

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL DE MORFOLOGIE
MICROSCOPICĂ/HISTOLOGIE**

HEREDEA C. RODICA ELENA



TEZĂ DE DOCTORAT
TUMORILE VASCULARE LA COPII. RAFINAREA
DIAGNOSTICUL CU IMPACT TERAPEUTIC ÎN
MODEL CLINICO-PATOLOGIC ȘI EXPERIMENTAL
-REFERAT-

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. ANCA MARIA CÎMPEAN

Timișoara
2020

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	V
Lista abrevierilor	VI
Indexul figurilor	IX
Indexul tabelelor	XII
Mulțumiri.....	XIII
INTRODUCERE	XV
MOTIVAȚIE	XVI

PARTEA GENERALĂ

1. SCURT ISTORIC. ASPECTE CLINICE, IMAGISTICE ȘI HISTOPATOLOGICE	1
2. CELULA ENDOTELIALĂ ȘI VASELE CAPILARE.....	4
2.1. Aspecte histologice și ultrastructurale ale celulei endoteliale	4
2.2. Heterogenitatea morfologică și moleculară a celulelor endoteliale	9
2.3. Capilarele: tipuri, structură, particularități dependente de organ.....	13
3. TUMORILE VASCULARE LA COPIL.....	18
3.1. Clasificarea clinică	18
3.2. Controverse și certitudini privind evaluarea histopatologică	24
3.3. Corelații cu datele clinice și imagistice	33
3.4. Evaluarea critică a profilului molecular al hemangioamelor la copii cu implicații în terapia personalizată	35

PARTEA SPECIALĂ

4. PACIENȚI, MATERIAL ȘI METODE	37
4.1. Procesarea primară	37
4.2. Metode de colorare.....	38
4.2.1. Metode morfologice	38
4.2.2. Metode histochimice	39
4.2.2.1. Colorația tricromă Masson	39

4.2.2.2. Reacția PAS.....	40
4.2.3. Metode imunohistochimice.....	40
4.3. Metode de cuantificare celulară	44
5. CARACTERIZAREA EPIDEMIOLOGICĂ, CLINICĂ ȘI STATISTICĂ A CAZURILOR INCLUSE ÎN STUDIU	45
6. CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A FORMELOR RARE DE MALFORMAȚII VASCULARE	52
6.1. Limfangiomul intestinal: malformație sau tumoră vasculară incomplet caracterizată molecular	52
6.2. Malformațiile vasculare cu localizare la nivelul timusului.....	61
7. DIFERENȚELE EXPRESIEI GENICE ALE CĂII VEGF EVALUATE PRIN TEHNICA TAQMAN ÎNTRE HEMANGIOAMELE INFANTILE PROLIFERATIVE ȘI HEMANGIOAMELE INFANTILE INVOLUTIVE	82
7.1. Motivație	82
7.2. Material și metode	83
7.2.1. Extracția ARN și sinteza cADN	83
7.3. Rezultate	85
7.4. Discuții.....	89
7.5. Concluzii.....	93
8. STUDIUL INTERRELAȚIEI GLUT1 CU ALȚI MARKERI DE PROGNOSTIC ÎN MALFORMAȚIILE VASCULARE INFANTILE.....	95
8.1. Motivație	95
8.2. Rezultate	96
BIBLIOGRAFIE	109
ANEXE	I

Cuvinte cheie: hemangiom, tumori vasculare, celula endotelială, profil molecular, infantil.

INTRODUCERE

Mult timp clasificarea anomaliilor vasculare a fost confuză, termenul de "angiom" a fost utilizat eronat, fiind folosit atât pentru tumorile vasculare cât și pentru malformațiile vasculare. Din nefericire și în prezent sunt discordanțe între clasificarea clinică și cea histopatologică. Există o mare diversitate de tumori vasculare la copii, multe dintre acestea sunt benigne, limitate, unele pot avea un caracter agresiv local sau pot recidiva după excizie, mai rar apar leziuni cu grad scăzut de malignitate, cu potențial de metastazare sau cu o evoluție fatală.

