

GENILSON FERNANDES DE QUEIROZ

Avaliação da expressão e dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da densidade de microvasos em cães portadores de sarcomas de tecidos moles submetidos à excisão cirúrgica

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Julia Maria Matera

São Paulo

2007

GENILSON FERNANDES DE QUEIROZ

DEDALUS - Acervo - FMVZ



11300031342

Avaliação da expressão e dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da densidade de microvasos em cães portadores de sarcomas de tecidos moles submetidos à excisão cirúrgica

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Julia Maria Matera

São Paulo

2007

N.º CLASSIFICAÇÃO
N.º TOMBO: 027506

SAB. 074

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.


BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

30/11/07

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1916
FMVZ

Queiroz, Genilson Fernandes de

Avaliação da expressão e dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da densidade de microvasos em cães portadores de sarcomas de tecidos moles submetidos à excisão cirúrgica / Genilson Fernandes de Queiroz. – São Paulo: G. F. Queiroz, 2007.
119 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de Concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Julia Maria Matera.

1. Angiogênese patológica. 2. Fatores de crescimento.
3. Neoplasia. 4. Ensaio imunoenzimático. 5. Imunoistoquímica.
I. Título.

ERRATA

QUEIROZ, G. F. de. **Avaliação da expressão e dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da densidade de microvasos em cães portadores de sarcomas de tecidos moles submetidos à excisão cirúrgica.** [Evaluation of the expression and serum level of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and of the microvascular density in dogs with soft tissue sarcoma submitted to surgical excision]. 2007. 119 Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Folhas	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
53	2	Quadro 1	Apêndice A, Quadro 2
64	2	Tabela 1	Apêndice B, Tabela 1
65	2	Tabela 2	Apêndice B, Tabela 2
68	1	Tabela 3	Apêndice B, Tabela 3
69	1	tabela 2	Apêndice B, Tabela 1
114	-	Quadro 1	Quadro 2



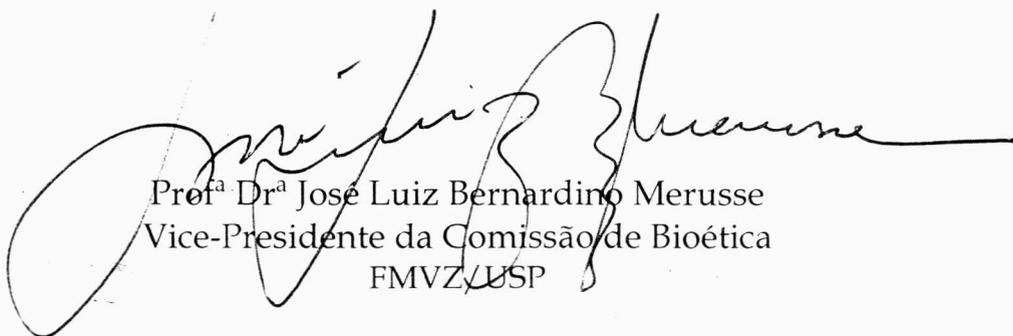
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular - VEGF em cães portadores de sarcomas de tecidos moles submetidos a diferentes tratamentos", protocolo nº577/2004, utilizando um número indefinido de cães, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Júlia Maria Matera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Serum vascular endothelial growth factor in soft tissue sarcoma of dogs after different treatments", protocol number 577/2004, indefinite number of the dogs, under the responsibility of Prof^a Dr^a Júlia Maria Matera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 06 de dezembro de 2004



Prof^a Dr^a José Luiz Bernardino Merusse
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: QUEIROZ, Genilson Fernandes de

Título: Avaliação da expressão e dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da densidade de microvasos em cães portadores de sarcomas de tecidos moles submetidos à excisão cirúrgica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: 19/12/07

Banca Examinadora

Professor Dr. Julia Matera Instituição: FMVZ/USP

Assinatura: Julia Matera Julgamento: aprovado

Professor Dr. MARIA LUIZA Z. DA SILVA Instituição: FMVZ-USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: aprovado

Professor Dr. Angelo José Stopiglia Instituição: FMVZ/USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: aprovado

Professor Dr. ANGÉLICA C. TATARUNAS Instituição: FMVZ - USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: APROVADO

Professor Dr. VALÉRIA VERAS DE PAULA Instituição: UFERSA

Assinatura: Valéria Veras de Paula Julgamento: APROVADO

*Aos meus pais **José** e **Joana** (in memoriam),
pela iniciativa e incentivo de forma peculiar na educação de seus filhos,
fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.*

*Aos meus tios, **Jerônimo** e **Maria Isabel**,
pela acolhida e apoio em uma etapa de minha vida,
relevantes para o percurso dessa caminhada.*

*Ao meu primo **Joel** e esposa **Socorro**, pela acolhida, incentivo,
imprescindíveis para que atingisse esse objetivo.*

*Aos meus irmãos, **Francisca, Jailton, Genilda, Gizélia e Francisco,**
pelo apoio durante toda essa empreitada.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, força suprema que nos impulsiona e nos encoraja a seguir e driblar todos os percalços que a vida nos oferece.

Aos meus pais, irmãos e familiares que contribuíram grandemente para a conclusão dessa empreitada.

A minha orientadora, a Prof^ª. Dr.^a Julia Maria Matera, pela oportunidade, apoio, confiança em mim depositada, paciência, seus bons conselhos e atenção dispensados durante esse período.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado, imprescindível para a o desenvolvimento desse trabalho.

A Prof^ª. Dr.^a Maria Lúcia Zaidan Dagli, a Médica Veterinária Luciana Neves Torres, a técnica de laboratório Marguiti Isaura, ao Pós-Graduando Daniel Sanches do Departamento de Patologia da FMVZ/USP, pelo auxílio no diagnóstico dos casos e interpretação dos resultados, pelo profissionalismo e competência dispensados a oncologia.

Ao canil da Polícia Militar do Estado de São Paulo em nome do Tenente Coronel Médico Veterinário Wilson Domingos Chefe do Departamento de Medicina Veterinária do Comando de Policiamento de Choque da Polícia Militar do Estado de São Paulo e sua equipe pela disponibilização dos cães para comporem o grupo controle desta pesquisa.

Aos professores do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP Aline Magalhães de Ambrósio, Angelo João Stopiglia, Cassio Ricardo Auada Ferrigno,

Denise Tabachi Fantoni, Marco Antonio Gioso, Paulo Sérgio de Moraes Barros e Silvia Renata Gaido Cortopassi pela convivência e aprendizado.

Ao professor Dr. Antonio José Piantino Ferreira do Departamento de Patologia da FMVZ/USP por disponibilizar a estrutura do seu laboratório para realização do teste de ELISA e a Pós-Doutoranda Claudete Astolfi Serafin Ferreira pela paciência e ensinamentos durante o processamento dos "kits" imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos Médicos Veterinários do Serviço de Anestesiologia do HOVET – FMVZ/USP João Krumenerl e Rodrigo Benedito, pela colaboração para o desenvolvimento desse trabalho.

As Médicas Veterinárias do Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET – FMVZ/USP, Andressa Gianotti Campos, Patrícia Ferreira de Castro, Sandra Aparecida Rosner, Tatiana Soares da Silva e Viviane Sanches Galeazzi, pela colaboração, pelas experiências trocadas, pela convivência.

A Médica Veterinária Maria Luiza Franchini, bem como a equipe do Laboratório Clínico do HOVET – FMVZ/USP pela colaboração na realização dos exames necessários para que o trabalho se desenvolvesse.

Aos Professores Drs. Enrico Lippi Ortolani, Fernando José Benesi, e a técnica de laboratório Clara Satsuki Mori do Departamento de Clínica Médica pela presteza no armazenamento e processamento das amostras para a realização das análises laboratoriais.

A Prof^a MSc. Silvana Aparecida Meira do pela realização da análise estatística final dos dados desta pesquisa.

Aos enfermeiros do Serviço de Cirurgia Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET – FMVZ/USP, Cledson Lelis dos Santos, Jesus dos Anjos Vieira,

Maurício Pavão, Otávio Rodrigues dos Santos pela colaboração, competência e dedicação ao trabalho.

Ao secretário do Curso de Pós-Graduação – Clínica Cirúrgica Veterinária, Belarmino Ney Pereira, pelo esforço, apoio e gentileza dispensados para resolução dos problemas de nós pós-graduandos.

Aos amigos da pós-graduação Angélica Cecília Tatarunas; Ayne Murata Hayashi; Carolina Scarpa Carneiro; Renata Moris Domenico Oliveira, Sam Goldy Shoyama Oda, Thaís Andrade Costa, Leda Marques de Oliveira, pelo apoio, experiências trocadas e pelo companheirismo.

Ao meu amigo Antonio Humberto Hamad Minervino, pela amizade, convivência e colaboração na realização da análise estatística dos dados da pesquisa na fase preliminar.

A telefonista Neuza Gomes da Silva, por disponibilizar o telefone para que fizéssemos contato com os proprietários, e acima de tudo pela convivência e amizade.

A equipe da biblioteca da FMVZ/USP pela presteza.

A todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

QUEIROZ, G. F. de. **Avaliação da expressão e dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da densidade de microvasos em cães portadores de sarcomas de tecidos moles submetidos à excisão cirúrgica.** [Evaluation of the expression and serum level of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and of the microvascular density in dogs with soft tissue sarcoma submitted to surgical excision]. 2007. 119 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

No indivíduo adulto, a angiogênese ocorre particularmente em situações patológicas como nos tumores em crescimento, no desenvolvimento de metástases e no processo de cicatrização, sendo o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) o principal fator envolvido na angiogênese tumoral. Por essa razão, o presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis circulantes de VEGF no soro de cães com sarcoma de tecidos moles e sua relação com as células sanguíneas, comparados com um grupo de animais sem câncer (controle), a expressão do VEGF e a densidade de microvasos nos espécimes tumorais dos cães com sarcoma de tecidos moles. O grupo controle foi composto de 30 cães machos e o grupo de animais com sarcoma de tecidos moles foi de 25 cães (18 machos e 7 fêmeas castradas) os quais foram avaliados prospectivamente. A coleta sanguínea foi realizada apenas uma vez no grupo controle e em três tempos nos animais com sarcoma (pré-operatório, duas semanas e três meses de pós-operatório) da mesma maneira. Após a colheita o sangue foi processado, para extração do soro e determinação dos níveis de VEGF a partir de um método quantitativo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). A expressão do VEGF e a densidade de

microvasos foi investigada por meio da prova de imunoistoquímica utilizando-se anticorpos anti-VEGF e anti-fator VIII respectivamente. Não houve diferença entre o nível sérico de VEGF dos animais controles e portadores de sarcoma de tecidos moles no tempo pré-operatório. O nível de VEGF sérico no pré-operatório mostrou-se discretamente aumentado em relação a duas semanas e três meses de pós-operatório. Houve correlação positiva entre VEGF sérico e contagem neutrófilos e correlação negativa entre o VEGF e quantidade de hemoglobina nos animais com sarcoma. Houve uma tendência dos animais com hemangiopericitoma apresentarem níveis maiores de VEGF sérico em relação aos portadores de tumor maligno da bainha neural periférica. Houve expressão do VEGF em 65% dos casos, sendo o hemangiopericitoma aquele que expressou maior quantidade de VEGF intratumoral. Não houve diferença na densidade de microvasos entre os tumores negativos e positivos ao VEGF. Os resultados encontrados sugerem contribuição das células do sangue circulante para os níveis de VEGF do soro de cães portadores de sarcomas de tecidos moles, células tumorais e outros tipos celulares parecem ser responsáveis pela angiogênese tumoral, mas não contribuem para elevação da concentração sérica desse fator.

Palavras-chave: Angiogênese patológica. Fatores de crescimento. Neoplasia. Ensaio imunoenzimático. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

QUEIROZ, G. F. de. **Evaluation of the expression and serum level of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and of the microvascular density in dogs with soft tissue sarcoma submitted to surgical excision.** [Avaliação da expressão e dos níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e da densidade de microvasos em cães portadores de sarcomas de tecidos moles submetidos à excisão cirúrgica]. 2007. 119 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

In adult individual, angiogenesis occurs particularly in pathological situations as tumors growth, development of metastasis and in the wound healing process. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is the main agent involved in tumor angiogenesis. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the circulating levels of VEGF in the serum of dogs suffering from soft tissue sarcoma and its relation with the blood cells, and also the expression of VEGF and the micro vascular density in tumors specimens. A group of health animals was used as control. The control group and treatment group were composed of 30 male dogs 25 dogs (18 males and 7 castrated females) respectively. The blood collection was carried once in the control group and three times in the animals with sarcoma (timely, pre-surgery, two weeks and three months post-surgery) following the same protocol. The blood was processed and a quantitative method ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was used to determinate of the levels of VEGF. The expression of the VEGF and the microvascular density were investigated by means of the immunohistochemical test using anti-VEGF and anti-factor VIII antibodies

respectively. There was no difference between serum level of VEGF of the controls animals and serum level of VEGF in the animal with soft tissue sarcoma in pre-surgical time. Serum level of VEGF in pre-surgical time revealed discrete increased in relation the two weeks and three months of post-surgery. There was a positive correlation between serum VEGF and neutrophils counting and negative correlation between the VEGF and amount of haemoglobin in the animals with sarcoma. The animals with hemangiopericytoma showed a trend to higher levels of VEGF in relation to the malignant peripheral nerve sheath tumor. The expression of the VEGF was detected in 65% of the cases; the hemangiopericytoma is the one that expressed greater intratumoral amount of VEGF. There was no difference in the microvascular density between the negative and positive tumors to the VEGF. The results suggest contribution of the circulating blood cells for the levels of serum VEGF of the of the dogs with of soft tissue sarcomas, tumors cells and other cells types seem to be responsible for tumor angiogenesis, but they don't contribute for rise serum level of VEGF.

Key-words: Pathological angiogênesis. Growth factor. Neoplasia. immunosorbent assay. Immunohistochemical.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagens de exame tomográfico pré-contraste (animal nº. 4) em aproximação com 10mm de espessura e 10mm de incremento onde se observa formação de aspecto alongado em face lateral de membro torácico direito que se estende do terço distal ao terço proximal do úmero, essa formação apresenta pequena porção calcificada medindo 1,0 cm no sentido distal-proximal (seta), 3,0 cm no sentido crânio-caudal e 1,0 cm de profundidade em região distal do úmero (face lateral), o restante da formação com atenuação de partes moles homogênea e aspecto alongado, estende-se do terço distal do úmero para o sentido proximal por 9,0cm com até 2,0cm de profundidade; por toda a face lateral envolvendo o músculo tríceps braquial especialmente sua cabeça longa onde, sob a área calcificada após a injeção do contraste não se observou ponto de clivagem. Serviço de Diagnóstico por Imagem do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007..... 56
- Figura 2 - Valores do VEGF sérico no pré-operatório em relação ao padrão racial dos cães portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007..... 65
- Figura 3 - Valores do VEGF sérico dos animais controle – CO e portadores de sarcoma no pré-operatório – PO, duas semanas de pós-operatório – 2S e três meses de pós-operatório – 3M, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007..... 67
- Figura 4 - Gráfico da correlação do VEGF sérico dos animais com sarcoma no pré-operatório com os parâmetros hematológicos, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007..... 69
- Figura 5 - Concentração do VEGF sérico no pré-operatório dos cães com sarcoma em relação ao diferentes tipos histológicos dos tumores, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo, 2007..... 70

- Figura 6 - Fotomicrografia da presença de expressão do VEGF em: **A** – TMBNP – (animal nº. 5); **B** - Hemangiossarcoma - (animal nº. 12); **C** - Mixossarcoma – (animal nº. 11), **D** – TMBNP - (animal nº. 23); **E** – Hemangiopericitoma - (animal nº. 17); **F** - , Hemangiopericitoma - (animal nº. 16); **G** - Hemangiopericitoma - (animal nº. 18); **H** - TMBNP - (animal nº. 25); **I** - Hemangiopericitoma - (animal nº. 2), reação de imunistoquímica para o VEGF, coloração com HE, aumento de 200X. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo – 2007..... 71
- Figura 7 - Fotomicrografia da densidade de microvasos em: **A** – Mixossarcoma (animal nº. 11); **B** – Osteossarcoma extra-esquelético (animal nº. 4); **C** – Hemangiossarcoma (animal nº. 8); **D** – TMBNP (animal nº. 9); **E** - TMBNP (animal nº. 54); **F** - Hemangiopericitoma, (animal nº. 3) reação de imunistoquímica para o fator VIII, coloração com HE, aumento de 200X. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007..... 72
- Figura 8 - Densidade de microvasos em relação a expressão de VEGF nos espécimes tumorais dos cães portadores de sarcoma. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007..... 73
- Figura 9 - Densidade de microvasos por tipo tumoral nos espécimes tumorais dos cães portadores de sarcoma. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007..... 74
- Figura 10 - Correlação do VEGF sérico dos animais com sarcoma no pré-operatório com a densidade de microvasos nos espécimes tumorais dos cães portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007..... 75
- Figura 11 - Concentração do VEGF sérico em relação aos espécimes tumorais positivos e negativos ao VEGF dos cães portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007..... 76

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Detalhes dos anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica – São Paulo - 2007..... 60
- Quadro 2 - Dados relativos aos animais portadores de tumores de pele e/ou partes moles operados no período de outubro de 2004 a janeiro de 2007, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007). São Paulo, 2007..... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Dados epidemiológicos dos animais portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007.....	100
Tabela 2	- Valores do VEGF sérico dos animais do grupo controle e dos animais portadores de sarcoma nos tempos de pré-operatório, 2 semanas e 3 meses de pós-operatório, da expressão do VEGF e da densidade de microvasos dos animais portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007.....	101
Tabela 3	- Parâmetros hematológicos dos animais com sarcoma no pré-operatório e dos animais controle, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007.....	102
Tabela 4	- Média, desvio padrão e valor de p dos parâmetros hematológicos de hemoglobina e plaquetas linfócitos e eosinófilos dos animais do grupo controle e dos animais com sarcoma no pré-operatório, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

Π	Pi
µm	Micrômetro
2S	Duas semanas de pós-operatório
3M	Três meses de pós-operatório
ANOVA	Análise da variância
CA	Câncer
cm ³	Centímetro cúbico
CO	Controles
CRD	Com Raça Definida
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EOS	Eosinófilos
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e Eosina
HOVET	Hospital Veterinário
HPT	Hemangiopericitoma
LINF	Linfócitos
M	Masculino
mL	Mililitro
MON	Monócitos
NEUT	Neutrófilos
pg	Picograma

PO	Pré-operatório
SRD	Sem Raça Definida
TMBNP	Tumor maligno da bainha neural periférica
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
x	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1	Atividades biológicas do VEGF.....	26
2.2	O gene do VEGF e suas proteínas.....	27
2.3	Receptores e moléculas relacionadas ao VEGF.....	29
2.4	Papel do VEGF e de seus receptores na angiogênese fisiológica.....	31
2.5	Fatores que regulam a expressão do VEGF.....	33
2.6	Papel do VEGF na angiogênese tumoral.....	35
2.7	Concentração sanguínea do VEGF em pacientes com neoplasias malignas	37
2.8	Concentração sérica do VEGF em pacientes com sarcomas de tecidos moles.....	40
2.9	Contribuição das células do sangue circulante para os níveis do VEGF do fluxo sanguíneo	42
2.10	Expressão do VEGF e densidade de microvasos em pacientes portadores de tumores diversos	44
3	OBJETIVOS.....	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
5	RESULTADOS.....	63
6	DISCUSSÃO.....	77
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE(s)	109
	ANEXO(S)	118

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O número de animais com câncer tem crescido muito ao longo dos últimos anos. Esse fato tem despertado um maior interesse por parte dos pesquisadores na busca por novos métodos de diagnóstico, tratamento e prognóstico.

Os sarcomas de tecidos moles correspondem de 14 a 17% dos tumores malignos dos cães com uma incidência anual nos Estados Unidos de 35 casos para 100.000 (DERNELL et al., 1998; MACEWEN et al., 2001). No Brasil não há dados reais da incidência desses tumores em cães, no entanto, em trabalho desenvolvido por Chalita et al. (2001) com tumores de pele e partes moles em cães do total de 117 tumores estudados histologicamente, 35 (29,9 %) eram de origem mesenquimal, sendo 15 (42,86%) malignos. Por outro lado, Vasconcellos (2002) estudando os mesmos tipos de tumores em cães encontrou uma maior percentagem (68,75%) de sarcomas de tecidos moles. Em levantamento realizado no período de janeiro de 2003 a junho de 2004, dos 84 cães portadores de sarcoma operados no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 43 (51,2%) foram diagnosticados histologicamente como sarcoma de origem de tecidos moles.

A extensão da vascularização do tumor, mensurada pela densidade de microvasos ou expressão de fatores angiogênicos intra-tumorais, tem mostrado ser um importante indicador de prognóstico em uma variedade de tumores sólidos em humanos (FOLKMAN, 1995). O fator de crescimento do endotélio vascular – Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), também conhecido como fator de permeabilidade vascular é um fator angiogênico que desempenha papel importante

no desenvolvimento embrionário, funções reprodutivas e na cicatrização de feridas. É também um importante fator angiogênico patológico expresso em grande número de tipos de tumores e tem mostrado uma correlação com o prognóstico (DVORAK, 2002).

A concentração do VEGF no soro de pacientes humanos tem sido correlacionada com o grau e prognóstico em uma variedade de tumores sólidos (GEORGE et al., 2000). O VEGF tem sido estudado em pacientes com sarcomas de tecidos moles e a sua concentração foi significativamente mais elevada nos tumores de alto grau de malignidade e correlacionada com o desenvolvimento de recidiva local e metástases (YUDOH et al., 2001).

A literatura veterinária no que concerne à importância do VEGF em tumores de cães é escassa e não há relatos a respeito do papel desse fator em sarcomas de tecidos moles de cães.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão a seguir estão apresentadas as informações obtidas na literatura referentes as atividades biológicas do VEGF, o gene do VEGF e suas proteínas, seus receptores e moléculas relacionadas, o papel do VEGF e de seus receptores na angiogênese fisiológica e tumoral, os fatores que regulam sua expressão, contribuição das células do sangue para os níveis circulantes do VEGF e sua expressão em pacientes portadores de tumores.

2.1 Atividades biológicas do VEGF

O VEGF tem ação mitogênica potente sobre células derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LEUNG et al., 1989; PLOUET; SCHILLING; GOSPODAROWICZ, 1989). Funciona ainda, como fator de sobrevivência nessas mesmas células, induzindo a expressão de proteínas com atividade anti-apoptótica, como por exemplo, o Bcl-2 (GERBER; DIXIT; FERRARA, 1998).

Estudos têm demonstrado que o VEGF pode induzir o desenvolvimento de fenestrações em células endoteliais com conseqüente aumento da permeabilidade vascular. Desse modo, leva a um extravasamento de proteínas plasmáticas para o interstício, resultando na formação de um gel de fibrina extravascular, que serve como substrato para células endoteliais e tumorais (DVORAK, 1986; DVORAK et al., 1987; ROBERTS; PALADE, 1995).

