diagnosis alone is not sufficient to correct diagnoses of oral hemangioma. Moreover, immunohistochemistry to GLUT-1 is a useful and easy diagnostic method that may be used to avoid such misdiagnosis. Accurate diagnosis of these oral lesions has an important clinical relevance allowing: 1) corrects management, 2) adequate communication among the multidisciplinary team (dentist, dermatologist, pediatricist, radiologist, pathologist and surgeon), 3) understanding of the biological behavior of the lesions, and 4) facilitate the development of new therapeutic modalities. Thus, it seems warranted to support the use of this marker in medical and dentistry communities.

1. INTRODUCTION

Benign vascular lesions are widely studied in the medical literature, but their classification and nomenclature are divergent. In 1996, the International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) approved a classification system modified from the Mulliken and Glowacki (1982). Vascular diseases were subdivided into (1) tumors: hemangioma (HEM), pyogenic granuloma (PG), rapidly involuting congenital hemangioma (RICH), noninvoluting congenital hemangioma (NICH), hemangiopericytoma, tufted angioma and kaposiform hemangioendothelioma; and (2) vascular malformation (VM) (Enjolras and Mulliken, 1997). HEM, VM, PG and varix (VAR) are benign lesions with a vascular component and are common in the head and neck regions (Southam and Ettinger, 1974; Finn *et al.*, 1983; Epivatianos *et al.*, 2005). HEM, VM and PG have distinct clinical evolution, however histological similarities may be found as well (North *et al.*, 2000; Leon-Villapalos *et al.*, 2005).

HEM is a red macula, mass or swelling that develops during late fetal stages or in infancy, which grows quickly and generally presents spontaneous regression. HEM have three different phases: proliferating, involution, and involuted. Proliferating phase (0 to 1 year of age) corresponds to increased activity and proliferation of endothelial cells with organization of masses showing vascular lumens or not. Involution phase (1 to 7 years of age) is characterized by an initial maturation of blood vessels with the dilatation of vascular lumen and decreased cellular activity. Involved phase is a final maturation of the lesion with a few tiny capillary-like feeding vessels and draining veins lined with flat mature endothelium (Mulliken and Young, 1988; Enjolras and Mulliken, 1997).

VM is an abnormality that occurs during embryonic development, probably caused by disturbance of the signal factors that regulate vascular embryogenesis. VM may be composed of capillaries, veins, arteries, or a combination of those. Mutated genes have been identified as cause of specific inherited forms of venous, arteriovenous and capillary-venous malformations (Vikkula *et al.*, 2001). VM appears at birth and grows in proportion to the development of the patient. VM consists of tortuous blood vessels lined by a continuous

endothelium. HEM, in the involuted phase, can present histological similarities with VM (North *et al.*, 2000; Leon-Villapalos *et al.*, 2005).

VAR is an acquired benign lesion which is related to alteration of the supportive tissue of the vessel or consequence of an alteration of blood flow, and it is constituted by an extensive and tortuous abnormal vein (Southam and Ettinger, 1974). VAR is characterized as a red to purple papule or nodule, commonly found on the tongue, lip or cheek, mainly in the seventh decade of life (Neville *et al.*, 2002).

PG is an inflammatory proliferation of capillary blood vessels. It is characterized as a pink to purple, smooth or lobulated, sessile or pedunculated mass, which does not regress spontaneously and bleeds easily (Epivatianos *et al.*, 2005). HEM with inflammation present histological similarity with PG (Leon-Villapalos *et al.*, 2005).

The histological differential diagnosis among HEM and VM or PG may be difficult. HEM in the involuted phase can present histological similarities to VM, and HEM with inflammation can present histological similarities to PG (North *et al.*, 2000; Leon-Villapalos *et al.*, 2005). Thus, this nosologic difficulty has promoted the necessity of finding an auxiliary marker for HEM: the human erythrocyte-type glucose transporter (GLUT-1).