Hemangioamele infantile apar între 2 săptămâni și 2 luni de viață, prezintă o fază de creștere proliferativă până ajung la dimensiunea lor completă, în timp ce hemangioamele congenitale se disting prin faptul că sunt formate în întregime la naștere. Hemangioamele infantile hepatice, care sunt identice din punct de vedere patologic cu cele situate la nivelul tegumentului sau în alte organe, au fost considerate hemangioendothelioame infantile sugerând în mod eronat că ar avea o patologie distinctă. Studiile histologice au arătat că leziunea care a fost cunoscută sub denumirea de "hemangiom" al ficatului și al vertebrei la adulți, precum și hemangiomul cavernos orbital sunt mai mult malformații venoase decât neoplasme.

Este binecunoscut faptul că hemangiomul infantil este cea mai cunoscută tumoră a copilăriei (incidență de 5-10%), constituită din proliferare de celule endoteliale și pericite. Evoluția hemangioamelor este imprevizibilă, cele mai multe regresează spontan, doar aproximativ 10% sunt distructive, desfigurante și pun în pericol viața pacientului; factorii care determină progresia, regresia precum și heterogenitatea răspunsului la terapia convențională nu sunt cunoscuți în totalitate. Toate acestea se datorează lipsei profilului molecular personalizat pentru fiecare tip de hemangiom.

Mai multe studii demonstrează utilitatea clasificării ISSVA, datorită confuziilor frecvente cu privire la diagnosticul și tratamentul hemangioamelor. Toate acestea se datorează folosirii generalizate a termenului de "hemangiom" pentru un număr mare de leziuni vasculare. Studiile recente au furnizat unele date despre patogenезa acestor tumori vasculare, conducând spre o mai bună înțelegere a neovascularizației din evoluția hemangiomului, evidențiind două mecanisme patogenice principale: angiogeneza și vasculogeneza. Există studii care au încercat să realizeze un profil angiogenic al celulei edoteliale din hemangioame, dar până în prezent în practică nu a fost posibilă implementarea unei terapii țintite.

MOTIVAȚIE

Hemangioamele infantile și congenitale încă reprezintă o provocare atât pentru chirurgul pediatric cât și pentru pediatru. Medicul pediatru instituie terapia hemangioamelor infantile cu totul aleator, bazându-se doar pe anamneza, dar și pe localizarea hemangiomului. De cele mai multe ori hemangioamele apărute în zonele în care capacitatea de extensie este limitată se tratează prin terapie chirurgicală pentru a evita punerea vieții pacientului în pericol. În prezent indiferent de modul de aplicare rezultatele obținute sunt controversate, motiv pentru care în prezent, cu excepția terapiei chirurgicale nici un alt tratament nu este standardizat în hemangioamele infantile și congenitale. Din acest motiv numeroase alte terapii adjuvante au fost testate.

Numeroase criterii de evaluare a terapiei cu propranolol sunt încercate în practica pediatrică pornind de la doza recomandată până la modul de regresie sau vârsta de la care poate fi administrată.

Recent clasificarea histopatologică a hemangioamelor a fost revizuită, dar cu toate acestea nu au putut fi explicate recidivele apărute după întreruperea terapiei medicamentoase adjuvante sau combinate. În prezent o clasificare moleculară a hemangioamelor este practic inexistentă și în consecință o terapie ținută a hemangioamelor infantile și congenitale nu este posibilă în prezent. Un alt aspect controversat și neelucidat, în consecință neexploatat din punct de vedere terapeutic este reprezentat de expresia și rolul markerilor limfatici în hemangioamele infantile și congenitale. Se pare că expresia markerilor limfatici este variabilă, dependentă de topografia hemangioamelor, dar și de stadiul evolutiv.