Efeito adicional atribuído ao VEGF é o aumento do transporte de glicose no endotélio vascular. Tal efeito tem relevância importante por aumentar a demanda de

energia durante a proliferação de células endoteliais ou na inflamação (PEKALA et al., 1990).

Outros estudos demonstraram que o VEGF tem efeito inibitório na maturação de células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas, não possuindo, portanto, efeito inibitório significativo sobre estas células maduras. Esse efeito leva a hipótese de que o VEGF possa facilitar o crescimento do tumor, evitando que o tumor induza uma resposta imune (GABRILOVICH et al., 1996). O VEGF induz a expressão de fatores ativadores de plasminogênio (AP) e colagenase, promovendo um efeito degradativo tecidual que facilita a migração e proliferação de células endoteliais. Da mesma forma, apresenta efeito inibitório desses fatores, controlando negativamente a ação proteolítica supramencionada (PEPER; MONTESANO, 1990; PEPER et al., 1991).

As atividades biológicas do VEGF podem diferir em intensidade de acordo com o órgão estudado. Dellian et al. (1996) demonstraram que a permeabilidade vascular e a velocidade intravascular das hemáceas em microvasos induzidos pelo VEGF são diferentes em intensidade quando estudados no crânio e na pele de camundongos. Estes achados sugerem que tais atividades são determinadas pelo ambiente biológico local.

2.2 Gene do VEGF e suas proteínas

O gene do VEGF humano está organizado em 8 exons, separados por 7 introns, e sua região de codificação mede aproximadamente 14 kb (HOUCK et al.,

1991; TISHER et al., 1991). Está localizado no cromossomo 6p21.3 (VICENTI et al., 1996). Em análises da seqüência do cDNA em uma variedade de clones do VEGF humano foram encontrados pelo menos cinco espécies de moléculas diferentes, apresentando 121, 145, 165, 189, 206 aminoácidos (respectivamente VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) (HOUCK et al., 1991; HOUCK et al., 1992; TISHER et al., 1991).

A isoforma mais importante e predominante é o VEGF₁₆₅, uma glicoproteína homodimérica com afinidade pela heparina, com peso molecular de 45.000 daltons; quando da falta de afinidade pela heparina ocorre uma perda da atividade mitogênica, podendo ela, ser encontrada na forma livre e difusível, bem como ligada a superfície celular e matriz extracelular (FERRARA et al., 1992; HOUCK et al., 1992). Por outro lado o VEGF₁₂₁ apesar de ser encontrado na forma livre, não tem afinidade pela heparina e é 50 a 100 vezes menos potente que o VEGF₁₆₅ na proliferação de células endoteliais (HOUCK et al., 1992; KEYT et al., 1996). O VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ são moléculas maiores, com maior afinidade pela heparina que as anteriores; no entanto, não estão livremente disponíveis, encontram-se seqüestradas na matriz extracelular (PARK; KELLER; FERRARA, 1993). VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ podem ser liberadas como moléculas solúveis através da ligação com heparina ou plasmina, gerando moléculas bioativas de peso molecular de 34.000 daltons (HOUCK et al., 1992).

Esses achados sugerem que o VEGF pode se tornar disponível para exercer atividade sobre células endoteliais por dois mecanismos distintos: como proteínas livremente difusíveis (VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅) ou por quebra e liberação de isoformas mais longas (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997).

As principais isoformas do VEGF detectadas em cães foram VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ e VEGF₁₈₈. A seqüência de aminoácidos dessas isoformas exibe somente 4,8% de trocas de resíduos comparados à seqüência do VEGF humano. Além disso, o VEGF canino apresenta propriedades de ligação às células de humanos, resposta biológica em células humanas e de aves semelhantes ao VEGF humano. Com base nesses achados, o VEGF canino é estrutural e funcionalmente semelhante ao VEGF humano (SCHEIDGGER et al., 1999).

2.3 Receptores e moléculas relacionadas ao VEGF

A atividade biológica do VEGF ocorre devido a sua alta afinidade por dois receptores de transmembrana denominados de tirosina quinase. Estes receptores são seletivos, embora não sejam exclusivamente expressos pelo endotélio vascular (DVORAK, 2002), podem estar localizados nas células endoteliais de pequenos e grandes vasos (JAKEMAN et al., 1992).

Os dois receptores com afinidade para VEGF identificados foram: VEGFR-1 (*vascular endothelial growth factor receptor-1*) ou Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase 1*) e VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor-2*) ou Flk-1 (*fetal liver kinase 1*) ou KDR (*kinase domain region*) (TERMAN et al., 1992; VRIES et al., 1992). Estudos sugerem que VEGFR-1 tem maior afinidade pelo VEGF₁₆₅ do que VEGFR-2 (VRIES et al., 1992). Desse modo, os dois receptores parecem ter diferentes propriedades.

Células endoteliais da aorta de porcos que não apresentam receptores para o VEGF quando são transfectadas¹ com um plasmídeo codificado para o VEGFR-2/KDR exibem quimiotaxia e atividade mitogênica em resposta ao VEGF, o que não ocorre quando tais células são transfectadas com o plasmídeo do VEGFR-1/Flt-1. (WALTENBERGER et al., 1994; SEETHARAM et al., 1995).

Estudos sugerem que VEGFR-1 não é, primariamente, um receptor de sinalização, mas sim um chamariz, capaz de regular de maneira negativa o VEGF, seqüestrando-o e deixando-o menos disponível para o VEGFR-2 (PARK et al., 1994). Moléculas mutantes do VEGF que se ligam seletivamente ao VEGFR-2 são altamente mitogênicas para células endoteliais (KEYT et al., 1996). Portanto, VEGFR-2 é fundamental para a indução de angiogênese mediada pelo VEGF.

Soker et al. (1998) identificaram um receptor não cinase com afinidade pelo VEGF₁₆₅ denominado de neuropilina-1 (NRP-1), cuja função seria potencializar a ligação do VEGF₁₆₅ com o VEGFR-2. No entanto, é menos expresso no endotélio vascular que o VEGFR-1 e VEGFR-2, e sua importância na angiogênese tumoral tem sido motivo de pesquisas recentes (MIAO; KLAGSBRUN, 2000; MIAO et al., 2000).

Estudos identificaram um receptor que não se liga ao VEGF denominado de Flt-4 ou VEGFR-3, expresso principalmente em células epiteliais do pulmão em desenvolvimento, porém apresenta afinidade com moléculas relacionadas ao VEGF (VEGF-C e VEGF-D), (*vascular endothelial growth factor receptor-3*) (PAJUSOLA et al., 1992)

Nos últimos anos foram identificadas várias moléculas relacionadas ao VEGF (ou VEGF-A) que atuam de certa forma na angiogênese. Essas moléculas

¹ Transfecção: processo pelo qual um gene é inserido em uma célula por meio de técnicas de biologia molecular.

incluem VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e placenta growth factor (PIGF). Esses fatores são menos estudados que o VEGF-A e tem despertado interesse nos leitores mais como informação adicional (DVORAK, 2002).

PIGF, como o próprio nome sugere, é fortemente expresso em placenta e acredita-se ter um papel adicional na angiogênese patológica, potencializando a atividade do VEGF (CARMELIET; MOONS; LUTTUN, 2001).

VEGF-B está distribuído primariamente no músculo esquelético e no miocárdio, desse modo acredita-se que participe na regulação da angiogênese, particularmente nos músculos (OLOFSSON et al., 1996).

VEGF-C liga-se ao VEGFR-3, expresso no endotélio de vasos linfáticos, e tem sido implicado na linfangiogênese. VEGF-D é mitogênico para células endoteliais e interage com o VEGFR-2 e VEGFR-3, enquanto que o VEGF-E induz angiogênese através da interação com o VEGFR-2 (MEYER et al, 1999).

2.4 Papel do VEGF na angiogênese fisiológica

A proliferação de vasos sangüíneos é crucial para uma variedade de processos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário, crescimento normal e diferenciação, cicatrização de feridas e funções reprodutivas (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997).

A formação de vasos sangüíneos no período embrionário ocorre por dois processos distintos. A vasculogênese é um processo que ocorre somente na fase embrionária, e consiste na formação de vasos a partir da diferenciação de

precursores mesodérmicos em células endoteliais (FERRARA, 2002). Angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos através da migração e proliferação de células endoteliais provenientes de vasos pré-existentes (PLENDL; LUNN, 2000). No adulto, a angiogênese ocorre particularmente em situações patológicas como nos tumores em crescimento, metástases e no processo de cicatrização. A angiogênese fisiológica, na fase adulta, ocorre principalmente no sistema reprodutor feminino, mais precisamente no útero, placenta, ovário e glândulas mamárias durante a gestação e nos ovários e no útero a cada novo ciclo reprodutivo (PLENDL; LUNN, 2000).

O VEGF é considerado o principal fator envolvido na diferenciação e desenvolvimento do sistema vascular, pois, estudos com animais mostraram que a perda de apenas um dos alelos do gene do VEGF resulta em morte embrionária (FERRARA et al., 1996), o que não ocorre quando há inativação de outros fatores angiogênicos, como no caso do PIGF (CARMELIET; COLLEN, 1998). No período pós-natal imediato o VEGF parece ter papel crítico, pois sua inibição resulta em parada de crescimento e morte em poucos dias de vida (FERRARA et al., 1996). Outra função importante do VEGF nessa fase está relacionada ao desenvolvimento ósseo, pois, sua inativação resulta em prejuízo no crescimento ósseo longitudinal (GERBER et al., 1999).

A expressão do VEGF em microvasos de áreas onde as células endoteliais são normalmente quiescentes como nos glomérulos renais, pituitária, coração, pulmão e cérebro (BROWN et al., 1992; FERRARA et al., 1992; MONACCI; MERRILL; OLDFIELD, 1993) elevam a possibilidade do VEGF ser necessário não somente para induzir uma proliferação vascular ativa, como também para manutenção da diferenciação de vasos sanguíneos (FERRARA et al., 1992).

O VEGF desempenha papel importante no processo de cicatrização de feridas. Queratinócitos presentes na cicatrização de feridas expressam RNA mensageiro do VEGF. Estudos em ratos mostraram que houve uma diminuição da expressão do RNA mensageiro do VEGF na pele de ratos geneticamente diabéticos quando comparados com ratos normais, sugerindo que uma alteração na regulação da expressão do gene do VEGF contribui para uma angiogênese defeituosa e uma cicatrização prejudicada (FRANK et al., 1995).

Os estudos em animais adultos mostram que o VEGF é necessário para a ativação do processo de angiogênese, assim como para o desenvolvimento do corpo lúteo e processos cicatriciais. A angiogênese ocorre no ovário durante o desenvolvimento folicular e formação do corpo lúteo; no endométrio uterino ocorre durante a fase proliferativa do ciclo estral e menstrual. Aparte estes dois locais do corpo, novos vasos sanguíneos não crescem exceto em resposta a uma injúria tecidual ou algumas doenças (FRANSER, 2000). No trato reprodutor feminino o VEGF desempenha papel importante no desenvolvimento cíclico dos vasos sanguíneos (FERRARA et al., 1998).

2.5 Fatores que regulam a expressão do VEGF

A expressão do VEGF no ser humano parece ser regulada por fatores como a hipóxia, IGF-1 (insulin-like growth factor), mediadores inflamatórios, diferenciação celular e alterações genéticas. Os estudos realizados demonstraram que a hipóxia é

um potente indutor da expressão do VEGF *in vitro* bem como *in vivo* (BANAI et al., 1994; HASHIMOTO et al., 1994; MICHENKO et al., 1994).

Os trabalhos demonstraram uma associação entre hipóxia tumoral e aumento dos níveis sistêmicos de VEGF em pacientes com tumores da cabeça e pescoço (DUNST et al., 2001). Uma anemia mesmo que moderada pode comprometer a oxigenação tumoral e resultar em hipóxia tumoral (RICHARD; BERRA; POUYSSEGUR, 1999).

Em pesquisa foi atestado que o IGF-1 (insulin-like growth factor-1) aumenta a expressão de RNA mensageiro para VEGF em carcinoma de colo retal, regulando dessa forma o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos e contribuindo para a progressão do câncer (WARREN et al., 1996). TSH (thyroid-stimulating hormone) também mostrou estimular a expressão do VEGF em linhagens de células de carcinoma de tireóide (SOH et al., 1996).

Os mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2 e interleucina-1 induzem a expressão do VEGF em cultura de células de fibroblastos sinoviais sugerindo importância do VEGF na angiogênese inflamatória (BEN-AV et al., 1995).

A diferenciação celular parece ter papel importante na regulação da expressão do VEGF, pois, durante a conversão de pré-adipócitos 3T3 em adipócitos houve um aumento de sua expressão (CLAFFEY; WILKISON; SPIEGELMAN, 1992).

A alteração genética no oncogene *ras* está associada à regulação do VEGF em células epiteliais transformadas, sugerindo que este oncogene pode contribuir de modo indireto para o crescimento do tumor promovendo a angiogênese tumoral (RAK et al., 1995). Em trabalho desenvolvido por Iliopoulos et al. (1996) observou-se que o gene de supressão tumoral VHL (Von Hippel-Lindau) está relacionado à expressão do VEGF, regulando negativamente a expressão do VEGF.

2.6 Papel do VEGF na angiogênese tumoral

A formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes tem início com a ativação de células endoteliais normalmente homeostáticas que originam ramos que se projetam e invadem o estroma tumoral. Estes vasos se conectam com a rede vascular existente como capilares funcionais e desempenham papel importante para a agressividade e prognóstico dos tumores (LANTZSCH; HEFLER, 2004). Este processo desempenha papel importante para a progressão tumoral uma vez que na ausência de novos vasos os tumores só conseguem crescer cerca de 2 a 3 mm (FOLKMAN, 1990). Além disso, a neovascularização tem participação no desenvolvimento de metástase aumentando a possibilidade das células tumorais atingirem a circulação (LIOTA; KLEINERMAN; SAIDEL, 1974).

Em condições fisiológicas a angiogênese é regulada por uma série de fatores de indução e inibição, em condições patológicas ocorre uma alteração ou ausência dessa regulação (DVORAK, 1986; FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987; JOSEPH-SILVERSTEIN; SILVERSTEIN, 1998).

Dentre os promotores da angiogênese identificados os mais potentes são o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (aFGF e bFGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento transformante ($TGF\alpha$ e β), angiotropina, angiogenina e fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$) (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987; JOSEPH-SILVERSTEIN; SILVERSTEIN, 1998).

A angiogênese tem sido relacionada ao crescimento acelerado de neoplasias de alto potencial metastático. Estudos em camundongos transplantados com tumores humanos sugerem que o rápido crescimento de tais tumores é precedido de um aumento na vascularização (ALGIRE; CHALKLEY, 1945).

O VEGF tem sido implicado como o principal envolvido na angiogênese de tumores em muitos estudos (FERRARA, 2000; TOU; MATSUMOTO; BANDO, 2001). Na maioria dos tumores humanos a expressão do VEGF encontra-se aumentada, tanto em células tumorais quanto em células do próprio organismo (FERRARA, 1999). O aumento da expressão do VEGF em tumores humanos está relacionado a um aumento da vascularização local e pobre prognóstico (GASPARINI et al., 1997; MAEDA et al., 1996).

Em pacientes humanos portadores de sarcomas de tecidos moles a expressão do VEGF, especificamente em leiomiossarcoma, parece estar associada a uma menor sobrevida quando comparado a aqueles que não expressaram (POTTI et al., 2004).

Estudando a expressão do VEGF em osteossarcomas humanos Kaya et al. (2000) observaram que nos tumores positivos para o VEGF o perímetro dos vasos tumorais era significativamente maior em relação a tumores negativos ao VEGF. Observaram ainda que a taxa metastática nos pacientes com tumores VEGF positivo foi significativamente maior do que nos portadores com tumores VEGF negativos. Sugerindo dessa forma a importância do VEGF no crescimento tumoral e disseminação para locais distantes.

O aumento da expressão do VEGF em carcinomas mamários invasivos de felinos está relacionado com o tipo, grau histológico e sobrevida desses animais (MILANTA et al., 2002).

Em estudo realizado em seminomas caninos do tipo difuso demonstrou-se que o aumento da expressão do VEGF está relacionado a um aumento da vascularização local (RESTUCCI et al., 2003). A expressão do VEGF encontra-se aumentada em tumores mamários (RESTUCCI et al., 2002), carcinomas cutâneos de cães e está relacionada com a angiogênese e malignidade (MAIOLINO; DEVICO; RESTUCCI, 2000).

As evidências do papel do VEGF no desenvolvimento dos cânceres humanos surgiram a partir de estudos realizados com anticorpos dirigidos contra o VEGF. O crescimento de células tumorais humanas implantadas em camundongos foi suprimido por meio da supressão da angiogênese administrando-se anticorpos contra o VEGF nesses animais (BOGTROM et al., 1998; KIM et al., 1993).

2.7 Concentração sangüínea do VEGF em pacientes com neoplasia maligna

O VEGF desempenha papel importante na angiogênese fisiológica bem como tumoral. Partindo desse princípio, alguns autores propuseram realizar a dosagem sangüínea (sérica ou plasmática) desse fator e a sua correlação com a neoplasia.

A medida da concentração sérica do VEGF foi significativamente elevada em pacientes, com tumor de mama, estômago, cólon, esôfago, pulmão e fígado quando comparada ao grupo controle, sendo inclusive associada com uma maior expressão do VEGF nos tecidos tumorais (YAMAMOTO et al., 1996).

Kraft et al. (1999) observaram níveis significativamente maiores do VEGF no soro de pacientes humanos com carcinoma de mama, ovário e gastrintestinal quando comparados com pacientes saudáveis, observaram ainda que nos pacientes com câncer havia uma maior concentração significativa do VEGF naqueles com doença metastática. De acordo com Salgado et al. (2001) pacientes humanos portadores de câncer de mama apresentam níveis séricos do VEGF significativamente mais elevados em relação à população controle.

A concentração sérica do VEGF encontra-se aumentada em pacientes humanos com carcinoma e sarcoma em relação aos saudáveis havendo diferença estatística significativa naqueles com carcinoma de pulmão e sarcoma de partes moles em relação aos demais tumores (LINDER et al., 1998).

Salven et al. (1997) ao analisar três grupos de pacientes portadores de câncer de pulmão, cérebro, trato gastrintestinal, mama, linfoma e próstata com doença loco-regional, metastática, e um grupo controle, encontraram diferença significativa entre os três grupos, sendo o grupo com doença disseminada aquele que exibiu os valores mais elevados do VEGF sangüíneo.

A partir desses estudos surgiram diversos relatos na literatura analisando a importância dos níveis circulantes de VEGF em diferentes neoplasias. Níveis séricos de VEGF se correlacionam com o estágio da doença em pacientes com câncer de cólon (KUMAR et al., 1998), pacientes com neoplasia pulmonar (SALVEN et al., 1998), pacientes com hepatocarcinoma (JIN-NO et al., 1998) e pacientes com câncer de mama (YAMAMOTO et al., 1996).

A concentração sérica do VEGF em humanos com carcinoma cervical é significativamente mais elevada do que nos pacientes saudáveis. Observou-se ainda

que o aumento da concentração do VEGF esteja correlacionado com o estágio da doença e com o aumento do tamanho tumoral (MITSUHASHI et al., 2005).

Karayiannakis et al. (2002) observaram níveis séricos de VEGF significativamente elevados em pacientes com câncer gástrico bem como uma associação significativa entre o VEGF sérico e o estágio da doença, profundidade de invasão e presença de metástase. Nos pacientes submetidos à ressecção radical houve uma diminuição do nível circulante do VEGF após tratamento e aumento deste naqueles submetidos a tratamento paliativo.

Os estudos em tumores ovarianos têm mostrado níveis elevados significativamente de VEGF nos malignos em relação aos benignos e pacientes saudáveis. Observou-se também diferença entre aqueles metastáticos e não metastáticos bem como após o tratamento realizado (LI et al., 2004).

Indivíduos com melanoma apresentam altos níveis séricos de VEGF, particularmente, àqueles com doença metastática. Além disso, altos níveis de VEGF sérico e presença de células de melanoma circulantes estão associados a uma alta taxa de recidiva nesses pacientes (OSELLA-ABATE et al., 2002). Em outro estudo altos níveis de VEGF sérico estão associados com um menor intervalo livre de doença (ASCIERTO et al., 2004).

Ao investigar os fatores angiogênicos circulantes em humanos com sarcomas de tecidos moles, Yoon et al. (2006) observaram que há uma maior concentração do VEGF plasmático nesses pacientes quando comparados aos saudáveis. Observaram ainda níveis plasmáticos de VEGF mais elevados em indivíduos com tumores maiores em relação aos tumores menores, demonstrando uma possível correlação desse fator com a extensão da doença.

Em trabalho desenvolvido por Troy et al. (2006) notou-se que cães portadores tumores apresentam níveis plasmáticos de VEGF superiores àqueles saudáveis e aqueles com doença não-neoplásica.

Wergin et al. (2004) ao analisarem o VEGF plasmático como indicador dos efeitos da radioterapia em cães com diversos tipos de tumores verificaram que não houve variação dos níveis plasmáticos desse fator antes e depois nos cães tratados com baixas doses versus altas doses de radiação, contudo, o nível plasmático do VEGF antes da terapia foi significativamente mais elevado em relação aos cães que não apresentavam tumores.

Conforme Wergin e Kaser-Hotz (2004) a medida da concentração plasmática do VEGF em cães com tumores espontâneos parece estar relacionada ao tipo histológico do tumor, de modo que, tumores do tipo épulis apresentam baixos níveis plasmáticos quando comparados a melanomas da cavidade bucal.

Em estudo realizado em cães com hemangiosarcoma, Clifford et al. (2001) constataram que a concentração do VEGF no plasma desses animais foi significativamente maior quando comparada aos níveis plasmáticos em cães saudáveis.

2.8 Concentração sérica do VEGF em pacientes com sarcomas de tecidos moles

O VEGF tem sido mensurado no soro e no plasma de seres humanos com tumor. Esse fator é ativamente secretado do tecido tumoral e a sua forma solúvel pode ser detectada no sangue circulante.

Em estudo realizado no soro de pacientes portadores de sarcomas de tecidos moles observou-se uma elevação significativa do nível de VEGF em relação aos pacientes saudáveis e aqueles que haviam se submetido à cirurgia para ampliação de margem sem evidência de doença. Foi notado ainda nível diferente significativos desse fator entre os diferentes graus tumorais (GRAEVEN et al., 1999).

Avaliando a possibilidade do VEGF sérico como marcador tumoral em sarcomas de tecidos moles de humanos Hayes et al. (2004) desenvolveram estudo com grupos que envolviam pacientes saudáveis, com tumores benignos e malignos no pré e pós-operatório tardio. Esses autores verificaram que o VEGF mensurado no pré-operatório dos pacientes com tumores esteve elevado significativamente nos tumores de graus 2 e 3 em relação aqueles com doença benigna e sem doença. Nos pacientes submetidos à ressecção cirúrgica houve uma elevação do VEGF sérico na segunda semana de pós-operatório independente da patologia, retornando aos valores basais no pós-operatório subsequente. Por volta da 24^a a 36^a semana de pós-operatório houve elevação sérica do VEGF em 4 pacientes correspondendo temporariamente ao desenvolvimento de doença metastática.