GLUT-1 is a member of one of fourteen glucose-transport type proteins: GLUT-1 to GLUT-12, HMIT-H⁺-coupled with the myo-inositol transporter and GLUT-14 (Wu and Freeze, 2002). GLUT-1 is a protein constitutively found in the perineurium, microvessels of the brain (blood-brain barrier), germinal centers of lymphoid tissues, eyes, placenta, erythrocytes, fetal membranes, and renal tubules (Younes *et al.*, 1997). North *et al.* (2000, 2001a) identified GLUT-1 as being a specific and sensible immunohistochemical marker of skin HEM in all phases. Others studies verified positive GLUT-1 immunostaining on the HEM of the skin, chorion, liver, mammary and submaxillary glands, and genitalia as well as in isolated cases of oral mucosa (two cases in lip and two in cheek). GLUT-1, which is considered a tool for differential diagnosis with HEM and is undetectable in blood vessels of normal skin and in VM and PG (North *et al.*, 2000, 2001a and 2001b; Mo *et al.*, 2004; Drut and Drut, 2004; Nguyen *et al.*, 2004; Leon-Villapalos *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005).

Two subtypes of congenital HEM (completely formed at birth) are GLUT-1 negative: 1) NICH that do not grow or regress in post-natal life, and RICH that rapidly regress during early infancy (North *et al.*, 2001b; Berenguer *et al.*, 2003; Mulliken and Enjolras, 2004).

In this study, GLUT-1 was selected to evaluate the oral benign vascular lesions for being: 1) widely studied in benign vascular lesions, 2) sensible and specific in the HEM diagnosis, and 3) easily applicable. This antibody identifies the GLUT-1 expression in the HEM with a strong stain in membrane of endothelial cells. Until now, no large study on GLUT-1 immunolocalization in oral benign vascular lesions has been carried out. Nevertheless, there are no reports on immunoexpression of GLUT-1 in VAR.

This study approaches three issues: (1) to verify the accuracy of histological diagnosis of oral HEM, oral VM and oral PG based in immunohistochemistry to GLUT-1; (2) to reclassify the lesions according to GLUT-1 expression; and (3) to investigate the immunoexpression of this glucose transporter in oral VAR.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. INSTITUTIONAL ETHICAL BOARD

The protocol of the study was approved by the Committee of Ethics in Research at the Federal University of Minas Gerais- UFMG (COEP - 467/04).

2.2. SPECIMENS

Specimens with previous histological diagnosis of oral VM (17 cases), oral HEM (19 cases), oral VAR (9 cases) and oral PG (48 cases) were obtained from the files of the Oral Pathology Service of UFMG (Belo Horizonte, Brazil) from 1997 to 2004. The lesions with previous histological diagnosis of oral HEM were not congenital lesions. This information was obtained of the biopsy records. Immunohistochemistry was performed in all cases.

2.3. IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Immunohistochemistry was performed using streptavidin-biotin standard protocol. Sections of 4 μ from routinely processed paraffin embedded blocks were deparaffinized and dehydrated. Specimens were immersed in a 10 mM citrate buffer (pH= 6.0, 30 minutes at 98°C) for antigen retrieval. The avidin/biotin was blocked as determined by Miller *et al.*

(1999). Endogenous peroxidase activity was blocked using 0.3% hydrogen peroxide. Sections were incubated with primary antibody GLUT-1 at a 1:200 dilution (Dako, Carpinteria, CA, A3536) for 18 hours at 4°C. Primary antibody was detected using a LSAB[®]+system, HRP Peroxidase Kit (Dako Corporation, Carpinteria, CA, K0675) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen (DAB, Sigma Chemical, St. Louis, USA, D5637). Erythrocytes and perineurium (Figure 1A) on the oral benign vascular lesion slices were considered internal positive control. Two other positive controls were used: 1) placenta – positive immunoreactivity in erythrocytes, trophoblast and microvascular endothelial cells (Figure 1B); and 2) a case of HEM in involution phase localized on lip of a 2-year-old patient that was GLUT-1 positive in vascular endothelial cells and erythrocytes (Figure 1 C and D).

2.4. ANALYSIS AND RECLASSIFICATION OF THE DISEASES

The diseases were re-evaluated and submitted to histological analyses for reclassification. Considering that the lesions of our sample were not congenital and that GLUT-1 is sensible and specific to HEM, those lesions with negative stain to GLUT-1 and that presented initial diagnosis for oral HEM must be reclassified.