Nu există date în literatură referitoare la expresia genică diferită în axul VEGF între hemangiomele tratate și netratate. Pe baza celor argumentate mai sus prezentul studiu își propune următoarele obiective:

1. Analiza statistică a hemangioamelor infantile și congenitale în zona de vest a țării.
2. Expresia markerilor vasculari sangvini și limfatici în hemangioamele infantile și congenitale, primare și recidivante.
3. Rolul Prox1, PDGF-BB, CLIC1 în raport cu expresia GLUT1 bine studiată în hemangioamele infantile pentru identificarea unor noi factori de prognostic și terapeutici.
4. Evaluarea proteică și moleculară a expresiei genice a axului VEGF în hemangioamele involutive versus proliferative
5. Imunofenotipizarea hemangioamelor cu localizare particulară rar întâlnite în practica medicală.

PARTEA GENERALĂ

În decursul timpului au fost descrise semne vasculare din naștere, numeroase figuri celebre au prezentat anomalii vasculare. În anul 460 îHr apare prima descriere a unei anomalii vasculare când este descoperit un anevrism arterial de către Hipocrate.

Pe parcursul anilor 1950-1960 celulele endoteliale au înregistrat o etapă importantă în microscopia electronică. Prezența organelor specifice de tipul corpusculilor Weibel-Palade sau existența veziculelor plasmalemale denumite ulterior caveole sunt doar câteva din aspectele ultrastructurale descrise în acea perioadă.

În decursul timpului au existat o serie de clasificări ale anomaliilor vasculare, unele dintre acestea nu au reușit să facă o corelare între clasificarea clinică și cea histologică, motiv pentru care au apărut o serie de confuzii. Acuratețea diagnosticului este foarte importantă pentru evaluare și management, uneori diagnosticul este unul interdisciplinar, deoarece implică o stânsă colaborare între specialități chirurgicale și medicale.

De obicei clasificarea de referință pentru tumori sau leziuni tumoral-like este cea a Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), dar în cazul leziunilor vasculare există inconsecvențe în clasificare și nomenclatură. Pornind de la clasificarea lui Mulliken și Glowacki, la Roma în iunie 1996, ISSVA a introdus și adoptat clasificarea binară "biologică".

Investigațiile imagistice în tumorile vasculare sunt folosite pentru a demonstra implicarea viscerală, programarea exciziei chirurgicale, evaluarea eficacității tratamentului și/sau evidențierea eventualelor leziuni asociate.

Studiul anomaliilor vasculare a dus la identificarea genelor și a patternului genetic care la rândul lor au un rol important în dezvoltarea unor terapii specifice.

Au fost documentate diferite metode de tratare a hemangioamelor infantile, inclusiv așteptarea și urmărirea leziunii, terapia cu laser, terapia prin medicamente, scleroterapia, radioterapia, chirurgia și așa mai departe, dar niciuna dintre aceste terapii nu poate fi utilizată pentru toate hemangioamele. Pentru a obține cele mai bune rezultate de tratament, protocolul de tratament trebuie individualizat și cuprinzător, precum și secvențial.

Tratamentul hemangioamelor trebuie individualizat în funcție de: tipul leziunii, localizare, dimensiune, adâncime, stadiul de creștere și evoluția leziunii. Până în prezent nici una din terapiile disponibile nu este considerată a fi terapia standard. Acest aspect reprezintă un punct de pornire pentru identificarea unor noi ținte terapeutice specifice care să preserve celulele endoteliale normale și să determine regresia hemangiomului în special a celor recidivante și a celor cu o rată crescută de proliferare.

PARTE SPECIALĂ

În studiul de față au fost evaluate 50 de cazuri. Fragmentele bioptice au fost prelevate prin intervenție chirurgicală de la pacienți internați la Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii "Louis Țurcanu" Timișoara în perioada 2014-2019. Fragmentele de țesut prelevate s-au încadrat în limitele dimensiunilor standard, având sub 1cm³. Prelevarea a fost urmată de fixarea și prelucrarea fragmentelor, iar la final blocurile de parafină au fost secționate și pregătite pentru colorare. Evaluarea preparatelor colorate morfologic a fost urmată de selecția cazurilor pentru colorațiile histochimice și imunohistochimice.