A secreção do VEGF foi avaliada e comparada no soro proveniente do sangue circulante e da veia tumoral em humanos com sarcomas de tecidos moles em diferentes momentos. Os autores observaram valores semelhantes de VEGF nos tempos de pré-operatório, intra-operatório, uma hora e um dia de pós-operatório dos pacientes doentes e controle, porém o VEGF proveniente do sangue tumoral foi mais elevado que nos pacientes saudáveis (KUHNNEN et al., 2000).

2.9 Contribuição das células do sangue circulante para os níveis do VEGF do fluxo sanguíneo

O VEGF é considerado um dos principais moduladores da angiogênese na cicatrização de feridas e no desenvolvimento embrionário, desempenha também, papel importante na fisiopatogenia de doenças como retinopatia diabética, psoríase e crescimento de tumores (CARMELIET et al., 1996; FRANK et al., 1995; FERRARA, 1999). Altos níveis séricos do VEGF têm sido descritos em pacientes com câncer (DIRIX et al., 1997). Embora o VEGF seja produzido e secretado pelo estroma e células epiteliais do tumor (LEUNG et al., 1989; WARREN et al., 1996) as células do sangue circulante podem também contribuir para o nível global do VEGF do fluxo sanguíneo. Evidências recentes sugerem importante contribuição das plaquetas no nível de VEGF do soro (BANKS et al., 1998; SALGADO et al., 1999; VERMEULEN; SALVEN; BENOY, 1999).

A agregação plaquetária ocorre caracteristicamente na superfície endotelial em resposta a uma injúria vascular e gera uma alta concentração de proteínas secretadas no local da agregação (COLLER, 1991). Partindo desse princípio, Maloney et al. (1998) estudaram *in vitro* a liberação do VEGF durante a agregação plaquetária e observaram que o VEGF foi secretado durante a agregação *in vitro* de plasma rico em plaquetas induzido pela trombina, colágeno e epinefrina. Além disso, o VEGF sérico foi significativamente mais elevado quando comparado ao do plasma.

A contribuição das células do sangue para os níveis de VEGF circulante tem sido investigada em seres humanos saudáveis e com câncer. Nesse estudo

demonstrou-se que as plaquetas e granulócitos, em particular os neutrófilos, formam importantes compartimentos para o VEGF circulante (KUSUMANTO et al., 2003).

Ao investigar a presença de VEGF em neutrófilos de pacientes humanos Gaudry et al. (1997) utilizaram três agentes indutores da síntese de VEGF e observaram que os neutrófilos apresentam um *pool* de VEGF intracelular, sugerindo que estas células parecem desempenhar atividade angiogênica fisiológica ou patológica.

Em estudo morfológico e funcional avaliando a contribuição das plaquetas para o nível de VEGF circulante, Salgado et al. (2001) observaram uma correlação significativa entre o VEGF sérico e contagem de plaquetas em uma população controle saudável, porém, não houve correlação significativa nos pacientes com câncer. Por outro lado, George et al. (2000) observaram uma correlação positiva entre a contagem de plaquetas e o VEGF sérico de pacientes com câncer de cólon-retal, não acontecendo correlação em doença benigna.

Em pacientes com leucemia aguda, linfoma e tumores sólidos foi relatado aumento da concentração sérica de VEGF e alta correlação com contagem plaquetária. Observou-se ainda que nos pacientes com remissão clínica após quimioterapia ablativa houve redução do nível de VEGF sangüíneo bem como redução da contagem plaquetária (GUNSILUIS et al., 2000).

Avaliando a expressão do VEGF-C e VEGF em células CD34+ do cordão umbilical e do sangue periférico, Wartiovaara et al. (1998) detectaram expressão do VEGF-C em células CD34+, enquanto que no sangue periférico este foi restrito as plaquetas e células T. O VEGF-C e VEGF presente nas plaquetas e liberados da agregação plaquetária junto com a liberação de tromboglobulina β sugere que estes residem nos α -grânulos das plaquetas.

2.10 Expressão do VEGF e densidade de microvasos em pacientes portadores de tumores diversos

A expressão do VEGF encontra-se elevada em muitos tipos de tumores de seres humanos, e tem sido proposta como um indicador de prognóstico relacionado com a diminuição da sobrevida em diversos cânceres (MAEDA et al., 1996; TAKANAMI et al., 1997; NEITZEL et al., 1999). Os sarcomas de tecidos moles são altamente vascularizados (DIRIX et al., 1997) e a angiogênese pode estar envolvida na progressão destes uma vez que as células de sarcomas produzem grandes quantidades de VEGF *in vitro* (VERHEUL et al., 2000).

Em carcinomas gástricos de seres humanos houve uma expressão de VEGF em 43,4% dos tumores, e a contagem de microvasos foi significativamente maior nos tumores positivos em relação aos negativos. Observou-se ainda um aumento significativo da expressão do VEGF nos tumores de pacientes que apresentavam invasão linfática, invasão venosa, metástase linfonodal e hepática (MAEDA et al., 1996).

Avaliando a expressão do VEGF em tumores do tipo colangiocarcinoma extra-hepático de humanos, Möbius et al. (2007) observaram uma alta expressão em 47% dos casos, e o VEGF estava localizado principalmente no citoplasma de células das extremidades invasivas do tumor. Não foi constatado diferença em relação a densidade de microvasos entre os tumores com alta ou baixa expressão.

A taxa de expressão do VEGF em células escamosas de tumores da cabeça e pescoço de humanos pode ser importante fator preditivo para o tempo de sobrevida livre de tumor após radioterapia. Em 75% dos pacientes que expressaram

baixos níveis de VEGF observou-se um controle local por um período de 5 anos a despeito de 18% daqueles pacientes cujos tumores tiveram alta expressão do VEGF (MARTIN et al., 2007).

Em pacientes humanos portadores de câncer prostático foi observado expressão do VEGF em 82% das biópsias realizadas. O epitélio benigno também demonstrou coloração positiva para o VEGF, porém, bem mais fraca que os adenocarcinomas. A expressão foi completamente citoplasmática sem nenhum envolvimento da membrana nem do núcleo das células (GREEN et al., 2007).

Em um estudo realizado com 28 pacientes humanos portadores de sarcomas de tecidos moles do tronco e extremidade observou-se 92,9% de positividade para o VEGF, sendo que 50% destes apresentaram expressão do VEGF em mais de 10% das células tumorais. A maioria dos tumores com forte expressão ($\geq 10\%$) era de grau intermediário ($n=3$) e alto grau ($n=9$). A densidade de microvasos foi maior nos sarcomas com forte expressão do que naqueles com fraca e ausência de expressão (PAKOS et al., 2005).

Potti et al. (2004) estudando a expressão do VEGF em sarcomas de tecidos moles de seres humanos observaram uma expressão predominante de VEGF em 24,91% dos tumores, sendo aqueles que apresentaram maior expressão os tumores do tipo leiomiossarcoma, carcinossarcoma e histiocitoma fibroso.

No trabalho desenvolvido por Kuhnen et al. (2000) o padrão de expressão do VEGF em sarcomas de tecidos moles de seres humanos foi demonstrado dentro do citoplasma em 97,8% dos casos, variando de moderado a forte em 85% dos tumores. Porém, não houve relação entre expressão do VEGF e os subtipos histiocitoma fibroso, mixossarcoma, fibrossarcoma, hemangiopericitoma e lipossarcoma, entretanto, em 66% dos sarcomas com aparência predominante

epitelióide (sarcoma sinovial) houve uma forte expressão imunoistoquímica do VEGF.

Investigando o significado clínico da expressão do VEGF em osteossarcomas de seres humanos Kaya et al. (2000) observaram coloração positiva para o VEGF em 62,9% dos tumores. O padrão de expressão foi uniforme e o VEGF estava localizado no citoplasma e/ou na membrana das células do osteossarcoma. Os autores constataram ainda que, a contagem de microvasos nos tumores positivos ao VEGF foi significativamente maior que nos tumores negativos ao VEGF.

Tumores de células basais e carcinomas de células escamosas da pele de cães o padrão de expressão do VEGF é predominantemente citoplasmático. Os tumores basais classificados como sólidos exibiram forte positividade em um grupo de células em ninho na periferia do tumor. Nos carcinomas, 80% apresentaram expressão de fraca a moderada e os demais apresentaram uma forte expressão (MAIOLINO; DE VICO; RESTUCCI, 2000).

Nos tumores testiculares de cães do tipo seminoma parece haver uma relação positiva entre a angiogênese e o grau de malignidade, pois, seminomas do tipo difuso apresentam uma expressão de VEGF significativamente maior que seminomas intratubulares (RESTUCCI et al., 2003).

O mesmo parece ocorrer em carcinomas mamários de felinos, com uma proporção de células VEGF positivas, significativamente maior em carcinomas papilar e sólido em relação aos carcinomas papilares císticos. Ainda de acordo com o grau, a expressão do VEGF foi mais elevada em tumores pobremente diferenciados quando comparados àqueles moderadamente e bem diferenciados (MILANTA et al., 2002).

Em um estudo realizado com linfomas canino houve uma alta expressão do VEGF em 60% dos tumores, com 50% ou mais das células neoplásicas apresentando imunoreatividade (escore 3). O padrão de expressão foi difuso e citoplasmático, com marcação de células endoteliais, macrófagos e plasmócitos (WOLFESBERGER et al., 2007).

Em tumores mamários benignos de cadelas há uma fraca expressão de VEGF pelas células neoplásicas, já aqueles malignos apresentaram uma forte expressão de VEGF, e na maioria destes, o VEGF foi expresso pelas células localizadas próximas ao centro do tecido necrótico. O número de células positivas para o VEGF foi significativamente maior nos tumores malignos e aumentou progressivamente do grau I para o grau III (RESTUCCI et al., 2002).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Para uma melhor compreensão os objetivos foram divididos em objetivos gerais e objetivos específicos:

3.1 Objetivos Gerais

Verificar se os animais portadores de sarcomas de tecidos moles apresentam elevação da concentração sérica de VEGF em relação ao grupo de animais saudáveis (controle);

Avaliar se os espécimes tumorais obtidos dos animais portadores de sarcomas de tecidos moles expressam VEGF;

Avaliar a densidade de microvasos nos espécimes tumorais obtidos dos animais portadores de sarcomas de tecidos moles.

3.2 Objetivos Específicos

Verificar se o padrão racial interfere na concentração sérica do VEGF dos animais portadores de sarcomas de tecidos moles;

Verificar se a quantidade de hemoglobina exerce influência sobre a concentração sérica do VEGF nos animais portadores de sarcomas de tecidos moles e nos controles;

Verificar se a contagem global de leucócitos exerce influencia sobre a concentração sérica do VEGF nos animais portadores de sarcomas de tecidos moles e nos controles;

Verificar se os neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e plaquetas exercem influencia sobre a concentração sérica do VEGF nos animais portadores de sarcomas de tecidos moles e nos controles;

Verificar se existe diferença do VEGF sérico e expressão do VEGF entre os diferentes tipos tumorais em animais portadores de sarcomas de tecidos moles;

Verificar se o existe relação entre o VEGF sérico e o volume tumoral nos animais portadores de sarcomas de tecidos moles;

Verificar se existe diferença entre os tumores positivos e negativos ao VEGF em relação a densidade de microvasos e concentração sérica do VEGF;

Comparar a concentração sérica do VEGF dos animais portadores de sarcoma de tecidos moles dos diferentes tempos com a concentração sérica do VEGF dos animais do grupo controle;

Comparar a concentração sérica do VEGF dos animais portadores de sarcoma de tecidos moles nos tempos de pré-operatório, duas semanas de pós-operatório e três meses de pós-operatório.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo recebendo o número de protocolo 577/2004 e realizado com livre consentimento do proprietário, autorizando por escrito a sua participação no estudo conforme termo de ciência e autorização (Anexo 1).

4.1 Animais e critérios de inclusão

Durante o período de outubro de 2004 a agosto de 2007 foram atendidos 384 pacientes portadores de tumores de pele e/ou partes moles. Do total, 160 animais foram operados no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da FMVZ/USP (Quadro 1). Foram incluídos na pesquisa 25 caninos (machos e fêmeas castradas) cujo diagnóstico citológico prévio fosse sugestivo de neoplasia mesenquimal e com diagnóstico histológico de sarcoma de tecidos moles, e 30 cães machos inteiros sem evidência clínica de tumor e/ou qualquer afecção (controles), encaminhados ao HOVET para orquiectomia eletiva. Os animais foram prospectivamente avaliados e comparados. Todos os animais portadores de sarcoma foram submetidos a avaliação cardiológica, parâmetros hematológico e bioquímico como avaliação pré-operatória e exames de imagem para pesquisa de metástase no pré-operatório e durante o período em que foram acompanhados após

o tratamento instituído. A tomografia computadorizada das formações foi realizada para avaliar comprometimento de tecidos adjacentes e desta forma auxiliar na indicação ou não do tratamento cirúrgico.

4.2 Exame citológico

Inicialmente todas as formações foram analisadas através de exame citológico, que consistiu na colheita de material da formação por agulha com calibre 20 X 5.5 através de capilaridade, o material colhido foi depositado em lâminas e realizado esfregaço pela técnica de *squash* e seco ao ar livre. As lâminas foram encaminhadas ao Laboratório Clínico do HOVET – FMVZ/USP, onde foram fixadas com metanol, coradas pelo método de Rosenfeld e analisadas em microscopia óptica de imersão, com aumento de 100X.

4.3 Exame de tomografia computadorizada

Os exames tomográficos foram realizados no Serviço de Diagnóstico por Imagem do HOVET – FMVZ/USP. Para a realização do exame os pacientes selecionados foram submetidos à anestesia geral, a fim de se obter o posicionamento adequado para a realização da seqüência de cortes tomográficos.

Os cortes transversais se iniciaram alguns milímetros antes do início da formação e se estenderam até a porção mais caudal da mesma. A espessura dos cortes foi de 5 ou 10mm com incremento de 5 ou 10mm entre os cortes, dependendo do tamanho da formação. As imagens foram obtidas pré e pós-injeção intravenosa de contraste iodado hidrossolúvel iônico Urografina 292^{®1} no volume de 1,5ml/kg de peso. As imagens adquiridas foram fotografadas em câmera multiformato MFC640², com seleções de janela e nível que permitiram adequada avaliação de partes moles e arcabouço ósseo quando necessário. A tomografia computadorizada realizada das formações foi para avaliar comprometimento de tecidos adjacentes e desta forma auxiliar na indicação ou não do tratamento cirúrgico (Figura 1).

4.4 Procedimento anestésico e cirúrgico

O procedimento anestésico realizado foi elaborado pelo Serviço de Anestesia - HOVET - FMVZ/USP, levando-se em consideração as condições clínicas de cada paciente, tanto para o exame de tomografia computadorizada e para o tratamento cirúrgico.

A excisão cirúrgica das formações foi sempre realizada obedecendo a técnica da cirurgia oncológica e manipulação de tumores preconizada por Szentimrey (1998).

¹ Schering do Brasil Indústria Química Farmacêutica Ltda

² General Eletric

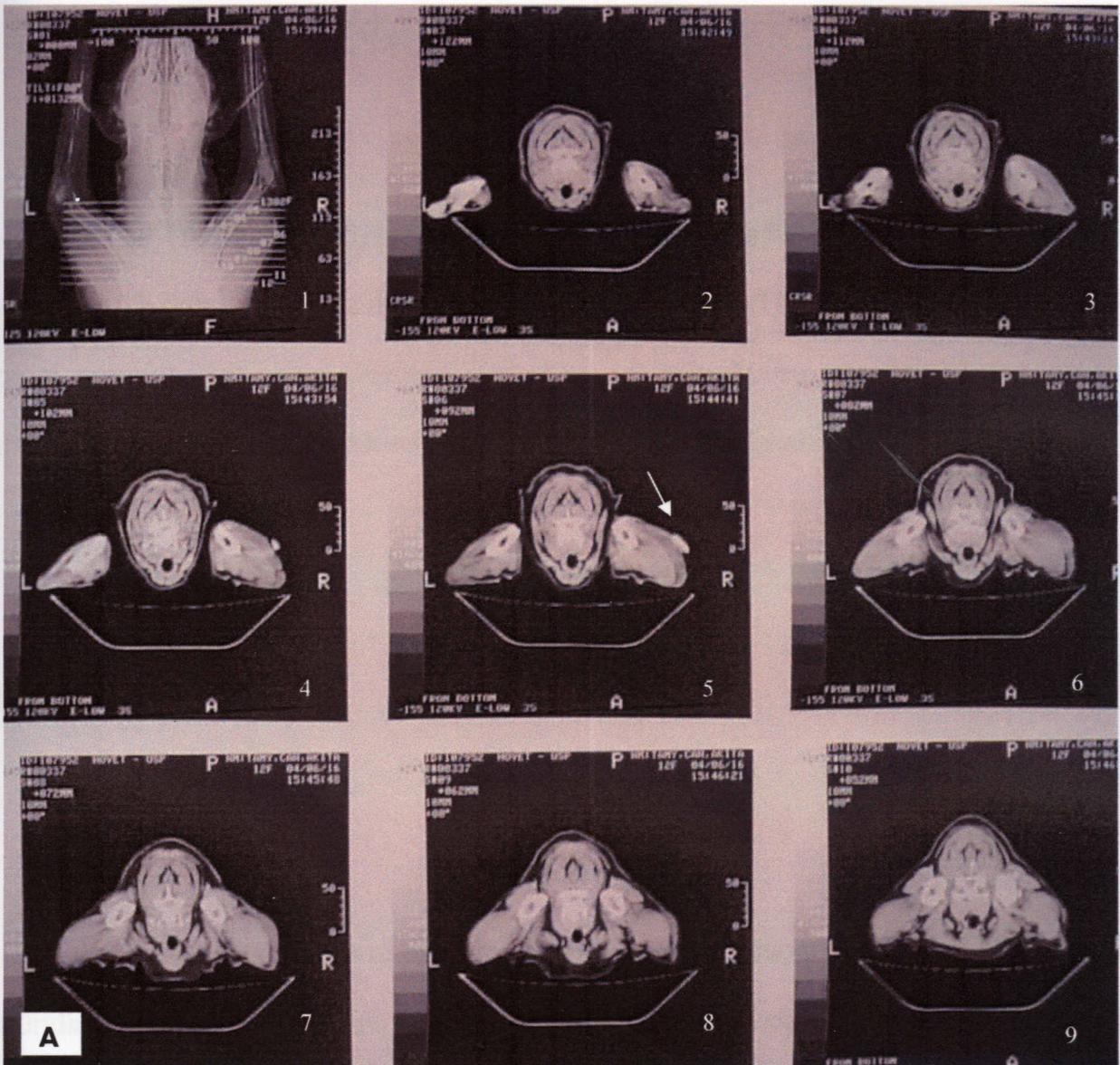


Figura 1- Imagens de exame tomográfico pré-contraste (animal n.º 4) em aproximação com 10mm de espessura e 10mm de incremento onde se observa formação de aspecto alongado em face lateral de membro torácico direito que se estende do terço distal ao terço proximal do úmero, essa formação apresenta pequena porção calcificada medindo 1,0 cm no sentido distal-proximal (seta), 3,0 cm no sentido crânio-caudal e 1,0 cm de profundidade em região distal do úmero (face lateral), o restante da formação com atenuação de partes moles homogênea e aspecto alongado, estende-se do terço distal do úmero para o sentido proximal por 9,0cm com até 2,0cm de profundidade; por toda a face lateral envolvendo o músculo tríceps braquial especialmente sua cabeça longa onde, sob a área calcificada após a injeção do contraste não se observou ponto de clivagem. Serviço de Diagnóstico por Imagem - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

4.5 Exame histológico

Todas as formações removidas foram fixadas em formol tamponado salino a 10%, enviadas ao Serviço de Patologia Animal - HOVET - FMVZ/USP, onde foram processadas pelas técnicas rotineiras de inclusão em parafina, cortadas a 6 μm e coradas pela hematoxilina-eosina para realização da análise histopatológica.

4.6 Estadiamento Clínico

Para o estadiamento clínico adotou-se classificação TNM da Organização Mundial de Saúde (OWEN, 1980) onde T corresponde a dimensão do tumor primário, N, o envolvimento de linfonodos e M, metástase distante. O tamanho das formações foi mensurado com auxílio de paquímetro, medindo-se comprimento, largura e profundidade e o volume das formações foi obtido a partir da fórmula do elipsóide. A fórmula do elipsóide é $\frac{4}{3} \times \Pi abc$ onde abc são os semi-diâmetros nas três dimensões do tumor. Os linfonodos regionais foram avaliados por meio de palpação e inspeção. Para pesquisa de metástases à distância foram realizados exames de radiografias torácicas e ultra-sonografia do abdome quando convenientes.

4.7 Colheita de sangue e mensuração da concentração do VEGF

Foram coletadas amostras de sangue da veia cefálica da mesma maneira nos tempos de pré-operatório, com duas semanas e com três meses de pós-operatório dos animais portadores de sarcoma, as quais foram colocadas em tubo estéril de vacutainer contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e encaminhadas ao Serviço de Laboratório Clínico - HOVET – FMVZ/USP, para realização do hemograma, e em tubos estéreis de vacutainer SST™ Gel & Clot Activator, para obtenção do soro e posterior mensuração do VEGF. Foi coletada a mesma quantidade de sangue dos animais controle da mesma forma e armazenado, para realização do hemograma e obtenção do soro para mensuração do VEGF uma única vez.

Após a colheita do sangue dos animais aguardou-se 30 minutos até a formação do coágulo e em seguida foram encaminhadas ao Laboratório Clínico onde foram centrifugados a 3200 rpm durante 5 minutos para obtenção do soro, armazenados sob refrigeração a 70 graus negativos. Todas as amostras foram submetidas a apenas um ciclo de descongelamento e as medidas da concentração do VEGF foram determinadas utilizando um método quantitativo (kit ELISA)³ desenvolvido para mensurar os níveis de VEGF solúvel (VEGF₁₆₅ e VEGF₁₂₁), em diversos fluidos humanos. Os valores das concentrações foram calculados de acordo com o protocolo do fabricante e obtidos em picograma por mililitro (pg/mL).

³ Quantikine – R & D Systems

4.8 Imunoistoquímica do VEGF e do fator VIII

As secções em paraplast foram desparafinizadas em xilol (2 x de 10 minutos), reidratadas em uma série de etanol com concentrações decrescentes (absoluto I e II, 95%, 70%, 50%, 5 minutos cada) e lavadas em água destilada (1 x de 5 minutos). Todas as lavagens seguintes foram realizadas com solução tamponada de fosfato (PBS a 0,15M, pH 7,2) 3 vezes de 5 minutos cada. Posteriormente as lâminas foram imersas em tampão citrato e receberam tratamento em microondas (3 x de 5 minutos em potência máxima) para melhor exposição dos antígenos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada, durante 10 minutos, com peróxido de hidrogênio a 1,0% em álcool metílico durante 30 minutos. As secções foram incubadas com anticorpo primário, por 20 horas a 4°C. Os detalhes sobre os anticorpos utilizados encontram-se no quadro 1.