The lesion was classified as oral VM when it was morphologically composed of tortuous blood vessels lined with flat mature endothelium and was immunonegative to GLUT-1 (Mulliken and Young, 1988; Enjolras and Mulliken, 1997; North *et al.*, 2000 and 2001a; Mo *et al.*, 2004; Leon-Villapalos *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005). The disease was classified as oral PG when it was morphologically composed of proliferating endothelial cells organized in capillaries lined by flattened endothelial cells and an acute and chronic inflammatory infiltrate and being immunonegative to GLUT-1 (North *et al.*, 2001a; Epivatianos *et al.*, 2005). The lesion was classified as oral HEM when it showed proliferation of plump endothelial cells organized in masses, forming dilated blood vessels, or when tiny capillary-like feeding and draining vessels lined by flat mature endothelium were seen (Mulliken and Young, 1988; Enjolras and Mulliken, 1997). Immunopositively to GLUT-1 should also be observed (North *et al.*, 2000 and 2001a; Mo *et al.*, 2004; Drut and Drut, 2004; Nguyen *et al.*, 2004; Leon-Villapalos *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005). The disease was classified as oral VAR when

it was morphologically composed of one to three extensive and tortuous blood vessels lined by flat mature endothelium (Southam and Ettinger, 1974).

3. RESULTS

None of the cases of the oral benign vascular lesions evaluated were immunopositive to GLUT-1.

Oral HEM were reclassified as oral PG (9 cases; Figures 1E and F) or oral VM (10 cases; Figures 1G and H). The histological evaluation itself is not sufficient to render the correct diagnosis of oral HEM since none of the sample cases were true HEM.

All sample cases with an initial VM or PG classification were negative for GLUT-1, which corroborates the accuracy of their histological diagnoses.

Oral VAR showed negative staining to GLUT-1 in blood vessels (Figures 1I and J).

4. DISCUSSION

The histological differential diagnosis among oral HEM and VM or PG may be difficult. HEM in the involuted phase can present histological similarities to VM, and HEM with inflammation can present histological similarities to PG (North *et al.*, 2000; Leon-Villapalos *et al.*, 2005). Thus, due to this difficulty, it showed the necessity of finding an auxiliary marker of HEM: GLUT-1.

HEM immunopositive to GLUT-1 was observed in the studies of North *et al.* (2000, 2001a and 2001b), Mo *et al.* (2004), Drut and Drut (2004), Nguyen *et al.* (2004), Hernández *et al.* (2005) and Leon-Villapalos *et al.* (2005).

North *et al.* (2000, 2001a and 2001b) found intense GLUT-1 immunoreactivity in endothelial cells in 100% of skin HEM tested, however, no lesional GLUT-1 expression was found in any VM or PG of skin. Mo *et al.* (2004) identified intense GLUT-1 immunoreactivity in endothelial cells in 100% of liver HEM, and lack staining in liver VM. Drut and Drut (2004) found intense GLUT-1 immunoreactivity in endothelial cells in 100% of HEM in chorion, skin, liver, and in mammary and submaxillary gland. Nguyen *et al.* (2004) showed GLUT-1 immunoreactivity in endothelial cells in 100% of HEM in head (including oral mucosa: two cases in lip and two in cheek), trunk and genitalia. Hernández *et al.* (2005) classified 11

cases of liver vascular tumors based upon GLUT-1 expression despite their histological diagnosis. Afterwards, these authors compared the results of GLUT-1 expression to the histological diagnosis and stated that the histology of GLUT-1 positive tumors corresponded to HEM.

Leon-Villapalos *et al.* (2005) observed intense GLUT-1 immunoreactivity in endothelial cells in 95% of HEM and lack of stain in NICH, VM and PG. These authors believed that the unique case of HEM GLUT-1 negative may have lost GLUT-1 expression with the evolution. However, this postulation contradicts the consecrated findings by North *et al.* (2000 and 2001a) and Mo *et al.* (2004) who founded GLUT-1 positive staining in all phases of HEM development.