CARACTERIZAREA EPIDEMIOLOGICĂ, CLINICĂ ȘI STATISTICĂ A CAZURILOR INCLUSE ÎN STUDIU

Au fost studiate un număr de 50 de anomalii vasculare care provin de la copii internați cu vârsta între 2 luni și 17 ani. Cazurile studiate se împart, conform clasificării ISSVA 2014, în tumori vasculare (41 cazuri) și malformații vasculare simple (9 cazuri). Tumorile vasculare sunt reprezentate de hemangioame (33 cazuri), glomangioame (2 cazuri), granuloame piogene (5 cazuri) și de un hemangioendoteliom kaposiform.

Tumorile vasculare sunt localizate cel mai frecvent la nivelul trunchiului și regiunii capului sau gâtului, pe când malformațiile arterio-venoase se întâlnesc frecvent la nivelul membrelor.

În funcție de caracterele histopatologice și de intensitatea expresiei PROX1 hemangioamele infantile au fost împărțite în patru categorii: hemangioame în fază proliferativă, hemangioame în fază involutivă incipientă, hemangioame în fază involutivă avansată și hemangioame involuate.

Intensitatea reacției PROX1 este maximă în hemangiomul involuat și cel muscular, iar la hemangiomul în fază proliferativă este negativă.

Expresia PDGF B este variabilă în hemangioamele de tip infantil, astfel în faza proliferativă majoritatea au intensitatea reacției 1 (5 cazuri) și un singur caz are intensitatea 3, probabil este vorba de o fază de proliferare tardivă. Intensitatea reacției este variabilă pe măsură ce evoluează hemangiomul, majoritatea celor involuate prezintă un maxim de intensitate al reacției. Tot o intensitate maximă a reacției PDGF B se identifică și în cazul malformațiilor arterio-venoase.

În cazurile studiate au fost două cazuri de hemangioame tratate. În cel tratat cu propranolol intensitatea reacției PROX este de 3, a fost considerat un hemangiom care involuează. Cel de-al doilea caz este un hemangiom proliferativ tratat cu propranolol (fără a avea rezultate, a crescut și a ulcerat),

care a fost excizat chirurgical, cauterizat după care a recidivat, reacția PROX1 este negativă.

Din cele 50 de cazuri studiate, cele mai multe cazuri au fost identificate la sexul feminin (25 cazuri), limfangiomul și hemangiomul intramuscular s-au evidențiat în rândul populației feminine, iar granulomul piogen la băieți.

Hemangioamele în fază proliferativă și involutivă incipientă au fost diagnosticate la copii cu vârste cuprinse între 2 luni și doi ani, majoritatea au fost evidențiate în primul an de viață. Modificări corespunzătoare unui hemangiom în fază involutivă avansată sau involuat apar încă din primul an de viață și au fost regăsite până la vârsta de 12 ani. Cel mai tânăr pacient care a fost diagnosticat cu hemangiom intramuscular a avut 4 ani, iar cel mai mare 17 ani. Malformația arterio-venoasă a fost identificată la copii mai mari de 2 ani.

CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A FORMELOR RARE DE MALFORMAȚII VASCULARE

Tumorile vasculare rare de tipul limfangiomului intestinal sau a hemangiomului timic sunt rar raportate în literatură și cu atât mai puțin evaluate din punct de vedere al fenotipului imunohistochimic și molecular. În cadrul studiului despre hemangioame pe care ni l-am propus în această teză de doctorat am considerat util inserarea a două tumori rare ca limfangiomul intestinal și hemangiomul timic cu o atenție deosebită nu pe raportarea ca atare a cazului ci pe imunofenotipizarea celor două tipuri de tumori vasculare, în special pentru factorii de creștere și receptorii corespondenți implicați în procesele de angiogeneză și limfangiogeneză, aspecte puțin studiate în tumorile vasculare și cu atât mai puțin în formele cu localizare rară a acestora.

Datele obținute de noi au demonstrat existența unui proces angiogenic și limfangiogenic activ atât prin expresia factorilor de creștere de tipul VEGF și PDGF dar și prin aspectele morfologice observate precum și prin expresia factorilor de transcripție de tip Prox1 prezenți în ambele tipuri de tumori vasculare.