Depois da lavagem em PBS, foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulinas de camundongos em temperatura ambiente. Na seqüência as lâminas foram incubadas com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase, por uma hora, em temperatura ambiente, e a revelação com solução contendo diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. As lâminas foram contra-coradas com hemtoxilina, lavadas em água corrente por 15 minutos e montadas com glicerina/gelatina. As lâminas foram visualizadas em Microscópio Nikon Eclipse (E-800) equipado com câmera de vídeo (Coll snap- Proc cf color®). As imagens foram capturadas usando o software Image-Pro Plus.

Quadro 1 – Detalhes dos anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica – São Paulo - 2007.

Anticorpos	Clone, Isotipo	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor (n.º de catálogo)
VEGF (Humano)	VG76e, IgG monoclonal	Camundongo	1:100	Abcam (ab-119)
Fator VIII	policlonal	Coelho	1:200	Dako

4.9 Determinação da expressão do VEGF e da densidade vascular

A expressão do VEGF e a densidade de microvasos foram investigadas em espécimes tumorais de 20 animais dos 25 incluídos no estudo. A expressão do VEGF foi quantificada por meio da observação de células positivas e/ou negativas para o VEGF em objetiva de 20X. Foram levadas em consideração as marcações de células intra-tumorais e células da região peri-tumoral.

O estudo da microvascularização tumoral foi realizado por meio da mensuração do número de vasos sangüíneos por lâmina de cada tumor. A quantificação foi realizada escolhendo-se aleatoriamente 5 campos de cada lâmina em objetiva de 10X. Estabeleceu-se que o número total de vasos, obtidos em cada caso, seria o resultado do somatório do número de vasos contados em cada um dos 5 campos histológicos avaliados. Convencionou-se, ainda, considerar como unidade vascular a presença obrigatória de células coradas em castanho margeando o espaço luminal.

4.10 Análise estatística

Inicialmente os valores obtidos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a hipótese de que os dados seguissem a distribuição normal – paramétricos ou não-paramétricos. O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os valores do VEGF dos animais com sarcoma em relação ao padrão racial, os valores do VEGF e densidade de microvasos dos diferentes tipos histológicos tumorais e o VEGF sérico destes animais nos tempos de pré-operatório, duas semanas e três meses de pós-operatório.

O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparar os valores do VEGF sérico dos animais do grupo controle em relação ao VEGF sérico dos animais portadores de sarcoma nos tempos de pré-operatório, duas semanas e três meses de pós-operatório, bem como, para comparar o VEGF sérico dos animais portadores de sarcoma no tempo de pré-operatório e a densidade de microvasos entre os tumores positivos e negativos ao VEGF.

O teste de Spearman foi utilizado para avaliar a relação entre o VEGF sérico no pré-operatório dos animais com sarcoma e o volume de seus tumores, a relação entre o VEGF sérico no pré-operatório e a densidade de microvasos, já a correlação de Pearson foi realizada para avaliar o VEGF sérico no pré-operatório em relação os parâmetros hematológicos nos doentes e controles.

Utilizou-se o teste de comparação de proporções para comparar os padrões de expressão (peri-tumoral e intra-tumoral) entre os diferentes tipos de tumores.

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05. Foram utilizados para a realização desta análise estatística os softwares: MSOffice Excel versão 2000 para gerenciamento de banco de dados; MINITAB 14 para a execução dos cálculos estatísticos, elaboração e edição de gráficos. Na elaboração das tabelas e para a redação foi utilizado o MSOffice Word versão 2000.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Dentre os animais portadores de sarcoma de tecidos moles foram utilizados 17 (68%) cães machos inteiros, 1 (4%) macho castrado e 07 (28%) fêmeas castradas. Assim sendo fêmeas inteiras não foram incluídas, pois no trato reprodutor feminino o VEGF desempenha papel importante no desenvolvimento cíclico dos vasos sanguíneos, e também para o desenvolvimento do corpo lúteo (FERRARA et al., 1998) podendo interferir nos resultados.

Dos 25 caninos estudados, 11 (44%) eram sem padrão racial definido (SRD) e 14 (56%) com raça definida (CRD) (Tabela 1). O valor médio do VEGF sérico dos animais com raça definida portadores de sarcoma tecidos moles no período de pré-operatório foi de 10,20 pg/mL com uma dispersão em torno da média de 14,69 pg/mL para mais ou para menos, tem-se que 50% deles possui VEGF sérico inferior a 6,39 pg/mL. Observou-se um ponto influente no caso dos animais com raça definida, que se trata de um poodle macho que apresentou um VEGF de 55,22 pg/mL. Para os cães sem raça definida a média do VEGF sérico foi de 17,60 pg/mL com uma dispersão em torno da média de 14,01 pg/mL para mais ou para menos, tem-se que 50% dos cães possui VEGF inferior a 12,84 pg/mL. Não houve diferença estatística ao nível de significância de 5% pelo teste de Kruskal-Wallis para os cães com raça definida e sem raça definida ($p= 0,078$), (Figura 2).

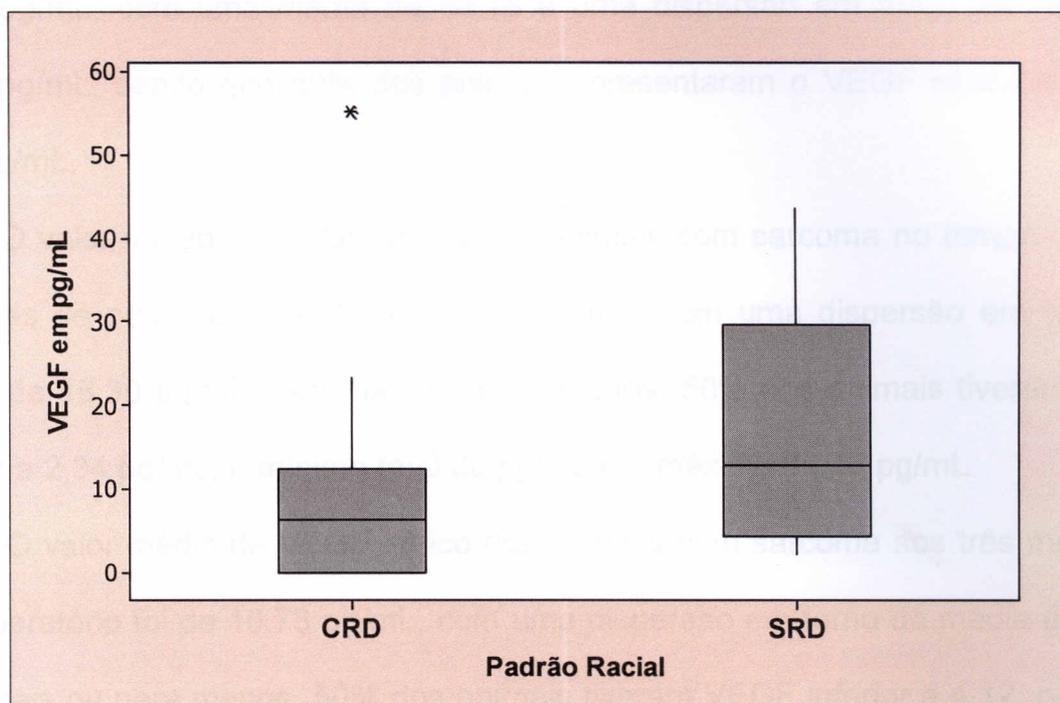


Figura 2 - Valores do VEGF sérico no pré-operatório em relação ao padrão racial dos cães portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

Os animais do grupo controle eram todos machos inteiros, sendo 4 com padrão racial definido e 26 sem raça definida. A idade média dos animais portadores de sarcoma era de $129,84 \pm 31,16$ meses variando de 64 a 181 meses, e do grupo controle era de $38,67 \pm 32,23$ meses, variando de 5. a 99 meses. A idade média dos animais com câncer foi significativamente superior à idade dos animais controle ($p=0,001$).

A concentração sérica do VEGF dos animais do grupo controle variou de 0,00 a 35,44 pg/mL, com um valor médio de 13,32 pg/mL e uma dispersão em torno da média de 10,57 pg/mL para mais ou para menos, 50% dos animais tiveram VEGF sérico inferior a 10,26 pg/mL. Os valores da concentração sérica do VEGF dos animais controles e dos doentes nos diversos tempos estão descritos na tabela 2.

Em relação aos animais portadores de sarcoma de tecidos moles a concentração sérica do VEGF no tempo de pré-operatório – PO variou de 0,00 a

55,22 pg/mL, com uma média de 13,28 e uma dispersão em torno da média de 14,58 pg/mL, sendo que 50% dos animais apresentaram o VEGF sérico inferior a 8,61 pg/mL.

O valor médio de VEGF sérico dos animais com sarcoma no tempo de duas semanas de pós-operatório foi de 11,04 pg/mL, com uma dispersão em torno da média de 18,30 pg/mL para mais ou para menos, 50% dos animais tiveram VEGF inferior a 2,34 pg/mL, o mínimo foi 0,00 pg/mL e o máximo 69,13 pg/mL.

O valor médio de VEGF sérico dos animais com sarcoma aos três meses de pós-operatório foi de 10,78 pg/mL, com uma dispersão em torno da média de 17,36 para mais ou para menos, 50% dos animais tiveram VEGF inferior a 4,12, o mínimo foi 0,00 e o máximo foi 66,39. De acordo com o teste Kruskal-Wallis não houve diferença significativa ao nível de 5% ($p = 0,24$) entre os valores do VEGF sérico nos animais portadores de sarcoma de tecidos moles nos tempos de pré-operatório, duas semanas e três meses de pós-operatório.

Ao comparar a concentração do VEGF sérico dos animais do grupo controle com os animais portadores de sarcoma de tecidos moles no tempo de pré-operatório não houve diferença significativa ao nível de 5% ($p = 0,64$) pelo teste de Mann Whitney, porém, ao utilizar o mesmo teste para comparar VEGF sérico dos animais do grupo controle com o VEGF dos portadores de sarcoma no tempo de duas semanas de pós-operatório observou-se uma diferença significativa ao nível de 5% ($p = 0,03$). Já para o VEGF sérico dos animais controle e daqueles portadores de sarcoma no tempo de três meses de pós-operatório não houve diferença significativa ($p = 0,06$). Através do gráfico abaixo, observa-se a presença de pontos influentes nos valores de VEGF dos animais com sarcoma para os tempos de pré-operatório, duas semanas e três meses de pós-operatório (Figura 3).

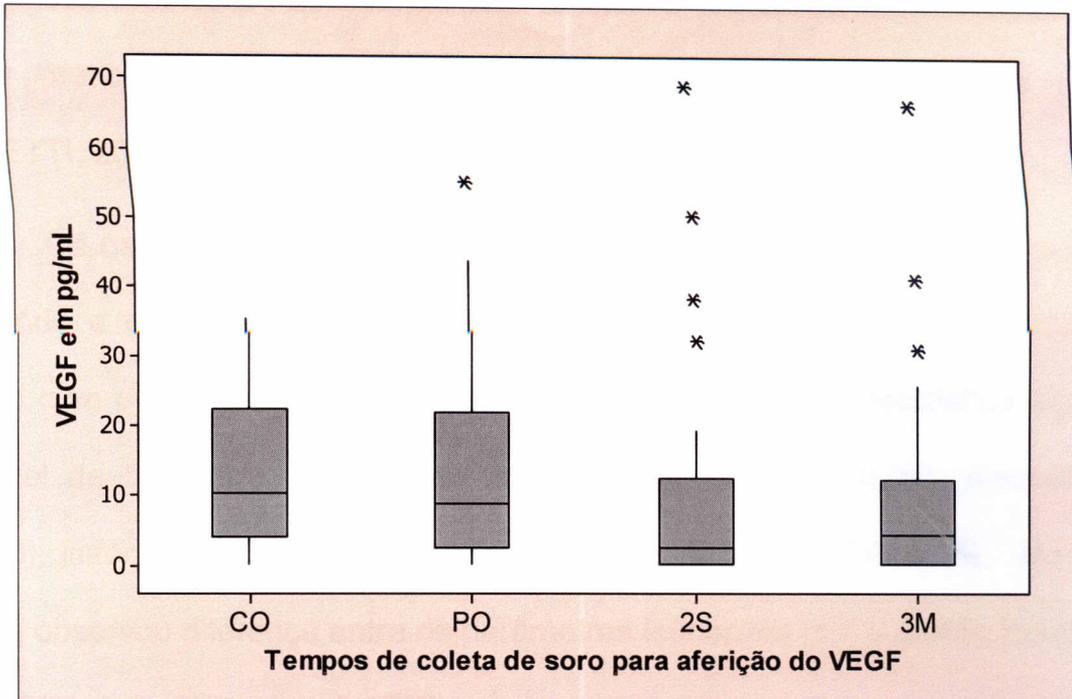


Figura 3 - Valores do VEGF sérico dos animais controle - CO e portadores de sarcoma nos tempos de pré-operatório -PO, duas semanas - 2S e três meses de pós-operatório - 3M, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

Em relação à classificação TNM, onde T corresponde a dimensão do tumor primário, N, o envolvimento de linfonodos e M, metástase distante, nenhum animal apresentava comprometimento de linfonodos regionais e/ou metástase à distância ao momento do diagnóstico das formações. Porém, aos três meses de pós-operatório houve recidiva tumoral no animal de número 12 e metástase pulmonar no animal de número 23. Quanto ao volume dos tumores o valor médio foi de $252,4 \pm 326,7 \text{ cm}^3$ variando de $3,92$ até $1281,7 \text{ cm}^3$, com 50% dos tumores estudados apresentando tamanho inferior a $72,9 \text{ cm}^3$. Pode-se observar pelo teste de correlação de Spearman que não houve uma correlação positiva significativa entre as variáveis volume tumoral e VEGF sérico nos animais portadores de sarcoma de tecidos moles no tempo de pré-operatório ($r_s = 0,3138$ e o valor tabelado é $0,3977$, como o valor calculado r_s não é maior que o tabelado, logo, não existe uma correlação significativa). Como os dados possuem valores influentes e existe

violação das condições necessárias para calcular a regressão linear simples, optou-se por realizar o cálculo de uma regressão resistente, utilizando a mediana (MORETTI, 2000).

Os parâmetros hematológicos dos animais com sarcoma no tempo de pré-operatório e controles foram mensurados e comparados entre si (Tabela 3). De acordo com o teste de Mann Whitney observou-se diferença estatística significativa ao nível de 5% entre os parâmetros de hemoglobina ($p = 0,05$), plaquetas ($p = 0,0000$), linfócitos ($p = 0,0282$) e eosinófilos ($p = 0,0063$) (Tabela 4). No entanto, não se observou diferença entre os parâmetros leucócitos ($p = 0,6148$), neutrófilos ($p = 0,6708$) e monócitos ($p = 0,1769$).

Tabela 4 – Medias e valores de p dos parâmetros hematológicos de hemoglobina, plaquetas e linfócitos dos animais do grupo controle e dos animais com sarcoma no pré-operatório, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007.

PARAMETROS HEMATOLÓGICOS		MEDIANA	VALOR DE P
Hemoglobina	Controle	16,6	0,05
	sarcoma	15,1	
Plaquetas	Controle	235000	0,0000
	sarcoma	324000	
Linfócitos	Controle	1980	0,0282
	sarcoma	1424	
Eosinófilos	Controle	728,0	0,0063
	sarcoma	376,0	

Ao analisar a relação entre o VEGF sérico e os parâmetros hematológicos nos animais do grupo controle observou-se que não houve correlação com nenhum dos parâmetros, entretanto, nos animais com sarcoma no período de pré-operatório houve correlação negativa do VEGF sérico pré-operatório com a hemoglobina ($r = -0,501$; $p = 0,013$) correlação positiva deste com os leucócitos ($r = 0,574$; $p = 0,03$),

neutrófilos ($r= 0,636$; $p= 0,001$) (Figura 4). Após duas semanas de pós-operatório dos animais portadores de sarcoma observou-se que não houve correlação da concentração do VEGF sérico com nenhum dos parâmetros hematológicos.

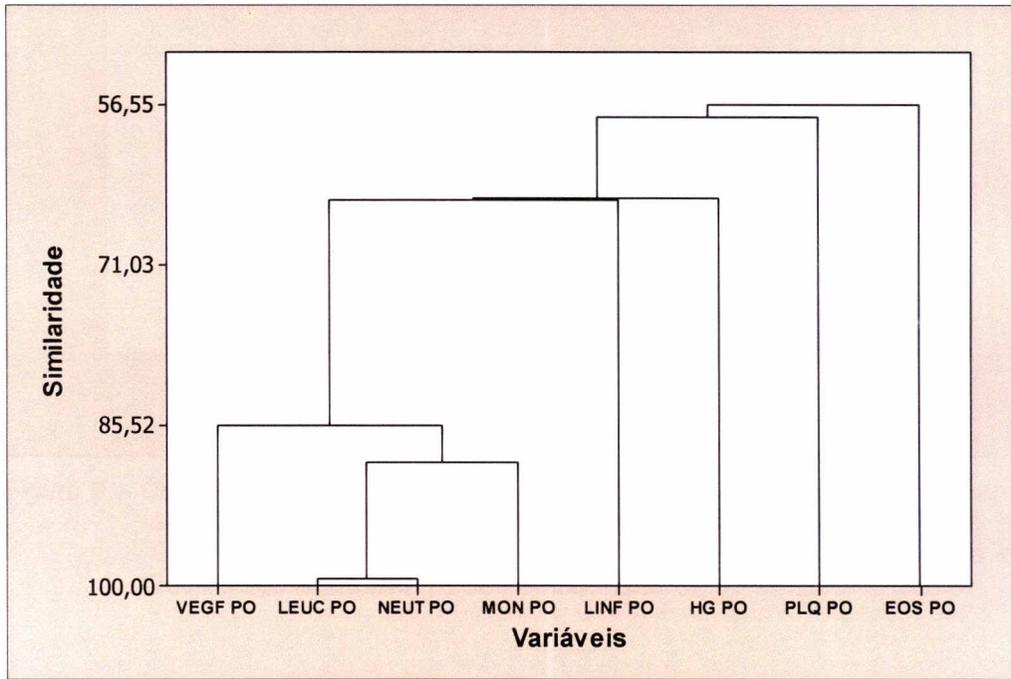


Figura 4 - Gráfico da correlação do VEGF sérico dos animais com sarcoma no pré-operatório com os parâmetros hematológicos, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

O diagnóstico histológico consistiu de 10 (40%) tumores malignos da bainha neural periférica (TMBNP), 06 (24%) hemangiopericitoma (HPT) e 09 (36%) outros sarcomas (OUTROS) conforme descritos na tabela 2. Não houve diferença estatística significativa do VEGF sérico no pré-operatório em relação aos diferentes tipos de tumores conforme o teste de Kruskal-Wallis ($p= 0,704$) (Figura 5).

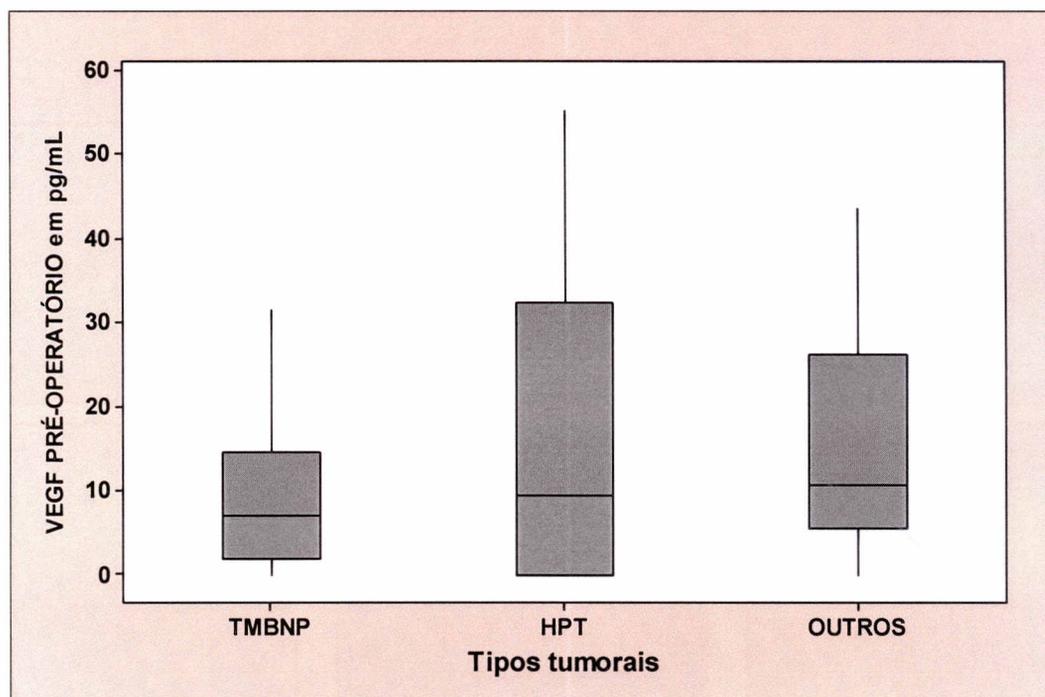


Figura 5 – Concentração do VEGF sérico no pré-operatório dos cães com sarcoma em relação ao diferentes tipos histológicos dos tumores, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

A expressão do VEGF e a densidade de microvasos foi investigada em 20 espécimes tumorais de 20 cães portadores de sarcoma de tecidos moles conforme disposto na tabela 2. Considerou-se para efeitos de expressão tumoral do VEGF as células positivas a este, tanto intra-tumoral quanto na região peritumoral. Dos espécimes avaliados observou-se expressão do VEGF em 65% (Figura 6), e ausência de expressão em 35% dos casos. Dentre os tumores que expressaram o VEGF observou-se que em 92,3% esta expressão ocorria na região peritumoral, 46,15% na região intra-tumoral e em 38,46% dos casos havia expressão tanto intra quanto peritumoral. Pode-se observar ainda que os tipos celulares predominantes responsáveis pela expressão do VEGF ora na região peritumoral ora na pseudocápsula eram fibroblastos e macrófagos (Figura 6D e 6I). As células tumorais eram responsáveis pela expressão do VEGF na região intra-tumoral.