The immunohistochemical study of GLUT-1 is a discriminant and easy diagnostic method (North *et al.*, 2000 and 2001a; Leon-Villapalos *et al.*, 2005). Accurate diagnosis of these oral lesions has important clinical relevance for it allows: 1) correct management, 2) adequate communication among the multidisciplinary team (dentist, dermatologist, pediatricist, radiologist, pathologist and surgeon), 3) biologic behavior understanding of these lesions, and 4) development of new therapeutic modalities. Hence, it is very important to advocate the use of this marker in medical and dental communities.

In our study, oral VAR were negative to GLUT-1. It is in accordance with the hypothesis that these lesions are consequent of structural alterations (Southam and Ettinger, 1974).

North *et al.* (2001a) proposed that the presence of GLUT-1 in HEM and in placental microvessels suggests two possible pathogenic mechanisms of HEM: 1) the aberrant differentiation of angioblasts toward the placental microvascular phenotypes within fetal tissues, or 2) an origin from embolized placental cells that reach fetal tissues through right-to-left shunts observed in normal fetal circulation.

Considering that HEM has spontaneous involution and VM and PG do not, the distinction among these lesions is important for management, prognosis and assessment in response to therapies. The decision of treatment of HEM may be based on the lesion

evolution. The clinician must evaluate if it is possible to follow up the patient's lesion throughout the whole involution stage, or determine if intervention is necessary due to possible complications (bleeding, pain, and esthetical problems). Moreover, VM does not present spontaneous involution. Thus, the clinician must evaluate if the lesion may cause problems to the patient and decide upon the most appropriate approach (Mo *et al.*, 2004; Leon-Villapalos *et al.*, 2005). As PG is a reactive lesion, the treatment comprises both the ablation of the lesion and controlling the inducing trauma (Al-Khateeb and Ababneh, 2003).

In conclusion, GLUT-1 is a useful, easy and important auxiliary marker for the diagnosis of oral benign vascular lesions.

REFERENCES

- Al-Khateeb T, Ababneh K (2003). Oral pyogenic granuloma in Jordanians: a retrospective analysis of 108 cases. *J Oral Maxillofac Surg* **61**: 1285-1288.
- Berenguer B, Mulliken JB, Enjolras O, Boon LM, Wassef M, Josset P *et al.* (2003). Rapidly involuting congenital hemangioma: clinical and histopathologic features. *Pediatr Develop Pathol* **6**:495-510.
- Drut RM, Drut R (2004). Extracutaneous infantile haemangioma is also Glut1 positive. *J Clin Pathol* **57**:1197-1200.
- Enjolras O, Mulliken JB (1997). Vascular tumors and vascular malformations (new issues). *Adv Dermatol* **13**: 375-423.
- Epivatianos A, Antoniadis D, Zaraboukas T, Zairi E, Pouloupoulos A, Kiziridou A *et al.* (2005). Pyogenic granuloma of the oral cavity: comparative study of its clinicopathological and immunohistochemical features. *Pathol Int* **55**: 391-397.
- Finn MC, Glowacki J, Mulliken JB (1983). Congenital vascular lesions: clinical application of a new classification. *J Pediatr Surg* **18**: 894-900.
- Hernández F, Navarro M, Encinas JL, Lopez Gutierrez JC, Lopez Santamaria M, Leal N *et al.* (2005). The role of GLUT1 immunostaining in the diagnosis and classification of liver vascular tumors in children. *J Pediatr Surg* **40**: 801-804.
- Leon-Villapalos J, Wolfe K, Kangesu L (2005). GLUT-1: an extra diagnostic tool to differentiate between haemangiomas and vascular malformations. *Br J Plast Surg* **58**: 348-352.
- Miller RT, Kubier PHT, Reynolds BHT, Henry TB, Turnbow HB (1999). Blocking of Endogenous Avidin-Binding Activity in Immunohistochemistry: The Use of Skim Milk as an Economical and Effective Substitute for Commercial Biotin Solutions. *Appl Imm M M* **7**: 63-65.
- Mo JQ, Dimashkieh HH, Bove KE (2004). GLUT1 endothelial reactivity distinguishes hepatic infantile hemangioma from congenital hepatic vascular malformation with associated capillary proliferation. *Hum Pathol* **35**: 200-209.