LIMFANGIOMUL INTESTINAL: MALFORMAȚIE SAU TUMORĂ VASCULARĂ INCOMPLET CARACTERIZATĂ MOLECULAR

Am prezentat un caz de limfangiom mezenteric multichistic, entitate vasculară extrem de rară la copii și extrem de versatilă din punct de vedere al diagnosticului clinic în absența evaluărilor imagistice, putând fi foarte ușor

confundată cu o apendicită acută. Profilul genetic normal al pacientei ne-a obligat să discutăm în mod critic alte ipoteze referitoare la originea limfangioamelor, la statusul LEC, la rolul Prox 1 în patogeniza limfangioamelor, precum și la revizuirea literaturii în ceea ce privește expresia VEGFR 3 și a PDGFR beta în astfel de leziuni, aceștia fiind cel mai probabil vizați în viitor ca potențiale ținte terapeutice specifice în tratamentul limfangioamelor.

Rezultatele obținute de noi au demonstrat existența unor LEC imature și activate prin prisma faptului că majoritatea dintre ele exprimau Prox 1. Legat de cazul nostru și corelat cu un indice de proliferare înalt pe care l-am observat la nivelul endoteliului limfatic al hemangiomului putem concluziona că această malformație (tumoră) vasculară reprezintă o leziune activă care conține LEC activate ce ar putea reprezenta o sursă de celule care pot fi responsabile de recidivele descrise, cei drept sporadic, ale limfangioamelor. Din acest motiv considerăm că utilizarea Prox1 combinat cu Ki-67 ar trebui să reprezinte o evaluare de rutină a limfangioamelor, expresia acestora putând fi considerată ca un factor de prognostic sugestiv pentru o posibilă apariție a recidivelor.

MALFORMAȚIILE VASCULARE CU LOCALIZARE LA NIVELUL TIMUSULUI

Malformațiile vasculare cu localizare la nivelul timusului reprezintă un grup de tumori vasculare rare, în prezent fiind menționate în literatură doar 16 cazuri la nivel mondial.

Un aspect particular a fost acela al implicării celulelor stromale timice în patogeniza hemangiomului timic. Am remarcat că, numărul celulelor stromale timice CK pozitive s-a redus semnificativ, invers proporțional cu numărul structurilor pseudovasculare din componența hemangiomului, distribuția, morfologia și interrelația cu structurile capilare din jur ale celulelor epiteliale stromale timice au fost înalt sugestive pentru procesul de transdiferențiere din celule stromale epiteliale timice în celule endoteliale capabile să tapeteze structurile pseudovasculare din cadrul hemangiomului timic.

Lucrarea de față este prima care menționează implicarea vaselor limfatice în hemangioamele timice precum și dinamica celor doi markeri studiați, cel de diferențiere spre linia limfatică (Prox1) și cel de identificare a vaselor limfatice diferențiate (D2-40). Rolul lor în hemangioamele timice nu este certificat în literatură în acest moment.

CONCLUZII

Identificarea expresiei unor markeri limfangiogenici în limfangioamele intestinale sau cu o altă localizare deschide perspectiva aplicării terapilor țintite care să eludeze terapiile chirurgicale în cazul în care acestea nu sunt stringent necesare pentru îndepărtarea acestor malformații.

1. Studiul de față susține aplicarea evaluării extinse a malformațiilor vasculare la copil, ca bază pentru o viitoare clasificare moleculară care să includă factori de prognostic și terapeutici precum și factori predictivi pentru posibilele recidive.
2. Evaluarea factorilor de creștere de familia VEGF și PDGF trebuie să facă parte obligatoriu din bateria de teste de evaluare inițială a hemangioamelor dat fiind faptul că acestea reprezintă principalele două căi de semnalizare.
3. Dubla imunocolorare CD34/CK-HMW a demonstrat diminuarea numărului de celule epiteliale stromale direct proporțional cu creșterea numărului de structuri capilare ale formațiunii tumorale.
4. Datele noastre susțin posibilitatea transdiferențierii celulelor epiteliale stromale în celule endoteliale, și participarea activă a acestora la procesul de angiogeneză din astfel de leziuni.
5. Hemangiomul timic conține celule cu capacitatea de diferențiere spre linia limfatică, aspect neraportat în literatură pînă în acest moment. S-a identificat o diferență semnificativă în expresia Prox1 între ariile diferențiate și slab diferențiate precum și între numărul celulelor Prox1 pozitive și microdensitatea vasculară limfatică decelată cu D2-40.