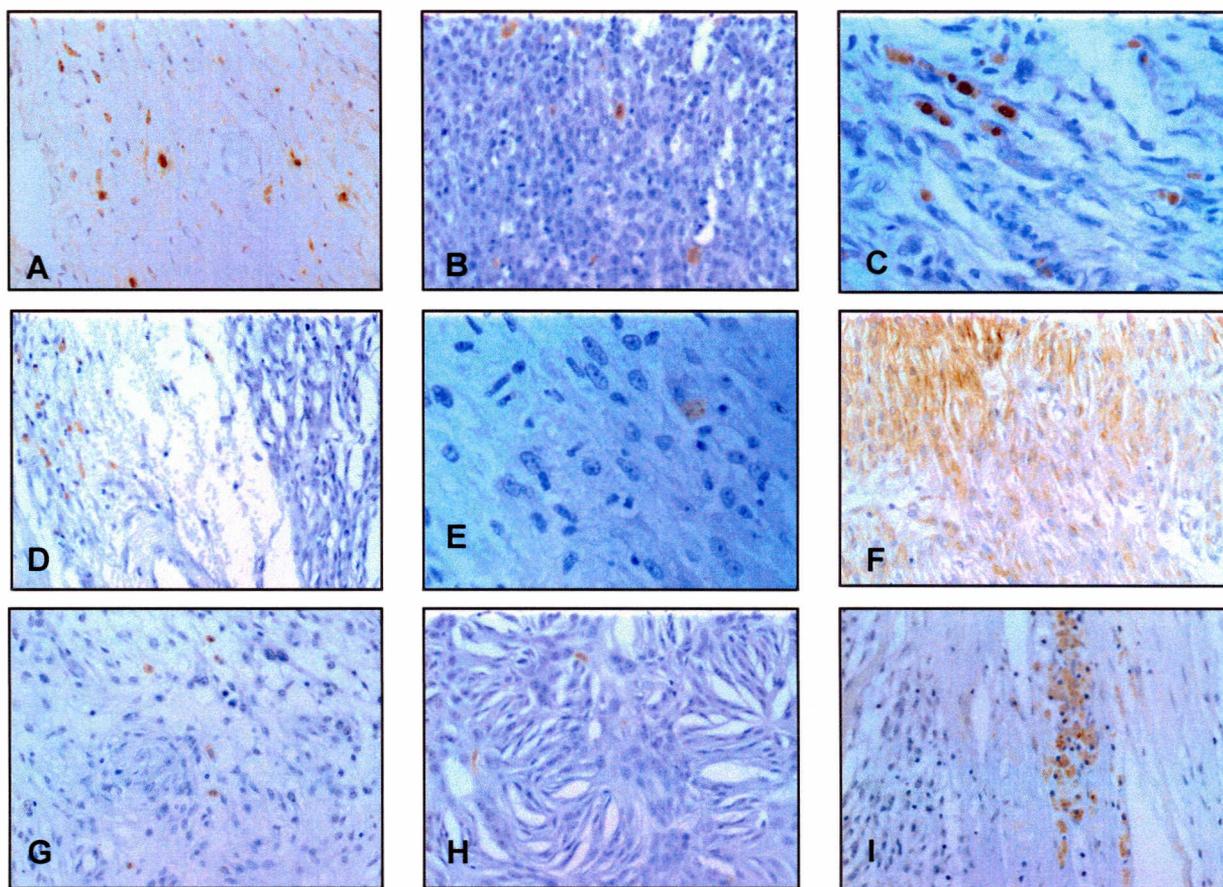


Figura 6 – Fotomicrografia da presença de expressão do VEGF em: **A** – TMBNP – (animal nº. 5); **B** - Hemangiossarcoma - (animal nº. 12); **C** - Mixossarcoma – (animal nº. 11), **D** – TMBNP - (animal nº. 23); **E** – Hemangiopericitoma - (animal nº. 17); **F** - , Hemangiopericitoma - (animal nº. 16); **G** - Hemangiopericitoma - (animal nº. 18); **H** - TMBNP - (animal nº. 25); **I** - Hemangiopericitoma - (animal nº. 2), reação de imunistoquímica para o VEGF, coloração com HE, aumento de 200X. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

Considerando-se o padrão de expressão do VEGF na região peri-tumoral nos diferentes tipos de tumores pode-se observar que não houve diferença significativa entre TMBNP vs HPT ($p = 0,33$), TMBNP vs OUTROS ($p = 0,43$) HPT vs OUTROS ($p = 0,40$). Já em relação ao padrão de expressão do VEGF na região intra-tumoral observou-se que os tumores do tipo hemangiopericitoma (HPT) apresentaram uma maior expressão de VEGF em relação aos tumores malignos da bainha neural

periférica ($p = 0,04$), entre os demais TMBNP vs OUTROS ($p = 0,11$), HPT vs OUTROS ($p = 0,36$) não houve diferença significativa.

A quantidade de microvasos variou de 40 a 259 vasos por tumor, com uma média de $134,85 \pm 61,12$ vasos (Figura 7).

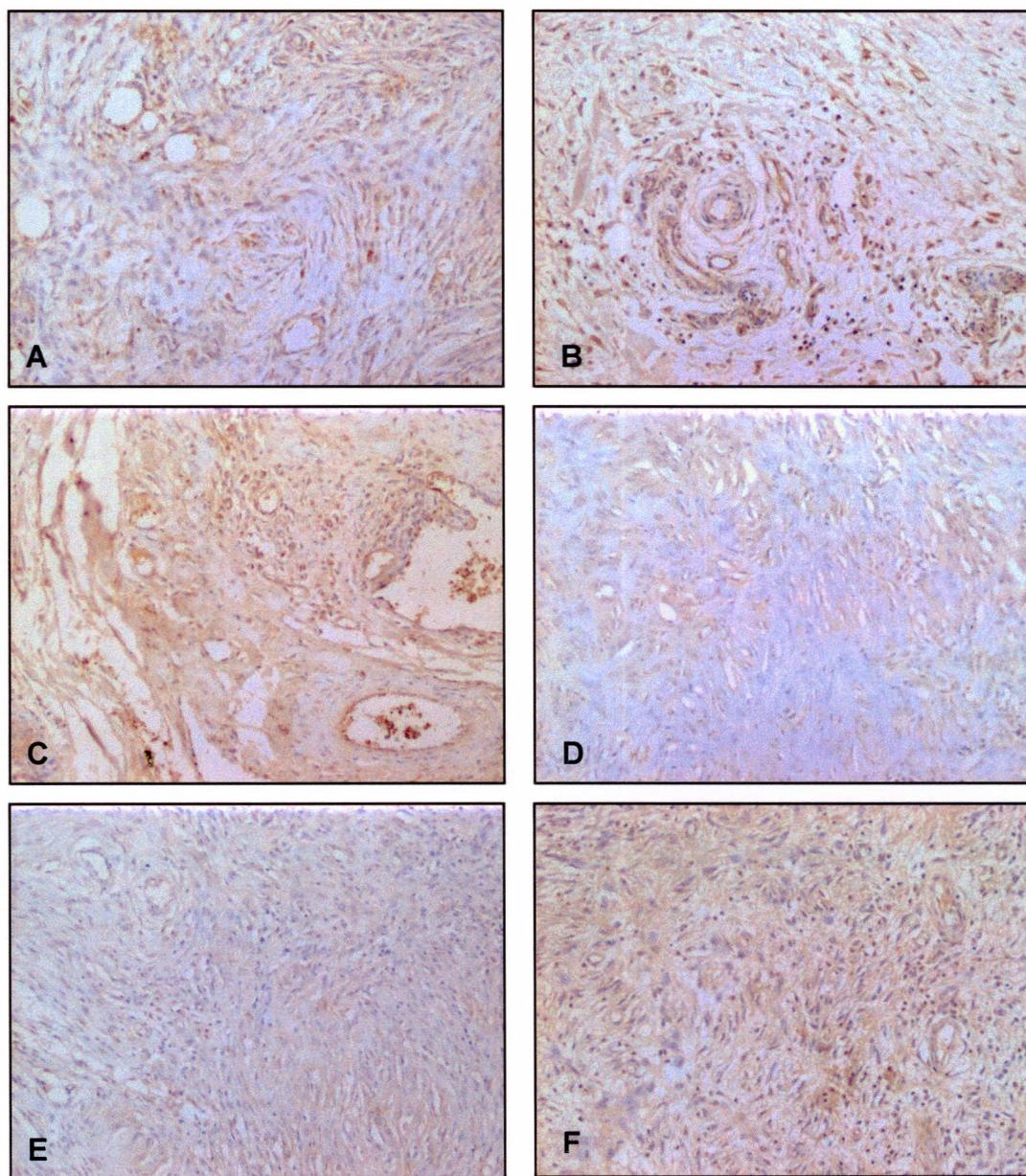


Figura 7 – Fotomicrografia da densidade de microvasos em: **A** – Mixossarcoma (animal n.º. 11); **B** – Osteossarcoma extra-esquelético (animal n.º. 4); **C** – Hemangiossarcoma (animal n.º. 8); **D** – TMBNP (animal n.º. 9); **E** – TMBNP (animal n.º. 54); **F** – Hemangiopericitoma, (animal n.º. 3) reação de imunistoquímica para o fator VIII, coloração com HE, aumento de 200X. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

Utilizando-se o teste de Mann Whitney para comparar a densidade de microvasos entre os tumores positivos e negativos ao VEGF, observou-se que não houve diferença significativa ($p = 0,3416$) em relação a esse parâmetro (Figura 8). Ainda em relação à densidade de microvasos, desta vez por tipo tumoral, observou-se que os diferentes tipos de tumores apresentam um comportamento semelhante entre si ($p = 0,5$), conforme apresentado na figura 9.

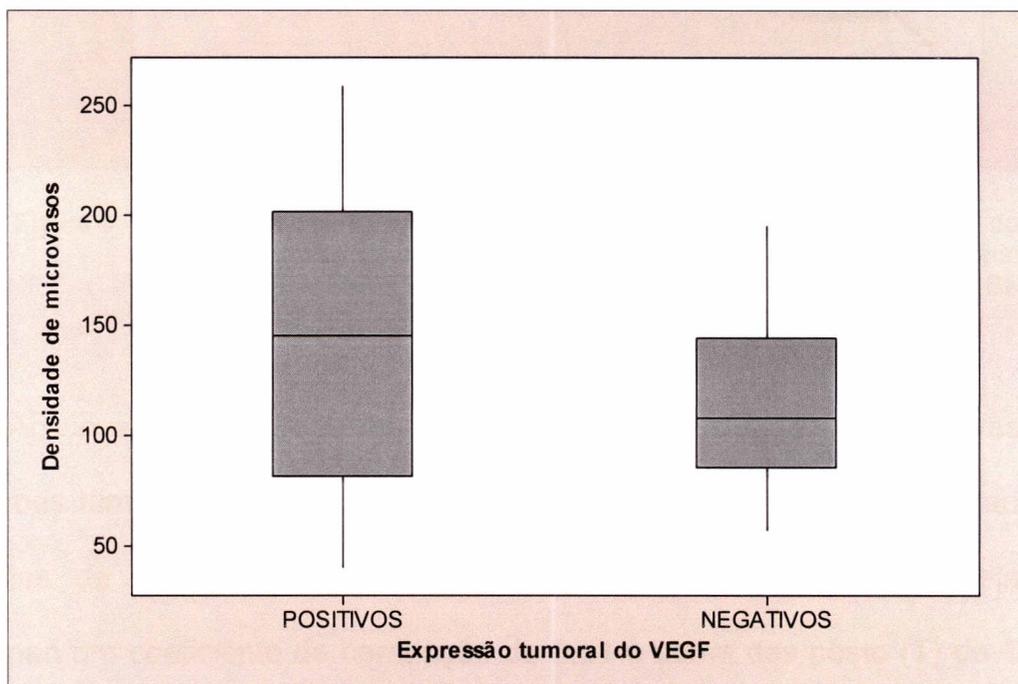


Figura 8 – Densidade de microvasos em relação a expressão de VEGF nos espécimes tumorais dos cães portadores de sarcoma. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

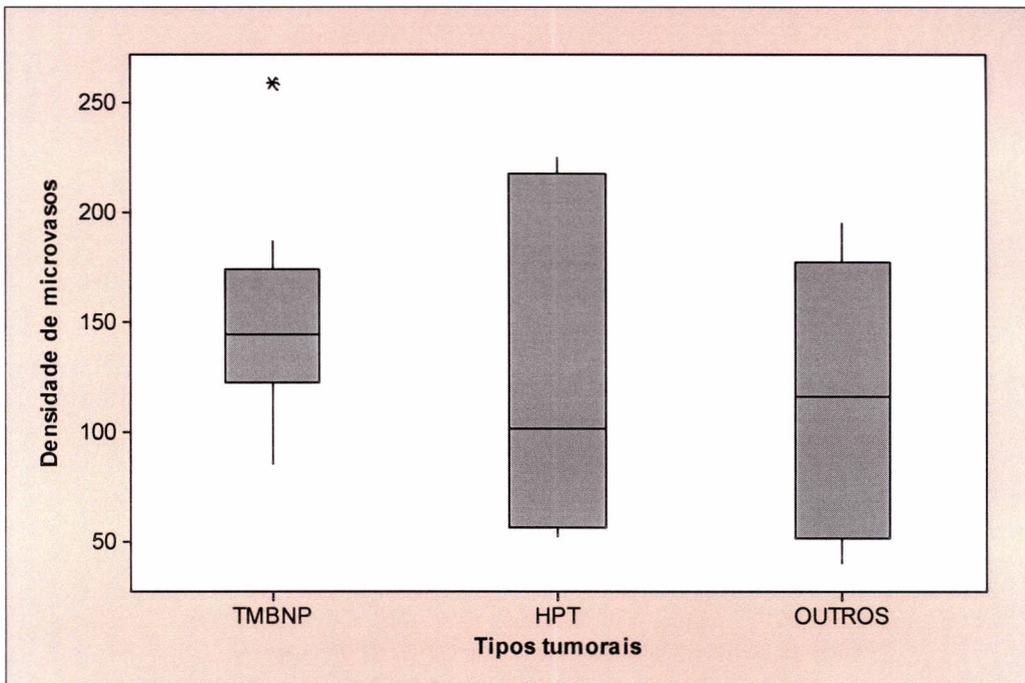


Figura 9 – Densidade de microvasos por tipo tumoral nos espécimes tumorais dos cães portadores de sarcoma. Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

Ao investigar a possível correlação da densidade de microvasos nos espécimes tumorais com a concentração sérica do VEGF nos cães portadores de sarcomas de tecidos moles obtivemos por meio do teste de correlação de Spearman um coeficiente de correlação de 0,51 e soma dos postos (T) de 139 para os tumores positivos. Porém, considerando-se o grau de erro de 0,05 e observando a tabela A11 de Conover cujo quantil a esse grau de erro é de 144, observamos que esse valor supera ao valor de T (soma dos postos) e dessa forma não existe correlação entre as variáveis em estudo (Figura 10).

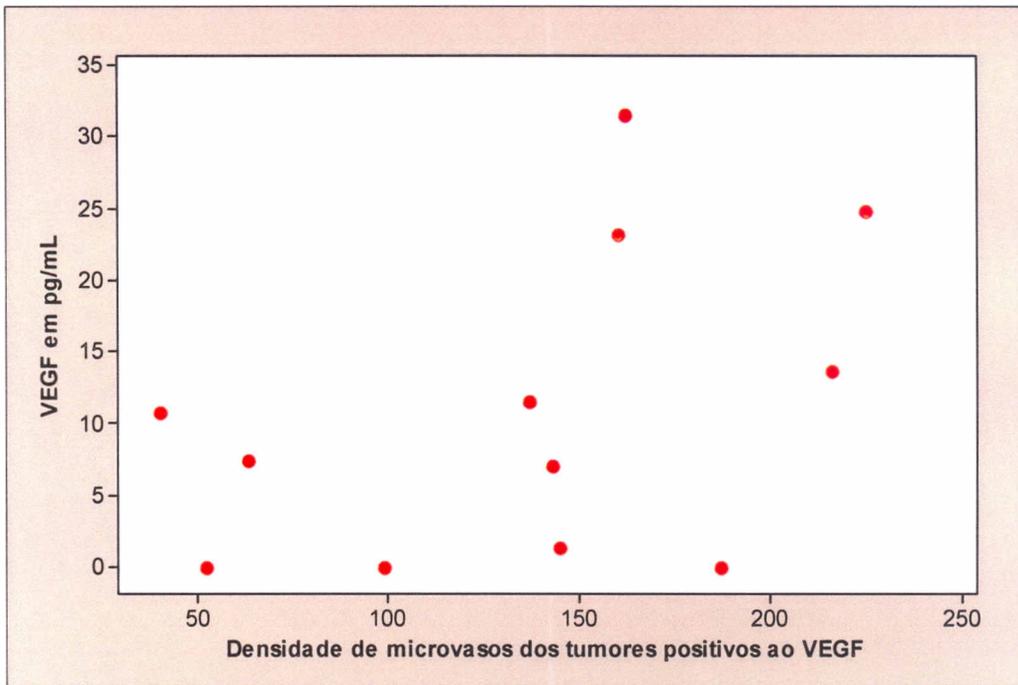


Figura 10 - Correlação do VEGF sérico dos animais com sarcoma no pré-operatório com a densidade de microvasos nos espécimes tumorais dos cães portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

Através do teste de Mann Whitney para investigar se há relação da expressão do VEGF com os níveis circulantes desse fator observou-se que tumores positivos e negativos ao VEGF apresentam níveis circulantes semelhantes entre si ($p = 0,44$) (Figura 11).

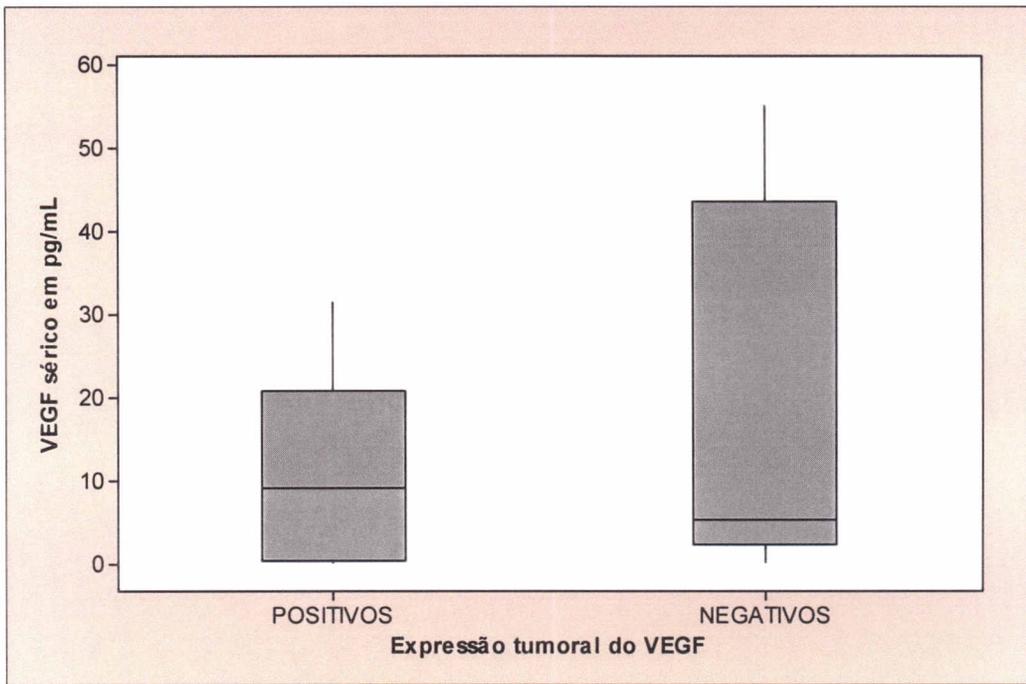


Figura 11 – Concentração do VEGF sérico em relação aos espécimes tumorais positivos e negativos ao VEGF dos cães portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A angiogênese desempenha papel fundamental para a progressão tumoral tendo em vista que na ausência de novos vasos os tumores só conseguem crescer cerca de 2 a 3 mm (FOLKMAN, 1990). Além disso, a neovascularização tem participação no desenvolvimento de metástase aumentando a possibilidade das células tumorais atingirem a circulação (LIOTA; KLEINERMAN; SAIDEL, 1974).

O fator de crescimento do endotélio vascular é apontado como o principal fator envolvido na angiogênese de tumores em muitos estudos (FERRARA, 2000; TOU; MATSUMOTO; BANDO, 2001). Na maioria dos tumores humanos a expressão do VEGF encontra-se aumentada, tanto em células tumorais quanto em células do próprio organismo (FERRARA, 1999), estando associado a um aumento da vascularização local e pobre prognóstico (GASPARINI et al., 1997; MAEDA et al., 1996). Na literatura veterinária há poucos trabalhos investigando o papel deste fator para o crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases (MAIOLINO; DEVICO; RESTUCCI, 2000; RESTUCCI et al., 2002; RESTUCCI et al., 2003; MILLANTA et al., 2002; TROY et al., 2006; WERGIN; KASER HOTZ, 2004; WERGIN et al., 2004; CLIFFORD et al., 2001). Desse modo, nos propusemos investigar a concentração do fator de crescimento do endotélio vascular em cães portadores de sarcoma de tecidos moles antes e após procedimento de ressecção e comparar com um grupo de animais sem tumores (controle).

O VEGF tem sido mensurado no soro (KRAFT et al., 1999; HAYES et al., 2004; LINDER et al., 1998; KARAYIANNAKIS et al., 2002; LI et al., 2004; ASCIERTO et al., 2004; GRAEVEN et al., 1999; YAMAMOTO et al., 1996; SALGADO et al.,

2001; MITSUHASHI et al., 2005; OSELLA-ABATE et al., 2002; KUHNNEN et al., 2000) e no plasma de seres humanos (YOON et al., 2004) e de cães (TROY et al., 2006; WERGIN; KASER HOTZ, 2004; WERGIN et al., 2004; CLIFFORD et al., 2001) com tumor. Esse fator é ativamente secretado do tecido tumoral e a sua forma solúvel pode ser detectada no sangue circulante. No presente trabalho optou-se por investigar a concentração do VEGF no soro de animais com câncer pela maior facilidade de obtenção desse fluido na expectativa de que no futuro pudéssemos prever a presença ou ausência de tumor avaliando a concentração desse fator nesse fluido do sangue circulante em um procedimento comumente utilizado como de rotina. Porém, da mesma maneira poderia ter sido investigado sua concentração em outros fluidos como o plasma.

Os trabalhos realizados investigando a concentração sérica do VEGF do sangue sistêmico revelam elevação da concentração do VEGF de pacientes com tumores em relação aos pacientes saudáveis em tumores do tipo carcinoma de pulmão e sarcoma de partes moles (LINDER et al., 1998), em sarcomas de tecidos moles (GRAEVEN et al. 1999; KRAFT et al., 1998; HAYES, et al., 2004; POTTI et al., 2004), em pacientes com câncer gástrico (KARAYIANNAKIS et al. 2002) melanoma (ASCIERTO et al., 2004) e tumor ovariano (LI et al., 2004). Por outro lado, Kuhnen et al. (2000) não observaram diferença na concentração do VEGF sérico do sangue sistêmico em pacientes com sarcomas de partes moles em relação aos pacientes saudáveis.

Na literatura veterinária os trabalhos refletem elevação da concentração do VEGF plasmático em diferentes tumores de cães (TROY et al., 2006; WERGIN et al., 2004; WERGIN e KASER-HOTZ, 2004; CLIFFORD et al., 2001). No Brasil não há dados a respeito da concentração sérica do VEGF em cães portadores de sarcoma

de tecidos moles, fato este que nos impulsionou a desenvolver a presente pesquisa, tendo em vista uma casuística no Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET da FMVZ/USP nos anos de 2003/2004 em torno de 51,2% em relação a outros tipos de sarcomas.