- Mulliken JB, Enjolras O (2004). Congenital hemangiomas and infantile hemangiomas: missing links. *J Am Acad Derm* **50**:875-82.
- Mulliken JB, Glowacki J (1982). Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast Reconstr Surg* **69**: 412-422.
- Mulliken JB, Young AE (1988). *Vascular birthmarks: hemangiomas and vascular malformations*. WB Saunders Company: Philadelphia, p.41-62.
- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE (2002). *Oral & Maxillofacial Pathology*. 2nd edition. WB Saunders: Philadelphia, p. 467-471.
- Nguyen VA, Furhapter C, Romani N, Weber F, Sepp N (2004). Infantile hemangioma is a proliferation of beta 4-negative endothelial cells adjacent to HLA-DR-positive cells with dendritic cell morphology. *Hum Pathol* **35**:739-744.
- North PE, Waner M, Mizeracki A, Mihm MC (2000). Glut1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Hum Pathol* **31**:11-22.
- North PE, Waner M, Mizeracki A, Mrak RE, Nicholas R, Kincannon J *et al.* (2001a). A unique microvascular phenotype shared by juvenile hemangiomas and human placenta. *Arch Dermatol* **137**: 559-570.
- North PE, Waner M, James CA, Mizeracki A, Mihm MC (2001b). Congenital nonprogressive hemangioma: a distinct clinicopathologic entity unlike infantile hemangioma. *Arch Dermatol* **137**:1607-1620.
- Southam JC, Ettinger RL (1974). A histologic study of sublingual varices. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **38**: 879-886.
- Vikkula M, Boon LM, Mulliken JB (2001). Molecular genetics of vascular malformations. *Matrix Biol* **20**: 327-335.
- Wu X, Freeze H (2002). GLUT14, a duplication of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* **80**: 553-557.

Younes M, Brown R, Stephenson M, Gondo M, Cagle PT (1997). Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage 1 nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* **80**:1046-1051.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. ACM GUEDES for providing the case of HEM immunopositive to GLUT-1 and Dr. AMA LANA for providing the placenta tissue. This study was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. RS GOMEZ, MCF AGUIAR and RA MESQUITA are research fellows of CNPq.

LEGEND

FIGURE 1

(A) Control to GLUT-1: positive erythrocytes and perineurium (Streptavidine-biotine, X400 magnification).

(B) Control to GLUT-1 positive vessels and trophoblastic cells of placenta tissue (Streptavidine-biotine, X200 magnification).

(C) HEM control was characterized by a great number of vessels (covered by cells with rounded nuclei, in detail) exhibiting an initial maturation with the dilatation of vascular lumen (Hematoxylin-eosin, X200 magnification).

(D) GLUT-1 was positive in vascular endothelial cells, erythrocytes and perineurium of HEM control, in detail (Streptavidine-biotine, X200 magnification).

(E) Oral PG organized in lobular arrangement of capillaries covered by cells with rounded nuclei and scarce cytoplasm, in detail (Hematoxylin-eosin, X200 magnification).

(F) GLUT-1 was negative in oral PG vessels but positive in erythrocytes, in detail. It was initially diagnosed as proliferating phase HEM but was reclassified as PG after immunohistochemistry (Streptavidine-biotine, X200 magnification).

(G) Oral VNM was characterized by tortuous blood vessels lined by a flat mature endothelium, in detail (Hematoxylin-eosin, X200 magnification).

(H) GLUT-1 was shown to be negative in oral VNM vessels but positive in erythrocytes, in detail. It was initially diagnosed as involuted phase HEM but was reclassified as VNM after immunohistochemistry (Streptavidine-biotine, X200 magnification).

(I) Oral VAR was characterized by an extensive and tortuous abnormal vein lined with a flat mature endothelium, in detail (Hematoxylin-eosin, X200 magnification).

(J) GLUT-1 was shown to be negative in oral VAR vessels but positive in erythrocytes, in detail (Streptavidine-biotine, X200 magnification).