DIFERENȚELE EXPRESIEI GENICE ALE CĂII VEGF EVALUATE PRIN TEHNICA TAQMAN ÎNTRE HEMANGIOAMELE INFANTILE PROLIFERATIVE ȘI HEMANGIOAMELE INFANTILE INVOLUTIVE

Terapia cu propranolol este larg aplicată în hemangioamele infantile dar cu rezultate variabile și uneori cu apariția recidivelor post terapie. Tot mai vehiculată este ipoteza unei angiogeneze exagerate ca prim mecanism patogenic de producere a hemangioamelor.

Am considerat importante pentru evaluare 30 din cele 40 de gene incluse în kitul de TaqMan Array. Amplificarea genică a VEGF A și VEGF C a fost prezentă în ambele probe, supraexpresia genică fiind prezentă pentru ambele tipuri de hemangioame.

CONCLUZII

1. Analiza genică a căii VEGF prin tehnica TaqMan Array a fost aplicată comparativ pentru hemangioamele infantile involutive și proliferative pentru a identifica factori de prognostic nefavorabili și predictivi pentru recidivă în hemangioamele involutive.
2. Prezentul studiu a identificat amplificare genică pentru 11 gene al căii VEGF în hemangiomul infantil involutiv versus 22 gene pentru hemangiomul infantil proliferativ. Toate cele 11 gene amplificate în hemangiomul involutiv au fost de asemenea amplificate și în hemangiomul infantil proliferativ.
3. În hemangiomul infantil involutiv rămâne acitvată calea MAPK/AKT1.
4. De asemenea, familia proteinelor de șoc (Hsp27 și HSp90 alpha) este activată în hemangiomul involutiv
5. KDR a fost neamplificat în hemangiomul involutiv în ciuda supraexpresiei VEGF ceea ce susține posibila recidivă pe seama altor mecanisme angiogenice.
6. Calea MAPK poate fi responsabilă de cauza recidivelor din hemangioamele involutive.
7. MAPK14, MAP2K2 și MAP2K6 au fost identificați ca principalii promotori ai statusului activ al celulelor endoteliale.
8. ACTG1 și ACTG2 împreună cu ACTB au păstrat supraexpresia în hemangiomul involutiv și pot fi considerate ca un factor favorizant al recidivelor în anumite condiții de stress.
9. Amplificarea ACTG1 și ACTG2 în hemangioamele involutive sugerează de asemenea existența unui pol de celule stem cu o capacitate crescută de reactivare precum și posibilitatea tranziției epitelio-mezenchimale.
10. Două gene au fost identificate în premieră ca fiind supraexprimate în hemangiomul involutiv HSP90 alpha și BAD. Rolul lor în hemangiomaele involutive și proliferative nu a fost raportat până în prezent în literatură.

8. STUDIUL INTERRELAȚIEI GLUT1 CU ALȚI MARKERI DE PROGNOSTIC ÎN MALFORMAȚIILE VASCULARE INFANTILE

În prezent, numeroase articole publicate sugerează necesitatea unei clasificări moleculare a hemangioamelor congenitale și infantile prin studiul

unor noi markeri cu potențial prognostic și terapeutic. Transportorul de glucoză 1 (GLUT1) este un marker utilizat în studiul hemangiomelor, fiind pozitiv în peste 95% din hemangioamele infantile și negativ în hemangioamele congenitale.

Factorul de creștere derivat din plachete (PDGF) este puțin studiat în malformațiile vasculare infantile. Despre CLIC1, proteina asociată canalelor de clor nu există în acest moment date referitoare la implicarea sa în patogeniza hemangioamelor infantile sau congenitale. Inhibarea canalelor de clor prin aplicarea de clorotoxină determină un efect antiangiogenic intens.