O fator de crescimento do endotélio vascular foi investigado em cães portadores de sarcoma de tecidos moles encaminhados ao Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET da FMVZ/USP antes do procedimento cirúrgico e com 2 semanas e três meses de pós-operatório e em um grupo de animais saudáveis (controle). A concentração do VEGF no soro dos animais portadores de sarcoma antes do procedimento cirúrgico foi semelhante à dos animais controles, diferentemente do que ocorreu na maioria dos tumores humanos. Apesar de não ter havido diferença dos animais doentes em relação aos controles no fluido estudado, não podemos descartar a participação do VEGF na angiogênese tumoral que já está bem definida na literatura médica. Foram utilizados 55 animais nesta pesquisa, possivelmente esta amostra não foi suficiente para detecção da diferença. Além disso, existe pelo menos cinco espécies de moléculas de VEGF diferentes, apresentando 121, 145, 165, 189, 206 aminoácido (respectivamente VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) (HOUCK et al., 1991; HOUCK et al., 1992; TISHER et al., 1991) e o kit utilizado neste trabalho só detecta o VEGF₁₂₁ e o VEGF₁₆₅. O VEGF₁₂₁ apesar de ser encontrado na forma livre, não tem muita afinidade pela heparina e é 50 a 100 vezes menos potente que o VEGF₁₆₅ na proliferação de células endoteliais (HOUCK et al., 1992; KEYT et al., 1996). Por outro lado, o VEGF₁₆₅, tem alta afinidade pela heparina, sendo encontrado na forma livre e difusível, bem como ligado a superfície celular e matriz extracelular (FERRARA et al., 1992; HOUCK et al., 1992). O VEGF pode se tornar disponível

para exercer atividade sobre células endoteliais por dois mecanismos distintos: como proteínas livremente difusíveis (VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅) ou por quebra e liberação de isoformas mais longas (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). Partindo desse princípio poderíamos inferir que não houve diferença entre o VEGF₁₂₁ e VEGF₁₆₅ dos animais doentes e controles, no entanto, poderá haver participação das outras isoformas do VEGF na angiogênese de sarcoma de cães, exercendo atividade sobre as células endoteliais pela quebra das isoformas mais longas.

Ao compararmos a concentração do VEGF sérico dos animais do grupo controle com a concentração do VEGF dos animais com câncer no tempo de duas semanas e três meses de pós-operatório, um fato que nos surpreendeu foi uma diferença significativa entre a concentração dos animais controle e daqueles com tumor no tempo de duas semanas de pós-operatório, mas não houve diferença em relação aos três meses de pós-operatório, mesmo este valor (aos três meses) com uma concentração menor que no tempo de pré-operatório e duas semanas. Este resultado não nos permite fazer conclusões assertivas a respeito desse fator nos controles e doentes nos períodos de pós-operatório, tendo em vista que há muitos pontos que influenciam nos valores do VEGF e um alto desvio padrão nos tempos de duas semanas e três meses de pós-operatório, sendo, portanto, necessário fazer uma nova análise para verificar que fatores estarão influenciando nesses resultados.

A mensuração da concentração do VEGF circulante antes e após a ressecção de tumores tem sido investigada em pacientes humanos e os resultados são controversos. Pacientes com câncer de colo retal revelam aumentos da concentração do VEGF sérico nas primeiras 4 a 6 horas após a ressecção em relação ao pré-operatório, e os valores retornando aos níveis semelhantes ao do pré-operatório por volta de 14 a 20 horas após cirurgia (GEORGE et al., 2000). De

modo semelhante, Kuhnen et al. (2000) não observaram elevação dos níveis séricos de VEGF em pacientes com sarcoma de tecidos moles no pré-operatório em relação ao pós-operatório. Por outro lado nos estudos de Hayes et al. (2004), Li et al. (2004) e Karayiannakis et al. (2002) observou-se uma redução da concentração do VEGF sérico após realização de ressecção de sarcomas de tecidos moles, tumores ovarianos e câncer gástrico respectivamente. Neste estudo, os animais portadores de sarcoma de partes moles revelaram resultados semelhantes estatisticamente antes da cirurgia, duas semanas e três meses após cirurgia. Apesar de não ter havido diferença estatística, pôde-se observar uma redução da concentração após duas semanas e três meses de pós-operatório em relação a concentração do pré-operatório. Este achado pode sugerir a participação do VEGF sérico para a angiogênese de sarcomas de partes moles em cães.

Em trabalho realizado por Yoon et al. (2004) investigando a concentração do VEGF no plasma de pacientes humanos com sarcoma de tecidos moles, os autores observaram que tumores maiores apresentam maior concentração do VEGF plasmático, por outro lado, Wergin et al. (2004) trabalhando com o mesmo fluido em cães com diversos tipos de tumores relatam não haver nenhuma correlação entre a concentração do VEGF plasmático e volume tumoral. Nesse estudo diferentemente dos realizados pelos autores supracitados, o fluido estudado foi o soro e em nossa pesquisa não observamos correlação da concentração do VEGF sérico com o volume tumoral. Porém, a correlação de Spearman para as variáveis em questão ficou muito próxima do valor tabelado provavelmente influenciado pelo tamanho da amostra. Se aumentássemos o tamanho da amostra poderíamos afirmar se há correlação do VEGF com o volume tumoral. Através de palpação e inspeção não se detectou alterações de anormalidades do tipo aumento de volume, firmeza e/ou

aderências em linfonodos regionais palpáveis ao momento do diagnóstico em nenhum animal. Isso nos leva a crer que não havia presença de metástase palpável, no entanto, não descarta a possibilidade de micrometástases não detectáveis a palpação. Nenhum animal apresentava metástase macroscópica ao exame de radiografia de tórax e ultra-sonografia de abdome ao momento do diagnóstico, porém observou-se desenvolvimento de metástase em um animal (cão nº 23) aos três meses de pós-operatório. Não foi detectado aumento da concentração do VEGF nesse animal em consonância com o surgimento da metástase, independente do resultado encontrado não se pode tirar qualquer conclusão a respeito do fato porque aconteceu em um animal, e poderia simplesmente ser um fato isolado.

Ao se avaliar os parâmetros hematológicos dos animais com sarcoma e dos controles observou-se que todos estão dentro do padrão de normalidade de acordo com os valores de referência adotados pelo Laboratório Clínico da FMVZ/USP para a espécie. Entretanto, notou-se redução na quantidade de hemoglobina, linfócitos, eosinófilos e elevação da contagem de plaquetas nos animais com sarcoma em relação aos do grupo controle.

A hipóxia tem sido apontada como um potente indutor da expressão do VEGF *in vitro* bem como *in vivo*. Em estudos realizados por Banai et al. (1994) e Hashimoto et al. (1994) os resultados mostraram que a hipóxia induziu a um aumento da expressão do RNA mensageiro do VEGF em cultura de células miocárdicas, sugerindo uma ligação entre hipóxia e resposta angiogênica. De maneira semelhante, Michenko et al. (1994) observaram que a hipóxia estimula a expressão de VEGF em uma linhagem de células tumorais e em cultura primária de fibroblastos *in vitro*, nos estudos *in vivo* a hipóxia e a anemia foram potentes indutores da expressão do VEGF em diversos órgãos incluindo coração, cérebro,

figado, rins e músculos. Wergin e Kaser-Hotz (2004) observaram uma correlação negativa entre o VEGF plasmático de cães com tumores e a quantidade de hemoglobina circulante. Resultados semelhantes aos de Wergin e Kaser-Hotz (2004) detectou-se neste estudo, embora o fluido investigado tenha sido o soro. Constatou-se que a medida que havia redução da quantidade de hemoglobina havia elevação da concentração do VEGF sérico sugerindo que mesmo na ausência de uma anemia a redução na quantidade de hemoglobina pode ser um estímulo para a angiogênese tumoral de cães portadores de sarcoma de tecidos moles.

Embora o VEGF seja produzido e secretado pelo estroma e células epiteliais do tumor (LEUNG et al., 1989; WARREN et al., 1996) as células do sangue circulante podem também contribuir para o nível global do VEGF do fluxo sangüíneo (SALGADO et al., 1999; VERMEULEN; SALVEN; BENOY, 1999).

Em trabalhos realizados investigando a correlação do VEGF dos fluidos circulantes com as células do sangue, George et al. (2000) observaram uma correlação do VEGF tanto do plasma como do soro com a contagem de plaquetas em pacientes com câncer de colo-retal. O mesmo foi detectado por Gunsilius et al. (2000) em pacientes com leucemia aguda, linfoma e tumores sólidos. De acordo com Maloney et al. (1998) a agregação plaquetária é o principal fator responsável pela liberação do VEGF das plaquetas.

Nos animais portadores de sarcoma de tecidos moles ao contrário dos autores acima citados, não se constatou correlação do VEGF sérico com a contagem plaquetária. Em trabalho realizado por Banks et al. (1998) foi demonstrado que os níveis de VEGF do soro aumenta com o passar do tempo antes da centrifugação, sendo o soro obtido uma hora pós-colheita aquele que apresentou altos índices de VEGF, refletindo que os altos índices de VEGF no soro são

resultantes da liberação das plaquetas durante o processo de coagulação. No nosso trabalho, o tempo de espera até a centrifugação para obtenção do soro foi cerca de 15 minutos, tempo esse abaixo do tempo limite proposto por Banks et al. (1998) para que haja interferência das plaquetas na concentração do VEGF do soro. Provavelmente por esse motivo não houve correlação do VEGF com as plaquetas nos animais com sarcoma, a despeito daquela encontrada pelos autores acima citados. Partindo desse princípio pode-se inferir que o VEGF encontrado no soro desses animais pode ter sido proveniente do estroma tumoral ou da participação de outras células do sangue circulante.

Ao investigar a participação de outras células do sangue na concentração do VEGF circulante Gaudry et al. (1997) utilizaram três agentes indutores da síntese de VEGF em neutrófilos de humanos e observaram que estas células apresentam um "pool" de VEGF intracelular, sugerindo atividade angiogênica fisiológica ou patológica. Trabalhos realizados investigando a participação de neutrófilos nos níveis de VEGF circulante de pacientes com câncer são escassos. Kusumanto et al. (2003) realizaram um estudo em treze pacientes saudáveis e quatro portadores de câncer metastático e observaram que nos pacientes saudáveis 58% do VEGF do sangue circulante reside na fração de granulócitos, já nos doentes 69%.

Os autores acima refletem a possível participação dos neutrófilos na concentração do VEGF circulante em pacientes saudáveis e com câncer respectivamente, porém não são muito conclusivos. Nos cães com sarcoma no período de pré-operatório observou-se uma correlação positiva do VEGF com a contagem de neutrófilos circulantes, não havendo correlação destes nos animais controles nem naqueles com câncer após a ressecção da formação. Este achado pode refletir a participação dos neutrófilos nos níveis circulantes de VEGF de cães

portadores de sarcoma de tecidos moles, no entanto, se faz necessária investigação mais acurada a respeito do assunto.

A medida da concentração do VEGF no sangue circulante de cães com tumores espontâneos parece estar relacionada ao tipo histológico do tumor, de modo que, tumores do tipo éupulis apresentam baixos níveis plasmáticos quando comparados a melanomas da cavidade bucal, carcinoma e osteosarcoma (.WERGIN; KASER-HOTZ, 2004). Nesta pesquisa não houve diferença na concentração do VEGF sérico em relação ao tipo histológico. Porém, houve uma tendência dos animais portadores de hemangiopericitoma apresentarem concentrações mais elevadas de VEGF sérico em relação àqueles portadores de tumor maligno da bainha neural periférica. Não se pode sugerir participação do VEGF para a angiogênese por tipo tumoral, tendo em vista que a amostra deste trabalho é pequena. Deve-se ressaltar a necessidade de novas pesquisas com um maior número de animais, a utilização de outros fluidos, para que seja melhor elucidado a participação do VEGF sérico na angiogênese de tumores de cães, bem como, a participação das células do sangue na concentração do VEGF circulante em cães portadores de tumor.

A expressão e a densidade de microvasos têm sido investigados em tumores sólidos de seres humanos (KAYA et al., 2000; PAKOS et al., 2005; MÖBIUS et al., 2007) e de cães (MILANTA et al., 2002; RESTUCCI et al., 2002) na tentativa de se estabelecer critérios para avaliar malignidade e potencial de crescimento desses tumores.

Os percentuais de expressão são variáveis nos diversos tumores do homem, como em carcinomas gástricos é de 43,4% (MAEDA et al., 1996), em colangiocarcinoma extra-hepático 47% (MÖBIUS et al., 2007), tumores prostáticos

82% (GREEN et al., 2007), 62,9% em osteossarcomas (KAYA et al., 2000), 60% em linfomas (WOLFESBERGER et al.; 2007). E 80% de expressão em carcinomas de cães (MAIOLINO; DE VICO; RESTUCCI, 2000). O percentual de expressão varia também dentro de um mesmo tipo tumoral e/ou subtipos. Os estudos realizados com sarcomas de tecidos moles de seres humanos demonstram percentuais que variam de 24,91% a 97,8% (KUHLEN et al., 2000; POTTI et al., 2004; PAKOS et al., 2005). Notou-se nesta pesquisa expressão do VEGF em 65% dos casos, percentual esse, dentro dos limites encontrados para o mesmo tipo de tumor de pacientes humanos conforme autores acima citados.

A expressão do VEGF em tumores pode ser evidenciada em áreas cancerosas e áreas não cancerosas adjacentes ao tumor. Em carcinoma de próstata de seres humanos Aslan et al. (2005) observaram positividade em áreas não cancerosas adjacentes ao foco positivo de células cancerosas e em células do estroma peri-tumoral. Neste estudo, o padrão de expressão também foi variável, esteve distribuído em 92,3% dos casos na região peri-tumoral e 46,15% na região intra-tumoral. Em 38,46% dos casos havia expressão tanto intra quanto peritumoral. A presença de células positivas ao VEGF nas regiões peri e intra-tumoral sugerem colaboração de células de diferentes locais para a angiogênese de sarcoma de tecidos moles de cães.

Alguns estudos fazem referência à contribuição das células do sangue como responsáveis pelos níveis de VEGF circulante em seres humanos saudáveis e com câncer. Dentre esses estudos foi demonstrado que as plaquetas e granulócitos, em particular os neutrófilos, formam importantes compartimentos para o VEGF circulante (MALONEY et al., 1998; KUSUMANTO et al., 2003). Em tumores da espécie canina foi observado expressão do VEGF por células endoteliais,

macrófagos e plasmócitos (MAIOLINO; DE VICO; RESTUCCI, 2000; WOLFESBERGER et al., 2007). Por outro lado, Wartiovaara et al. (1998) detectaram expressão do VEGF-C em células CD34+ do sangue de cordão umbilical, e em plaquetas e células T no sangue periférico.

Os tipos celulares responsáveis pela expressão do VEGF em sarcomas de tecidos moles de cães no presente estudo no tocante a região intra-tumoral eram células do próprio tumor, ou seja, células tumorais, já na região peri-tumoral pode-se observar a presença de células inflamatórias, sugestivas de macrófagos, e fibroblastos. Esse fato nos leva a crer que tanto células tumorais quanto outros tipos celulares são responsáveis pela produção de VEGF, contribuindo de certa forma para a vascularização desses tumores. A positividade desses tipos celulares ao VEGF e presença dessas células na região peri-tumoral e em escassos casos na pseudocápsula nos faz lançar mão de hipóteses de que estas células são residentes ou migraram para a região peri-tumoral em resposta a uma hipóxia tumoral como forma de contribuição à angiogênese desses tumores.

Em relação a expressão do VEGF por subtipos tumorais de sarcomas de tecidos moles, Potti et al. (2004) relatam uma maior expressão do VEGF pelos tumores do tipo leiomiossarcoma, carcinossarcoma e histiocitoma fibroso. No trabalho de Kuhnen et al. (2000) não houve relação entre expressão do VEGF e os subtipos histiocitoma fibroso, mixossarcoma, fibrossarcoma, hemangiopericitoma e lipossarcoma, entretanto, houve uma forte expressão imunohistoquímica do VEGF em sarcomas com aparência predominante epitelióide (sarcoma sinovial). Confrontando nossos resultados com os resultados dos autores supramencionados, observa-se também uma relação entre expressão intra-tumoral do VEGF e subtipo tumoral, ou seja, tumores do tipo hemangiopericitoma parecem expressar mais VEGF que os

tumores malignos da bainha neural periférica e outros tumores. Este achado reforça também a hipótese de que os cães com este tipo tumoral apresentam uma maior concentração sérica do VEGF, embora não tenha sido significativo.

As pesquisas realizadas em pacientes humanos com câncer têm revelado haver uma relação entre a expressão do VEGF e a contagem de microvasos (densidade de microvasos). Em carcinomas gástricos (MAEDA et al., 1996), e osteossarcomas (KAYA et al., 2000) de pacientes humanos, em seminomas (RESTUCCI et al., 2003) e tumores mamários (RESTUCCI et al., 2002) de cães a contagem de microvasos foi significativamente maior nos tumores positivos em relação aos negativos ao VEGF. O mesmo foi observado em sarcomas de tecidos moles do tronco e extremidade onde os autores relatam uma maior densidade de microvasos nos casos com forte expressão do que naqueles com fraca e ausência de expressão (PAKOS et al., 2005). Apesar dos resultados acima, Möbius et al. (2007) não notaram diferença em relação a densidade de microvasos entre os colangiocarcinomas extra-hepático com alta ou baixa expressão. Nossos resultados com sarcomas de tecidos moles de cães, a semelhança dos resultados de Möbius et al. (2007), não houve diferença na densidade de microvasos entre os tumores positivos e negativos ao VEGF, bem como, entre os subtipos tumorais. Face os resultados encontrados em relação a vascularização por subtipos pode-se inferir que os sarcomas de tecidos moles de cães apresentam potencial metastático semelhante, não ficando claro a participação do VEGF nesse processo. Será necessário futuramente realizar pesquisa envolvendo um maior número de casos para que se tenha uma resposta em relação a participação do VEGF no processo metastático de sarcoma de tecidos moles de cães.

Para avaliar a secreção do VEGF pelo tumor em sarcomas de tecidos moles de seres humanos, Kuhnen et al. (2000) mensuraram a concentração deste fator no sangue tumoral e no sangue circulante em diferentes momentos e observaram valores semelhantes. Avaliando a expressão do VEGF nos tumores desses pacientes os autores encontraram uma maior concentração do VEGF nos tumores com expressão de forte a moderada em relação a concentração dos pacientes controles. Estes resultados não são muito conclusivos tendo em vista que não houve diferença significativa. No nosso trabalho, analisou-se a correlação da concentração sérica do VEGF com a densidade de microvasos, e cotejou-se a concentração sérica do VEGF entre os espécimes tumorais positivos e negativos ao VEGF. O coeficiente de correlação para a concentração sérica de VEGF e densidade de microvasos foi 0,51, porém não significativa pelo fato de haver uma grande dispersão dos valores. Houve um comportamento semelhante também em relação a concentração sérica de VEGF entre os tumores positivos e negativos ao VEGF. Por um lado pode-se afirmar que as células tumorais não contribuem para os níveis circulantes de VEGF, mas face ao número de animais da pesquisa esses resultados são limitados e inconclusivos, necessitando de novas pesquisas para elucidar a contribuição das células tumorais nos níveis de VEGF circulante.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Cães portadores de sarcomas de tecidos moles apresentam níveis séricos do fator de crescimento do endotélio vascular semelhante a cães saudáveis (controles);
2. Os espécimes tumorais de cães portadores de sarcomas de tecidos moles expressam VEGF;
3. Os tipos tumorais de cães portadores de sarcomas de tecidos moles apresentam densidade de microvasos semelhante entre si;
4. O padrão racial não exerce influencia sobre a concentração sérica do fator de crescimento do endotélio vascular de cães portadores de sarcomas de tecidos moles;
5. A hipóxia em cães portadores de sarcomas de tecidos moles refletida pela quantidade de hemoglobina pode influenciar na concentração sérica do VEGF, porém, não nos animais saudáveis (controles);
6. Os leucócitos globais, especificamente os neutrófilos, podem contribuir para elevação da concentração sérica do VEGF nos cães portadores de sarcomas de tecidos moles e não nos controles;
7. Os linfócitos, eosinófilos, monócitos e as plaquetas não contribuem para os níveis séricos do VEGF nos cães portadores de sarcomas de tecidos moles, nem nos controles;

8. Tumores do tipo hemangiopericitoma de cães expressam mais VEGF que os demais tumores, e parecem contribuir para uma elevação da concentração sérica deste fator, embora não significativa. Nos demais tumores há um comportamento semelhante em relação a expressão e concentração sérica do VEGF;
9. Não existe relação do volume tumoral com a concentração sérica do VEGF nos cães portadores de sarcomas de tecidos moles;
10. As células tumorais de cães portadores de sarcomas de tecidos moles parecem não contribuir para o aumento da densidade de microvasos bem como para a elevação dos níveis circulantes de VEGF;
11. Os níveis séricos de VEGF nos cães portadores de sarcoma de tecidos moles não se alteram nos tempos de pré e pós-operatório.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALGIRE, G. H.; CHALKLEY, W. H. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 6, p. 73-85, 1945.
- ASCIERTO, P. A.; LEONARDI, E.; OTTAIANO, A.; NAPOLITANO, M.; SCALA, S.; CASTELLO, G. Prognostic value of serum VEGF in melanoma patients: A pilot study. **Anticancer Research**, v. 24, n.6, p. 4255-4258, 2004.
- BANAI, S.; SHWEIKI, D.; PINSON, A.; CHANDRA, M.; LAZAROVICI, G.; KESHET, E. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischemia: implications for coronary angiogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 28, n.9, p. 1176-1179, 1994.
- BANKS, R. E.; FORBES, M. A.; KINSEY, S. E.; STANLEY, A.; INGHAM, E.; WALTERS, C.; SELBY, P. J. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. **British Journal of Cancer**, v. 77, n. 6, p. 956-964, 1998.
- BEN-AV, P.; CROFFORD, L. J.; WILDER, R. L.; HLA, T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. **FEBS Letters**, v. 372, n. 1, p. 83-87, 1995.
- BORGSTROM, P.; BOURDON, M. A.; HILLAN, K. J.; SRIRAMARAO, P.; FERRARA, N. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of prostate carcinoma micro tumors in vivo. **The Prostate**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 1998.
- BROWN, L. F.; BERSE, B.; TOGNAZZI, K.; MANSEAU, E. J.; VAN DE WATER, L.; SENGER, D. R.; DVORAK, H. F.; ROSEN, S. Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. **Kidney International**, v. 42, n. 6, p. 1457-1461, 1992.
- CARMELIET, P.; COLLEN, D. Vascular development and disorders: Molecular analysis and pathogenic insights. **Kidney International**, v. 53, n. 6, p. 1519-1549, 1998.