ANEXO C – ACEITE DA REVISTA ORAL DISEASES

From: editor@bethesdaoralmed.com
 To: ramesquita@ufmg.br
 Cc: amy.mccallum@oxon.blackwellpublishing.com
 Subject: Oral Diseases - Decision on Manuscript ODI-09-05-OM-0223.R2
 Body: 05-Jan-2006

Dear Prof. Mesquita,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "GLUT-1 in oral benign vascular lesions" in its current form for publication in Oral Diseases, with only some minor editorial changes. One reviewer stated the following:

"Thank you for revising the manuscript. Although the copy editor will, undoubtedly, amend the minor grammatical errors that persist, upon second thought, I want to highlight two additional passages that I think should be rewritten to ensure their meanings are clearly stated:

(page 3) "Thus, it is of great importance to spread the use...."

Should read "Thus, it seems warranted to support the use...."

(page 7) "The disease was classified as oral PG when it was morphologically composed by...."

Should read "The lesion was classified as oral PG when it was morphologically composed of...."

The last revision is actually a revision of the more recent rewrite:

(page 9) "...that the histology of GLUT-1 positives tumors...."

Should read "...that the histology of GLUT-1 positive tumors...."

If you agree, please email Ms. Amy McCallum, copied on this email, and say so, and ask her to make the changes (thanks very much, Amy).

In order to proceed with the publication process, and, if you haven't done so already, I would be very grateful if you could please make sure that you have completed an Exclusive Licence Form (http://www.blackwellpublishing.com/pdf/copyright_ODI.pdf), which should be returned to:

Oral Diseases Editorial Office
 Blackwell Publishing Ltd
 9600 Garsington Road
 Oxford OX4 2DQ
 UK

For any colour figures could you kindly complete and return the Colour Work Agreement Form (http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf) to Fiona McLeod in the Production Office please:

Fiona McLeod
 Production Editor
 Professional Division
 Blackwell Publishing
 101 George Street
 Edinburgh
 EH2 3ES
 UK
 Fax: +44 (0) 131 226 3803

Thank you again for your fine contribution. On behalf of the Editors of Oral Diseases, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Yours sincerely,

Prof. Bruce Baum
 Co-Editor, Oral Diseases

Date Sent: 05-Jan-2006

LEGENDA

Figura 1 (A) Controle interno positivo para GLUT-1: eritrócitos e perineuro positivos (estreptavidina-biotina, 400x). (B) Controle positivo para GLUT-1: vasos e células trofoblásticas da placenta positivos (estreptavidina-biotina, 200x). (C) O HEM controle foi caracterizado por um grande número de vasos (revestidos por células de núcleo arredondado, em detalhe) exibindo uma maturação inicial com dilatação do lúmen vascular (HE, 200x). (D) O HEM controle foi positivo para GLUT-1 nas células endoteliais, eritrócitos e perineuro, em detalhe (estreptavidina-biotina, 200x). (E) Um caso de GP de boca revelando numerosos capilares revestidos por células de núcleo arredondado e citoplasma escasso (em detalhe) organizado em lóbulos (HE, 200x). (F) Os vasos do GP de boca revelaram negatividade para GLUT-1, no entanto positividade foi visualizada nos eritrócitos, em detalhe. Este caso foi inicialmente diagnosticado como HEM na fase proliferativa, sendo reclassificado como GP de boca após a imuno-histoquímica (estreptavidina-biotina, 200x). (G) Um caso de MV venosa de boca caracterizado por vasos sanguíneos tortuosos delimitados por um endotélio maduro, em detalhe (HE, 200x). (H) A MV venosa de boca foi negativa para GLUT-1 nos vasos, no entanto, positividade em eritrócitos foi observada, em detalhe. Este é um caso inicialmente diagnosticado como HEM na fase involuída que foi reclassificado como MV venosa de boca após a imuno-histoquímica (estreptavidina-biotina, 200x). (I) Um caso de VAR de boca caracterizado por uma veia extensa, tortuosa e anormal delimitada por um endotélio maduro, em detalhe (HE, 200x). (J) VAR de boca apresentou-se negativa para GLUT-1 nos vasos e positiva nos eritrócitos, em detalhe (estreptavidina-biotina, 200x).