Au fost evaluate expresiile pozitive la CLIC1, GLUT1, PDGF-BB, Prox1. Pentru CLIC1 și GLUT1 au fost cuantificate expresiile nucleare, citoplasmatică și combinate. Pentru PDGF-BB expresia citoplasmatică a fost cea interpretată. Pentru GLUT1 și CLIC1 s-a cuantificat și aria pozitivă la acești markeri din totalul secțiunii analizate. De asemenea, am dorit să vedem dacă acești markeri sunt influențați de sex sau de tipul de hemangiom, respectiv proliferativ versus involutiv. Totodată am dorit să observăm variabilitatea de expresie a acestor markeri dependentă de localizarea acestora.

Un aspect particular pe care l-am întâlnit în studiul nostru și care nu este raportat în literatură se referă la expresia nucleară a GLUT1 precum și la expresia mixtă, nucleară și citoplasmatică. Un procent de 18% din totalul hemangioamelor studiate au prezentat expresie nucleară la GLUT 1 dar toate au asociat expresie citoplasmatică.

De asemenea, coexpresia CLIC1/GLUT1 a fost analizată în hemangioamele proliferative versus hemangioamele involutive. În hemangioamele proliferative, aria GLUT1 pozitivă s-a corelat semnificativ statistic cu aria CLIC1 pozitivă.

Aria CLIC1 pozitivă nu s-a corelat semnificativ statistic cu vârsta, sexul sau localizarea hemangioamelor. În schimb, aria GLUT1 pozitivă în hemangioamele proliferative a prezentat o corelație semnificativ statistică cu sexul pacienților, ariile 100% pozitive fiind predominant reprezentate la sexul feminin. Acest aspect a fost cuantificat la cazurile studiate pe baza datelor din literatură care sugerează o preponderență a expresiei CLIC1 la sexul masculin, aspect pe care l-am cerat și noi în hemangioamele proliferative dat fiind faptul că, expresia nucleară a CLIC1 este considerată în patologiiile maligne un factor de prognostic nefavorabil. Mai mult, expresia combinată nucleară și citoplasmatică a fost specifică sexului masculin.

De menționat faptul că, toate cele trei tipuri de expresie a CLIC1 au fost influențate de vârsta pacienților cu hemangioame. Expresiile CLIC1/C și

GLUT1/C s-au corelat semnificativ statistic în hemangioamele proliferative de la nivelul capului și gâtului.

La nivelul toracelui, toate hemangioamele proliferative au prezentat reacție pozitivă la GLUT1 în toată aria tumorală. În comparație cu hemangioamele proliferative de la nivelul capului și gâtului, cele de la nivelul toracelui par să fie mult mai mult influențate de tandemul GLUT1/CLIC1.

De remarcat un aspect particular absența completă a imunoreacției pentru PROX1 la toate cazurile de hemangioame proliferative cu localizare toracică precum și imunoexpresia intensă a GLUT1 (+3) la toate cazurile cu această localizare.

Totodată, expresia nucleară a CLIC1 a fost prezentă la majoritatea cazurilor cu excepția unui singur caz. Acest aspect poate fi considerat un factor de prognostic nefavorabil pentru hemangioamele proliferative cu această localizare.

Hemangioamele intramusculare au fost toate diagnosticate la pacienți de sex feminin, la nivelul membrelor superioare sau inferioare și, ca un aspect particular toate cazurile au prezentat reacție +3 la Prox1. Pentru aceste hemangioame cu localizare musculară nu am înregistrat nici o corelație semnificativ statistică între expresia GLUT1 și CLIC1.

Datorită rezultatelor de mai sus, am considerat util să studiem expresia markerilor incluși în funcție de localizarea hemangioamelor, respectiv cele de la nivelul capului și gâtului, toracelui sau cu alte localizări. Pentru hemangioamele involutive de la nivelul capului și gâtului, PDGF-BB pare să joace un rol important în evoluția acestora. Astfel, PDGF-BB s-a corelat semnificativ statistic atât cu PROX1 cât și cu GLUT1/C.