CARMELIET, P.; FERREIRA, V.; BREIER, G.; POLLEFEY, S.; KIECHENS, L.; GUTSENSTEIN, M.; FAHRIG, M.; VANDENHOECK, A.; HARPAL, K.; EBERHARDT, G.; DECLERCQ, C.; PAWLING, J.; MOORY, L.; COLLEN, D.; RISAU, W.; NAGY, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. **Nature**, v. 380, n. 6573, p. 435-439, 1996.

CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, p. 575-583, 2001.

CHALITA, M. C. C.; MATERA, J. M.; ALVES, M. T. S.; LONGATTO FILHO, A. Tumores em pele e partes moles de cães. Estudo clínico e cito-histológico. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 5, n. 2, p.171-180, 2002.

CLAFFEY, K. P.; WILKISON, W. O.; SPIEGELMAN, B. M. Vascular endothelial growth factor: regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 23, p. 16317-16322, 1992.

CLIFFORD, C. A.; HUGHES, D.; BEAL, M. W.; MACKIN, A. J.; HENRY, C. J.; SHOFR, F. S.; SORENMO, K. U. Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 2, p. 131-135, 2001.

COLLER, B. S. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: FOZZARD, H.; HABER, E.; JENNINGS, R.; KATZ, A.; MORGAN, H. **The heart and the cardiovascular system: Scientific Foundations**. 2nd ed. New York: Raven, 1991, v. 1, p. 219-273.

DELLIAN, M.; WITWER, B. P.; SALEHI, H. A.; YUAN, F.; JAIN, R. K. Effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor and host microenvironment. **American Journal of Pathology**, v. 149, n. 1, p. 59-71, 1996.

DERNELL, W. S.; WITHROW, S. J.; KUNTZ, C. A.; POWERS, B. E. Principles of Treatment for Soft Tissue Sarcoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 59-64, 1998.

DIRIX, L. Y.; VERMEULEN, P. B.; DE WEVER, I.; VAN-OOSTERON, A. T. Soft tissue sarcoma in adults. **Current Opinion Oncology**, v. 9, n. 4, p. 348-359, 1997.

DIRIX, L. Y.; VERMEULEN, P. B.; PAWINSKY, A.; PROVE, A. ; BENOY, I.; DE-POOTER, C.; MARTIN, M.; VAN-OOSTERON, A. T. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 2., 238-243, 1997.

DUNST, J.; STADLER, P.; BECKER, A.; KUHN, T.; LAUTENSCHLAGER, C.; MOLLS, M.; HAENSGEN, G. Tumour hypoxia and systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck cancers. **Strahlenther Onkol**, v. 177, n. 9, p. 469-473, 2001.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarity between tumor stroma generation and wound healing. **New England Journal Medicine**, v, 315, n. 26, p. 1650-1658, 1986.

DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 21, p. 4368-4380, 2002.

DVORAK, H. F.; HARVEY, V. S.; ESTRELLA, P.; BROWN, L. F; MACDONAGH, J.; DVORAK, A. M. Fibrin containing gels induces angiogenesis: implications for tumor stroma generation and wound healing. **Laboratory Investigation**, v. 57, n. 6, p. 673-686, 1987.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. **Recent Program Hormony Research**, v. 55, p. 15-36, 2000.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **Journal of Molecular Medicine**, v. 77, p. 527-543, 1999.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. **Seminars in oncology**, v. 9 n. 6, p. 10-14, 2002.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. **Kidney International**, v. 56, n. 3, p. 794-814, 1999.

FERRARA, N.; CARVER MOORE, K.; CHEN, H.; DOWD, M.; LU, L.; O`SHEA, K. S.; POWELL BRAXTON, L.; HILLAN, K. J.; MOORE, M. W. Heterozygous embryonic

lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. **Nature**, v. 330, n. 6573, p. 439-442, 1996.

FERRARA, N.; CHEN, H.; DAVIS-SMYTH, T.; GERBER, H. P.; NGUYEN, T. N.; PEERS, D.; CHISHOLM, V.; HILLAN, K. J.; SCHWALL, R. H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nature Medicine**, v. 4, n. 3, p. 336-340, 1998.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N.; HOUCK, K.; JAKEMAN, L.; LEUNG, D. W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocrine Review**, v. 13, n. 1, p. 18-32, 1992.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, p. 27-31, 1995.

FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, v. 29, n. 6, p. 15-18, 2002. (Supplement, 16).

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n.1, p. 4-6, 1990

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 442-447, 1987.

FRANK, S.; HUBNER, G.; BREIER, G.; LONGAKER, M. T.; GREENHALG, D. G.; WERNER, S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 21, p. 12607-12613, 1995.

FRANSER, H. M.; LUNN, S. F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. **British Medical Bulletin**, v. 3, n. 56, p. 787-797, 2000.

GABRILOVICH, D. I.; CHEN, H. L.; GIRGIS, K. R.; CUNNINGHAM, H. T.; MENY, G. M.; NADAF, S.; KAVANAUGH, D.; CARBONE, D. P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **Nature Medicine**, v. 2, n. 11, p. 1267, 1996

GASPARINI, G.; TOI, M.; GION, M.; VERDERIO, P.; DITTADI, R.; HANATANI, M.; MATSUBARA, I.; VINANTE, O.; BONOLDI, E.; BORACCHI, P.; GATTI, C.; SUZUKI, H.; TOMINAGA, T. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 2, p. 139-147, 1997.

GAUDRY, M.; BRÉGERIE, O.; ANDRIEU, V.; BENNA, J. E.; POCIDALO, M. A.; HAKIM, J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. **Blood**, v. 90, n. 10, p. 4153-4161, 1997.

GEORGE, M. L.; ECCLES, S. A.; TUTTON, M. G.; ABULAFI, A. M.; SWIFT, R. I. Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelets count in colorectal cancer: clinical evidence of platelets scavenging? **Clinical Cancer Research**, v. 6, n.8, p. 3147-3152, 2000.

GERBER, H. P.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 22, p. 13313-13316, 1998.

GERBER, H. P.; VU, T. H.; RYAN, A. M.; KOWALSKI, J.; WERB, Z.; FERRARA, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nature Medicine**, v. 5, n. 6, p. 623-628, 1999.

GRAEVEN, U.; ANDRE, N.; ACHILLES, E.; ZORNIG, C.; SCHMIEGEL, W. Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, v. 125, n. 10, p. 577-581, 1999.

GREEN, M. M. L.; HILEY, C. T.; SHANKS, J. H.; PATH, M. R. C.; BOTTOMLEY, I. C.; HONS, B. A.; WEST, C. M. L.; COWAN, R. A.; STRATFORD, I. J. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in locally invasive prostate cancer is prognostic for radiotherapy outcome. **International Journal Radiation Oncology Biological Physic**, v. 67, n. 1, p. 84-90, 2007.

GUNSILIUS, E.; PETZER, A.; STOCKHAMMER, G.; NUSSBAUMER, W.; SCHUMACHER, P.; CLAUSEN J.; GASTL, G. Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood. **Oncology**, v. 58, n. 2, p. 169-174, 2000.

HASHIMOTO, E.; OGITA, T.; NAKAOKA, T.; MATSUOKA, R.; TAKAO, A.; KIRA, Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient

- ischemia in rat heart. **American Journal Physiology**, v. 267, n. 5 Pt 2, p. H1948-H1954, 1994.
- HAYES, A. J.; MOSTYN-JONES, A.; KOBAN, M. U.; HERN, R. A.; BURTON, P.; THOMAS, J. M. Serum vascular endothelial growth factor as a tumor marker in soft tissue sarcoma. **British Journal of Surgery**, v. 91, n. 2, p. 242-247, 2004.
- HOUCK, K. A.; FERRARA, N.; WINER, J.; CACHIANES, G.; LI, B.; LEUNG, D. W. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 12, p. 1806-1814, 1991.
- HOUCK, K. A.; LEUNG, D. W.; ROWLAND, A. M.; WINER, J.; FERRARA, N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 36, p. 26031-26037, 1992.
- ILIOPOULOS, O.; LEVY, A. P.; JIANG, C.; KAEIN JR., W. G.; GOLDBERG, M. A. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, v. 93, n. 20, p. 10595-10599, 1996.
- JAKEMAN, L. B.; WINER, J.; BENNETT, G. L.; ALTAR, C. A.; FERRARA, N. Binding sites of vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. **Journal Clinical Investigation**, v. 89, n. 1, p. 244-253, 1992.
- JIN-NO, K.; MASAHITO, T.; HYODO, I.; NISHIKAWA, Y.; HOSOKAWA, Y.; DOI, T.; ENDO, H.; YAMASHITA, T.; OKADA, Y. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. **Journal Gastroenterology**, v. 33, n. 3, p. 376-382, 1998.
- JOSEPH-SILVERSTEIN, J.; SILVERSTEIN, R. L. Cell adhesion molecules: An overview. **Cancer Investigation**, v. 16, n. 3, p. 176-182, 1998.
- KARAYIANNAKIS, A. J.; SYRIGOS, K. N.; POLYCHRONIDIS A.; ZBAR, A.; KOURAKLIS, G.; SEMINOPOULOS, C.; KARATZAS, G. Circulating VEGF levels in the sera of gastric cancer patients. **Annals of Surgery**, v. 236, n. 1, p. 37-42, 2002.
- KAYA, M.; WADA, T.; AKATSUKA, T.; KAWAGUCHI, S.; NAGOYA, S.; SHINDOH, M.; HIGASHIMO, F.; MEZAWA, F.; OKADA, F.; ISHII, S. Vascular endothelial growth

factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. **Nature**, v. 6, n. 2, p. 572-577, 2000.

KEYT, B. A.; BERLEAU, L. T.; NGUYEN, H. V.; CHEN, H.; HEINSOHN, H.; VANDLE, R. FERRARA, N. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factors is critical for its mitogenic potency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 13, p. 7788-7795, 1996.

KIM, K. H.; WINER, J.; ARMANINI, M.; GILLETT, N.; PHILLIPS, H. S.; FERRARA, N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. **Nature**, v. 362, p. 841-844, 1993.

KRAFT, A.; WEINDEL, K.; OCHS, A.; MARTH, C.; ZMIJA, J.; SCHUMACHER, P.; UNGER, C.; MARMÉ, D.; GASTL, G. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. **Cancer**, v. 85, n. 1, p. 178-187, 1999.

KUHNEN, C.; LEHNHARDT, M.; TOLNAY, E.; MUEHLBERGER, T.; VOGT, P. M.; MULLER, K. M. Pattern of expression and secretion of vascular endothelial growth factor in malignant soft-tissue tumor. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, v. 126, n.4, p. 219-225, 2000.

KUMAR, H.; HEER, K.; LEE, P. R. W.; DUTHIE, G. S.; MACDONALD, A. W.; GREENMAN, J.; KERIN, M. J.; MONSON, J. R. T. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 4, n. 5, p. 1279-1285, 1998.

KUSUMANTO, Y. H.; DAM, W. A.; HOSPER, G. A. P.; MEIJER, C.; MULDER, N. H. Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. **Angiogenesis**, v. 6, n. 4, p. 283-287, 2003.

LANTZSCH, T.; HEFLER, L. Vascular endothelial growth factor in breast cancer. In: HARMEY, J. H. **VEGF and cancer**. 1 st ed. Georgetown: Landes Bioscience, 2004, p. 40-47.

LEUNG, D. W.; CACHIANES, G.; KUANG, W. J.; GOEDDEL, D. V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306-1309, 1989.

LI, L.; WANG, L.; ZHANG, W.; TANG, B.; ZHANG, J.; SONG, H.; YAO, D.; TANG, Y.; CHEN, X.; YANG, Z.; WANG, G.; LI, X.; ZHAO, J.; DING, H.; REED, E.; LI, Q. Q. Correlation of serum VEGF levels with clinical stage, therapy efficacy, tumor metastasis and patient survival in ovarian cancer. **Anticancer Research**, v. 24, p. 1973-1980, 2004.

LINDER, C.; LINDER, S.; MUNCK-WIKLAND, E.; STRANDER, H. Independent expression of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in patients with carcinoma and sarcoma. **Anticancer Research**, v. 18, n. 3B p. 2063-2068, 1998.

LIOTA, L.; KLEINERMAN, J.; SAIDEL G. Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastasis following tumor implantation. **Cancer Research**, v. 34, n. 5, p. 977-1004, 1974.

MACEWEN, E. G.; POWERS, B. E.; MACY, D.; WITHROW, S. J. Soft tissue sarcomas. In: WITHROW, S. J.; MacEVEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. p. 283-304.

MAEDA, K.; CHUNG, Y. S.; OGAWA, Y.; TAKATSUKA, S.; KANG, S. M.; OGAWA, M.; SAWADA, T.; SOWA, M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. **Cancer**, v. 77, n. 5, p. 858-863, 1996.

MAIOLINO, P.; DE VICO, G.; RESTUCCI, B. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell tumors and in squamous cell carcinoma of canine skin. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, n. 2-3, p. 141-145, 2000.

MALONEY, J. P.; SILLIMAN, C. C.; AMBRUSO, D. R.; WANG, J. TUDER, R. M.; VOELKEL, N. F. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. **American Journal of Physiology**, v. 275, n. 3 pt 2, p. H1054-H1061, 1998.

MARTIN, S. G.; ORRIDGE, C.; MUKHERJEE, A.; MORGAN, D. A. L. Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome after primary radiotherapy for head and neck squamous cell cancer. **Clinical Oncology**, v. 19, n. 1, p. 71-76, 2007.

MEYER, M.; CLAUSS, M.; LEPPLE-WIENHUES, A. A novel vascular endothelial growth factor encoded by virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinase. **The EMBO Journal**, v.18, n. 2, p. 363-374, 1999.

- MIAO, H. Q.; KLAGSBRUN, M. Neutropilin is mediator of angiogenesis. **Cancer Metastasis Review**, v. 19, n. 1/2, p. 29-37, 2000.
- MIAO, H. Q.; LEE, P.; LIN, H.; SOKER, S.; KLAGSBRUM, M. Neutropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. **FASEB Journal**, v. 14, n. 15, p. 2532-2539, 2000.
- MICHENKO, A.; BAUER, T.; SALCEDA, S.; CARO, J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. **Laboratory Investigation**, v. 71, n. 3, p. 374-379, 1994.
- MILANTA, F.; LAZZERI, G.; VANNOZZI, I.; VIACAVA, P.; POLI, A. Correlation of vascular endothelial growth factor expression to overall survival in feline invasive mammary carcinomas. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 690-696, 2002.
- MITSUHASHI, A.; SUZUKA, K.; YAMAZAWA, K.; MATSUI, H.; SEKI, K.; SEKIYA, S. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. **Cancer**, v. 103, n. 4, p. 724-730, 2005.
- MÖBIUS, C.; DEMUTH, C.; AIGNER, T.; WIEDMANN, M.; WITTEKIND, C.; MÖSSNER, J.; HAUSS, J.; WITZIGMANN, H. Evaluation of VEGF A expression and microvascular density as prognostic factors in extrahepatic cholangiocarcinoma. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 33, n. 8, p. 1025-1029, 2007.
- MONACCI, W.; MERRILL, M.; OLDFIELD, E. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. 995-1002, 1993.
- NEITZEL, L. T.; NEITZEL, C. D.; MAGEE, K. L.; MALAFA, M. P. Angiogenesis corellates with metatatastis in melanoma. **Annal Surgical Oncology**, v. 6, n. 1, p. 70-74, 1999.
- OLOFSSON, B.; PAJUSOLA, K.; KAIPAINEN, A.; VONEULER, G.; JOUKOV, V.; SAKSELA, O.; ORPANA, A.; PETTERSON, R.; ALITALO, K.; ERIKSSON, U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cell. **Proceedings of National Academy Science of United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2576-2581, 1996.
- OSELLA-ABATE, S.; QUAGLINO, P.; SAVOIA, P.; LEPORATI, C.; COMESSATTI, A.; BERNENGO, M. G. VEGF-165 serum levels and tyrosinase expression in

melanoma patients: correlation with the clinical course. **Melanoma Research**, v. 12, n. 4, p. 325-334, 2002.

OWEN, L. TNM classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, 1980. p. 46-47.

PAJUSOLA, K.; APRELIKOVA, O.; KORHONEN, J.; KAIPAINEN, A.; PERTOVAARA, L.; ALITALO, R.; ALITALLO, K. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. **Clinical Cancer Research**, v. 52, n. 20, p. 5738-5743, 1992.

PARK, J. E.; CHEN, H.; WINER, J.; HOUCK, K. A.; FERRARA, N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to flk-1/KDR. **Journal Biological Chemistry**, v. 296, n. 41, p. 25646-25654, 1994.

PARK, J. E.; KELLER, G-A.; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, n. 12, p. 1317-1326, 1993.

PAKOS, E. E.; GOUSSIA, A. C.; TSEKERIS, P. G.; PAPACHISTOU, D. J.; STEFANO, D.; AGNANTIS, N. J. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR/Flk-1, in soft tissue sarcomas. **Anticancer Research**, v. 25, p. 3591-3596, 2005.

PENDL, J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. **Anatomy Histology Embryology**, n. 29, p. 257-266, 2000.

PEKALA, P.; MARLOW, M.; HEUVELMAN, D.; CONNOLLY, D. Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor- α , but not by insulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 30, p. 18051-18054, 1990.

PEPPER, M. S.; FERRARA, N.; ORCI, L.; MONTESANO, R. Vascular endothelial growth factor induces plasminogen activators and plasminogen activators inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 181, n. 2, p. 902-906, 1991.

PEPPER, M. S.; MONTESANO, R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. **Cell Differentiation Development**, v. 32, n. 3, p. 319-331, 1990.

- PLOUET, J.; SCHILLING, J.; GOSPODAROWICZ, D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. **The EMBO Journal**, v. 8, n. 12, p. 3801-3806, 1989.
- POTTI, A.; GANTI, A. K.; TENDULKAR, K.; SHOLES, K. CHITAJALLU, S.; KOCH, M.; KARGAS, S. Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression in soft tissue sarcomas and the role of overexpression in leiomyosarcoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 130, n. 1, p. 52-56, 2004.
- RAK, J.; MITSUHASHI, Y.; BAYKO, L.; FILMUS, J.; SHIRASAWA, S.; SASAZUKI, T.; KERBEL, R. S. Mutant *ras* oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. **Cancer Research**, v. 55, n. 20, p. 4575-4580, 1995.
- RESTUCCI, B.; MAIOLINO, P.; PACIELLO, O.; MARTANO, M.; DE VICO, G.; PAPPARELLA, S. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, n. 4, p. 252-259, 2003.
- RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 4, p. 488-493, 2002.
- RICHARD, D. E.; BERRA, E.; POUYSSEGUR, J. Angiogenesis: how a tumour adapts to hypoxia. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 266, n. 3, p. 718-722, 1999.
- ROBERTS, W. G.; PALADE, G. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. **Journal Cell Science**, v. 108, n. pt 6, p. 2369-2379, 1995.
- SALGADO, R.; BENOY, I.; BOGERS, J.; WEYTJENS, R.; VERMEULEN, P.; DIRIX, L.; MARCK, E. V. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): A morphological and functional study. **Angiogenesis**, v. 4, n. 1, p. 37-43, 2001.
- SALGADO, R.; VERMEULEN, P. B.; BENOY, I.; WEYTJENS, R.; HUGET, P.; VAN-MARCK, E.; DIRIX, L. Y. Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but no with bFGF serum levels of advanced cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 5/6, p. 892-897, 1999.

- SALVEN, P.; MAENPAA, H.; ORPANA, A.; ALITALO, K.; JOENSUU, H. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 3, n. 5, p. 647-651, 1997.
- SALVEN, P.; RUOTSALAINEN, T.; MATTSON, K.; JOENSUU, H. High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, v. 79, n. 2, p. 144-146, 1998.
- SCHEIDEGGER, P.; WEIGLHOFER, W.; SUAREZ, S.; KASER-HOTZ, B.; STEINER, R.; BALLMER-HOFER, K.; JAUSSE, R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. **Biological Chemistry**, v. 380, n. 12, p. 1449-1454, 1999.
- SEETHARAM, L.; GOTOH, N.; MARU, Y.; NEUFELD, G.; YAMAGUCHI, S.; SHIBUYA, M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. **Oncogene**, v. 10, n. 1, p. 135-147, 1995.
- SOH, E. Y.; SOBHI, S. A.; WONG, M. G.; MENG, Y. G.; SIPERSTEIN, A. E. CLARK, O. H.; DUH, Q. Y. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. **Surgery**, v. 120, n. 6, p. 944-947, 1996.
- SOKER, S.; TAKASHIMA, S.; MIAO, H. Q.; NEUFELD, G.; KLAGSBRUN, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 735-745, 1998.
- SZENTIMEREY, D. Principles of reconstructive surgery for the tumor patient. **Clinical Techniques in small animal practice**, v. 13, n. 1, p. 70-76, 1998.
- TAKANAMI, I.; TANAKA, F.; HASHIZUME, T.; KODAIRA, S. Vascular endothelial growth factor and its receptor correlate with angiogenesis and survival in pulmonary adenocarcinoma. **Anticancer Research**, v. 17, n. 4A, p. 2811-2814, 1997.
- TERMAN, B. I.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M. E.; DIMITROV, D.; ARMELLINO, D. C.; GOSPODAROWICZ, D.; BOHLEN, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 187, n. 3, p. 1579-1586, 1992.

- TISHER, E.; MITCHELL, R.; HARTMANN, T.; SILVA, M.; GOSPODAROWICZ, D.; FIDDES, J.; ABRAHAM, J. The human gene for vascular endothelial growth factor. **Journal Biological Chemistry**, v. 266, p. 11947-11954, 1991.
- TOU, M.; MATSUMOTO, T.; BANDO, H. Vascular endothelial growth factor: Its prognostic, predictive, and therapeutic implications. **Lancet Oncology**, v. 2, p. 667-673, 2001.
- TROY, G. C.; HUCKLE, W. R.; ROSSMEISL, J. H.; PANCIERA, D.; LANZ, O.; ROBERTSON, J. L.; WARD, D. L. Endostatin and vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs, dogs with selected neoplasia, and dogs with nonneoplastic diseases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 1, p. 144-150, 2006.
- VASCONCELOS, C. H. C. **Avaliação clínica de retalhos cutâneos fixados com sutura convencional ou sutura mais adesivo de cianocrilato na cirurgia reconstrutora em cães**. 2002. 118 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.
- VERHEUL, H. M.; HOEKMAN, K.; LUPU, F.; BROXTERMAN, H. J.; VAN DER VALK, P.; KAKKAR, A. K.; PINEDO, H. M. Platelet and coagulation activation with vascular endothelial growth factor generation in soft tissue sarcomas. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 166-171, 2000.
- VERMEULEN, P. B.; SALVEN, P.; BENOY, I. Blood platelets and serum VEGF in cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 79, n. 2, p. 370-373, 1999.
- VICENTI, V.; CASSANO, C.; ROCCHI, M.; PERSICO, G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. **Circulation**, v. 93, n. 8, p. 1493-1495, 1996.
- VRIES, C.; ESCOBEDO, J. A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v. 225, n. 5047, p. 989-991, 1992.
- WALTENBERGER, J.; CLAEISSON-WELSH, L.; SIEGBAHN, A.; SHIBUYA, M.; HELDIN, C. H. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 43, p. 26988-26995, 1994.

WARREN, R. S.; YUAN, H.; MATLI, M. R.; FERRARA, N.; DONNER, D. B. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29483-28488, 1996.

WARTIOVAARA, U.; SALVEN, P.; MIKKOLA, H.; LASSILA, R.; KAUKONEN, J.; JOUKOV, V.; ORPANA, A.; RISTMAKI, A.; HEIKINHEIMO, M.; JOENSUU, H.; ALITALO, K.; PALOTIE, A. Peripheral blood platelet express VEGF-C and VEGF which are released during platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 80, n. 1, p. 171-175, 1998.

WERGIN, M. C.; BALLMER-HOFER, K.; ROOS, M.; ACHERMANN, R. E.; INTEEWORN, N.; AKENS, M. K.; BLATTMANN, H.; KASER-HOTZ, B. Preliminary study of plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) during low and high-dose radiation therapy of dogs with spontaneously tumors. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 45, n. 3, p. 247-254, 2003.

WERGIN, M. C.; KASER-HOTZ, B. Plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) measured in seventy dogs with spontaneously occurring tumours. **In Vivo**, v. 18, n. 1, p. 15-20, 2004.

WOLFESBERGER, B.; GUIJA DE ARESPOCHAGA, A.; WILLMANN, M.; GERNER, W.; MILLER, I.; SCHWENDENWEIN, I.; KLEITER, M.; EGERBACHER, M.; THALHAMMER, J. G.; MUELLAUER, L.; SKALICK, M.; WALTER, I. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 1, p. 30-40, 2007.

YAMAMOTO, Y.; TOI, M.; KONDO, S.; MATSUMOTO, T.; SUZUKI, H.; KITAMURA, M.; TSURUTA, K.; TANIGUCHI, T.; OKAMOTO, A.; MORI, T.; YOSHIDA, M.; IKEDA, T.; TOMINAGA, T. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 2, p. 821-826, 1996.

YOON, S.S.; SEGAL, N. H.; OLSHEN, A. B.; BRENNAN, M. F.; SINGER, S. Circulating angiogenic factor levels correlate with extent of disease and risk of recurrence in patients with soft tissue sarcoma. **Annals of Oncology**, v. 15, p. 1261-1266, 1996.)

YUDOH, K.; KANAMORI, M.; OHMORI, K.; YOSUDA, T.; AOKI, M.; KIMURA, T. Concentration of vascular endothelial growth factor in the tumour tissue as a prognostic factor of soft tissue sarcomas. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 1610-1615, 1996.

APÊNDICES

APÊNDICE A

ANIMAL	ESPÉCIE	SEXO	RAÇA	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO
1.	CANINA	FÊMEA	AKITA	Osteosarcoma Extra-esquelético
2.	CANINA	MACHO	POODLE	Epitelioma Sebáceo
3.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Adenoma sebáceo
4.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Adenoma Ceruminoso
5.	CANINA	MACHO	WEIMARANER	Cisto folicular
6.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Cisto Apócrino
7.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
8.	CANINA	MACHO	GOLDEN RETRIEVER	Cisto Folicular
9.	CANINA	MACHO	AFGHAN HOUND	Hemangioma Cavernoso
10.	CANINA	FÊMEA	POODLE	Hemagiopericitoma
11.	CANINA	FÊMEA	BOXER	Mastocitoma Grau I
12.	CANINA	FÊMEA	FILA BRASILEIRO	Mastocitoma Grau II
13.	FELINA	FÊMEA	SIAMÊS	Fibrosarcoma
14.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
15.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
16.	CANINA	MACHO	DOBERMANN	Fibropapiloma
17.	CANINA	MACHO	BOXER	Tricoepitelioma
18.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Tricocoblastoma
19.	CANINA	MACHO	PASTOR ALEMÃO	Melanoma
20.	CANINA	MACHO	HUSKY SIBERIANO	Epitelioma Sebáceo
21.	CANINA	MACHO	SCHNAUZER	Lipoma
22.	CANINA	FÊMEA	POODLE	Hiperplasia Nodular Sebácea
23.	CANINA	MACHO	POODLE	Cisto Folicular
24.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Cisto Folicular
25.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Fibrosarcoma
26.	CANINA	FÊMEA	DOBERMAN	Melanoma
27.	CANINA	MACHO	POODLE	Tricoblastoma
28.	CANINA	FÊMEA	ROTWEILER	Nevu Colagenico
29.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma Apócrino

30.	CANINA	MACHO	POODLE	Tricoblastoma
31.	CANINA	MACHO	FILA BRASILEIRO	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
32.	CANINA	FÊMEA	POODLE	Carcinoma Simples
33.	CANINA	MACHO	PASTOR ALEMÃO	Hemangioma
34.	CANINA	FÊMEA	BOXER	Mastocitoma Grau II
35.	CANINA	MACHO	POODLE	Mastocitoma Grau II
36.	CANINA	FÊMEA	PASTOR ALEMÃO	Hemangioma Cavernoso
37.	CANINA	FÊMEA	LABRADOR	Lipoma
38.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
39.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
40.	CANINA	MACHO	PASTOR ALEMÃO	Hemangioma Cavernoso
41.	CANINA	MACHO	LABRADOR RETRIEVER	Mastocitoma Grau I
42.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
43.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Fibrosarcoma
44.	CANINA	MACHO	POODLE	Hemangiopericitoma
45.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Mastocitoma Grau II
46.	CANINA	MACHO	DOG ALEMÃO	Hemangiosarcoma
47.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
48.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma Células Escamosas
49.	CANINA	FÊMEA	DACHSHUND	Mastocitoma Grau II
50.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Leiomiomasarcoma
51.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Mastocitoma Grau I
52.	CANINA	MACHO	BOXER	Mastocitoma Grau I
53.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Melanocitoma
54.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Mastocitoma Grau II
55.	CANINA	MACHO	BOXER	Dermatite Hiperplásica Crônica
56.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas Acanolítico
57.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Hemangiopericitoma
58.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Lipoma
59.	CANINA	MACHO	DOGUE ALEMÃO	Tecido Granulação
60.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma Glândula Hepatóide
61.	CANINA	FÊMEA	PINSCHER	Mastocitoma Grau I
62.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
63.	CANINA	MACHO	PASTOR ALEMÃO	Piogranuloma Estéril

64.	CANINA	MACHO	BORDER COLLIE	Liposarcoma
65.	CANINA	MACHO	SETTER IRLANDES	Lipoma
66.	CANINA	MACHO	COCKER SPANIEL	Carcinoma Células basais
67.	CANINA	FÊMEA	POODLE	Tumor Benigno da Bainha Neural Periférica
68.	CANINA	MACHO	LABRADOR RETRIEVER	Lipoma
69.	CANINA	MACHO	POODLE	Adenoma Hepatóide
70.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma Sebáceo
71.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
72.	CANINA	FÊMEA	LABRADOR	Mastocitoma Grau II
73.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma Sebáceo
74.	CANINA	MACHO	ROTTWEILER	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
75.	CANINA	FÊMEA	POODLE	Hemangiosarcoma
76.	CANINA	FÊMEA	DOBERMAN	Mastocitoma Grau II
77.	CANINA	MACHO	LHASA APSO	Adenoma de Tireóide
78.	CANINA	MACHO	DOBERMAN	Carcinoma de Células Escamosas
79.	CANINA	MACHO	POODLE	Epitelioma Sebáceo
80.	CANINA	FÊMEAC	SEM RAÇA DEFINIDA	Tricolenoma
81.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Tumor de Células Gigantes do Osso
82.	CANINA	MACHO	BOXER	Mastocitoma Grau I
83.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Mastocitoma Grau II
84.	CANINA	FÊMEAC	FOX PAULISTINHA	Mastocitoma Grau II
85.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Lipoma
86.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Fibrosarcoma
87.	CANINA	FÊMEA	POODLE	Mixosarcoma
88.	CANINA	MACHO	POODLE	Carcinoma de Células Escamosas
89.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
90.	CANINA	MACHO	COKCER SPANIEL	Carcinoma de Células Basais
91.	CANINA	MACHO	BOXER	Adenoma de Tireóide
92.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
93.	CANINA	MACHO	DOBERMAN	Dermatite Hiperplásica Crônica
94.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Lipoma
95.	CANINA	MACHO	FOX TERRIER	Carcinoma de Células Basais
96.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
97.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas

98.	CANINA	FÊMEA	LHASA APSO	Lipoma
99.	CANINA	MACHO	BOXER	Mastocitoma Grau I
100.	FELINA	FÊMEA	PERSA	Carcinoma de Células Escamosas
101.	CANINA	FÊMEA	LABRADOR RETRIEVER	Mastocitoma Grau II
102.	CANINA	MACHO	POODLE	Carcinoma de Células Escamosas
103.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Hemangiosarcoma
104.	CANINA	MACHO	PASTOR ALEMÃO	Mixosarcoma
105.	CANINA	MACHO	CHOW CHOW	Cisto Folicular Infundibular
106.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
107.	CANINA	MACHO	BORDER COLLIE	Calcinose Cutânea
108.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas Acantolítico
109.	CANINA	FÊMEA	BOXER	Mastocitoma Grau II
110.	CANINA	MACHO	PIT BULL	Paniculite Traumática
111.	CANINA	MACHO	POODLE	Epitelioma Sebáceo
112.	CANINA	FÊMEA	AMERICAN STAFORDSHIRE TERRIER	Mastocitoma Grau I
113.	CANINA	MACHO	LABRADOR RETRIEVER	Furunculose
114.	CANINA	FÊMEA	DACHSHUND	Adenoma Basaloide Apócrino
115.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
116.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Liposarcoma
117.	CANINA	MACHO	POODLE	Tricoblastoma
118.	CANINA	FÊMEA	BOXER	Mastocitoma Grau I
119.	CANINA	MACHO	BOXER	Hemagniopericitoma
120.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
121.	CANINA	MACHO	YORKSHIRE	Cisto Apócrino
122.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Hemagniopericitoma
123.	CANINA	FÊMEA	SAO BERNARDO	Epitelioma Sebáceo
124.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Cisto Folicular Infundibular
125.	CANINA	MACHO	COCKER SPANIEL	Tricoblastoma
126.	CANINA	MACHO	BASSET HOUND	Cisto Folicular Infundibular
127.	CANINA	MACHO	POODLE	Mastocitoma Grau II
128.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Hemagniopericitoma
129.	CANINA	FÊMEA	LABRADOR RETRIEVER	Cistoadenoma Apócrino
130.	CANINA	FÊMEA	PASTOR ALEMÃO	Carcinoma de Células Basais
131.	CANINA	MACHO	PINSCHER	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica

132.	CANINA	MACHO	LABRADOR RETRIEVER	Mastocitoma Grau II
133.	CANINA	FÊMEA	BOXER	Mastocitoma Grau II
134.	CANINA	MACHO	BOXER	Mastocitoma Grau III
135.	CANINA	FÊMEA	POODLE	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
136.	CANINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Lipoma
137.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Processo Inflamatório Granulomatoso
138.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
139.	CANINA	FÊMEA	BOXER	Mastocitoma Grau I
140.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
141.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Fibrosarcoma
142.	CANINA	MACHO	BEAGLE	Cisto Folicular Infundibular
143.	CANINA	MACHO	SCNHAUZER	Lipoma
144.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
145.	CANINA	MACHO	COLLIE	Fibrose Cicatricial
146.	CANINA	FÊMEA	PINSCHER	Melanoma Amelânico
147.	FELINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
148.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
149.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
150.	CANINA	MACHO	DALMATA	Fibrose Nodular
151.	CANINA	MACHO	POODLE	Hemangioma
152.	FELINA	MACHO	ANGORA	Carcinoma de Células Escamosas
153.	CANINA	MACHO	WEIMARANER	Tendinose
154.	CANINA	MACHOC	BOXER	Cisto Folicular Infundibular
155.	FELINA	FÊMEA	SEM RAÇA DEFINIDA	Carcinoma de Células Escamosas
156.	CANINA	MACHO	LABRADOR	Fibromatose
157.	CANINA	FEMEA	DOG ALEMÃO	Hemangiosarcoma
158.	CANINA	MACHO	ROTTWEILER	Hemangiosarcoma
159.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica
160.	CANINA	MACHO	SEM RAÇA DEFINIDA	Tumor Maligno da Bainha Neural Periférica

Quadro 1- Dados relativos aos animais portadores de tumores de pele e/ou partes moles operados no período de outubro de 2004 a janeiro de 2007, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP - São Paulo - 2007

APÊNDICE B

Tabela 1 – Dados epidemiológicos dos animais portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007.

ANIMAL Nº.	SEXO	IDADE (meses)	RAÇA	VOLUME TUMORAL (cm ³)	LOCAL	DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO
1	Macho	122	SRD	18,692	Face palmar de metacarpos direitos	TMBNP
2	Fêmea castrada	117	Poodle	329,481	Região sacral esquerda	Hemangiopericitoma
3	Macho	179	Poodle	1281,732	Região torácica ventral	Hemangiopericitoma
4	Fêmea castrada	146	Akita			Osteosarcoma extra-esquelético
5	Fêmea castrada	109	SRD	72,904	Face lateral de úmero esquerdo	TMBNP
6	Macho	121	Fila Brasileiro	7,854	Face cranial de rádio direito	TMBNP
7	Macho	119	Rottweiler	7,068	Face lateral de fêmur direito	TMBNP
8	Macho	119	Rottweiler	857,630	Face lateral de tibia esquerda	TMBNP
9	Macho	90	Dog Alemão	51,050	Prepúcio	Hemangiosarcoma
10	Fêmea castrada	132	Poodle	11,781	Face lateral de úmero esquerdo	TMBNP
11	Macho	181	Border Collie	25,132	Região torácica lateral direita	Liposarcoma
12	Macho castrado	121	Pastor Alemão	52,358	Face lateral de tibia esquerda	Mixosarcoma
13	Fêmea castrada	152	Poodle	5,278	Face plantar de metatarsos direitos	Hemangiosarcoma
14	Macho	158	SRD	535,626	Face lateral de fêmur esquerdo	Hemangiopericitoma
15	Macho	136	SRD	456,765	Face cranial de rádio esquerdo	Fibrosarcoma
16	Fêmea castrada	85	SRD	3,927	Face medial de rádio direito	TMBNP
17	Macho	132	SRD	39,560	Face caudal de ulna direita	Hemangiopericitoma
18	Macho	177	Boxer	345,565	Face lateral de fêmur direito	Hemangiopericitoma
19	Macho	145	SRD	127,231	Região torácica lateral direita	Hemangiopericitoma
20	Macho	170	Pinscher	45,814	Face lateral de úmero esquerdo	TMBNP
21	Macho	99	SRD	612,593	Região pré-escapular direita	Liposarcoma
22	Macho	147	SRD	685,371	Região cranial de esterno	TMBNP
23	Fêmea castrada	64	Dog Alemão	265,401	Face medial de tibia esquerda	Hemangiossarcoma
24	Macho	130	SRD	282,735	Face lateral de fêmur direito	TMBNP
25	Macho	80	Rottweiler	157,075	Face caudal de fêmur esquerdo	Hemangiossarcoma
	Macho	134	SRD	31,415	Face cranial de rádio direito	TMBNP
MÉDIA		129,84		252,402		
DESVIO		31,163		326,73		

Tabela 2 – Valores do VEGF sérico dos animais do grupo controle e dos animais portadores de sarcoma nos tempos de pré-operatório, 2 semanas e 3 meses de pós-operatório, da expressão do VEGF e da densidade de microvasos dos animais portadores de sarcoma, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007.

ANIMAIS Nº.	VALORES DO VEGF			EXPRESSÃO DO VEGF	DENSIDADE DE MICROVASOS	
	CONTROLES	PORTADORES DE SARCOMAS				
		PRÉ-OPERATÓRIO	2 SEMANAS			3 MESES
1	4,182	2,25	0	4,125	negativo	108
2	7,364	0	0	-	positivo	52
3	10,091	55,22	50,375	0,89	negativo	104
4	4,182	0	0	-	negativo	116
5	9,182	-	7,44	4,11	positivo	259
6	1,909	7	3,25	9,22	positivo	143
7	21,455	0	5,22	0	positivo	187
8	16,455	10,75	19,125	0,22	positivo	40
9	9,636	1,33	0	6,89	positivo	145
10	0,091	5,78	69,125	-	-	-
11	23,727	23,25	7,44	3,67	positivo	160
12	21	7,44	0	1,33	positivo	63
13	22,818	5	0	30,55	negativo	57
14	31,909	29,11	9,67	66,39	-	-
15	22,818	2,44	0	4,22	negativo	144
16	6,455	13,67	7	-	positivo	216
17	3,22	0	1,44	13,11	positivo	99
18	34,33	24,78	38,11	-	positivo	225
19	16,00	9,78	-	-	negativo	85
20	0,00	43,67	1,44	25,33	negativo	195
21	22,67	12	32	-	-	-
22	3,78	5,91	0,00	0,00	-	-
23	4,89	31,556	0,00	0,00	positivo	162
24	35,44	11,556	0,00	-	-	-
25	12,11	17,111	13,22	0,00	positivo	137
26	10,44	-	-	-	-	-
27	2,67	-	-	-	-	-
28	0,00	-	-	-	-	-
29	22,11	-	-	-	-	-
30	18,78	-	-	-	-	-
MÉDIA + SD	13,324 + 10,570	13,283 + 14,581	11,036 + 18,303	10,785 + 17,368	-	134,85 + 61,12

Tabela 3 – Parâmetros hematológicos dos animais com sarcoma no pré-operatório e dos animais controle, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007) - São Paulo - 2007.

ANIMAIS Nº.	HEMOGLOBINA		LEUCÓCITOS		NEUTRÓFILOS		LINFÓCITOS		PLAQUETAS		EOSINÓFILOS		MONÓCITOS	
	Sarcoma	Controle	Sarcoma	Controle	Sarcoma	Controle	Sarcoma	Controle	Sarcoma	Controle	Sarcoma	Controle	Sarcoma	Controle
1.	15,7	16,9	8.100	9.500	4.779	6.935	2.106	1.140	389.000	285.000	972	855	243	570
2.	16,3	13,3	8.900	9.900	6.492	4.851	1.424	3.960	292.000	232.000	89	792	445	297
3.	10,6	16,2	23.100	7.300	18.249	3.796	1.386	2.482	334.000	262.000	231	511	3.234	511
4.	13,0	16,9	9.400	14.800	6.956	8.584	1.788	5.032	230.000	255.000	282	296	376	888
5.	12,8	18,7	9.000	8.800	5.400	6.248	2.250	1.584	488.000	235.000	900	440	360	528
6.	15,7	19,6	6.900	6.600	4.623	3.828	1.104	1.980	302.000	256.000	552	264	621	528
7.	16,7	16,1	12.800	8.400	8.576	5.712	2.944	1.512	583.000	254.000	640	840	640	336
8.	15,1	11,2	9.800	3.600	7.252	2.376	1.274	900	309.000	305.000	980	180	294	144
9.	17,0	16,8	7.700	7.700	5.929	5.775	847	1.078	318.000	217.000	462	539	462	308
10.	13,8	17,5	12.800	9.500	9.728	7.790	2.048	1.045	156.000	246.000	640	95	384	570
11.	12,6	17,4	9.800	13.000	6.958	8.060	98	2.340	372.000	252.000	1.568	2.080	1.078	520
12.	15,2	17,4	15.300	14.000	11.016	8.400	3.213	3.220	409.000	172.000	459	1.680	612	560
13.	14,6	19,5	8.900	9.500	6.586	5.700	1.335	2.850	282.000	156.000	534	665	445	285
14.	6,9	17,7	7.100	6.100	5.893	3.477	284	1.830	782.000	275.000	0	671	923	122
15.	14,2	15,6	5.200	10.900	3.328	7.630	1.612	1.635	209.000	218.000	104	872	156	654
16.	15,5	15,6	10.400	14.400	7.696	10.080	1.352	1.728	-	467.000	416	2.160	936	432
17.	14,3	16,3	10.400	8.700	4.160	6.264	5.408	1.044	303.000	174.000	104	1.044	728	348
18.	15,3	14,6	16.600	24.200	13.280	18.150	1.992	726	386.000	204.000	332	4.352	996	968
19.	18,7	17,5	5.400	10.800	4.104	8.424	1.080	1.836	554.000	220.000	108	216	108	324
20.	13,8	-	12.100	-	8.470	-	1.694	-	325.000	-	726	-	1.210	-
21.	13,1	17,8	12.100	12.200	8.228	8.174	1.331	1.952	501.000	144.000	1.089	1.830	1.452	244
22.	17,5	16,6	8.100	11.200	6.075	8.736	891	2.016	294.000	200.000	891	336	243	112
23.	15,7	17,5	11.200	16.300	8.848	10.921	1.904	3.260	276.000	183.000	336	1.630	112	326
24.	14,0	11,1	15.000	12.800	11.700	8.576	450	2.560	323.000	225.000	1.050	896	1.800	768
25.	18,1	17,0	7.200	10.600	4.896	6.996	1.512	2.438	399.000	209.000	288	106	504	954
26.		11,1		10.800		4.752		4.536		259.000		432		1.080
27.		11,9		10.400		6.552		2.912		283.000		728		208
28.		11,8		8.600		5.332		1.634		260.000		946		602
29.		16,6		14.600		8.030		3.504		239.000		2.044		730
30.		11,1		8.500		5.015		2.210		221.000		595		680
MÉDIA	14,65	15,76	10.532	10.817	7.569	7.074	1.653	2.239	367.333	238.206	550,12	968,79	734,48	503,34
DESVIO	2,46	2,61	3.947	3.864	3322	2.941	1.067	1.067	135.725	58.952	392,84	894,62	673,97	262,52

ANEXO

ANEXO 1 - Termo de ciência e autorização com livre consentimento do proprietário, autorizando por escrito a participação do animal no estudo, Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do HOVET - FMVZ/USP (outubro de 2004 a agosto de 2007). São Paulo, 2007.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
HOSPITAL VETERINÁRIO**

TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO

Eu, _____ proprietário do animal da espécie _____, raça _____ sexo: _____, nascimento _____, registrado no Hospital Veterinário da FMVZ sob n.º _____, **ESTOU CIENTE** de que o animal de minha propriedade fará parte do protocolo de pesquisa intitulado: _____

_____ desenvolvido no Departamento de _____, Serviço de _____ desta Faculdade, sob a responsabilidade do(a) _____ Professor(a) _____ do Departamento de _____ e Orientador(a) do(a) _____ que se encontra vinculado(a) ao Projeto na condição de _____ do Departamento de _____, Serviço de _____

Outrossim, além de **CIENTE, AUTORIZO** por escrito que o animal de minha propriedade, acima indicado, seja incluído no protocolo ora referido e que tomei ciência, por escrito e de forma clara e compreensível, dos procedimentos que serão aplicados ao animal.

São Paulo, ____ de _____ de _____

NOME LEGÍVEL: _____

ASSINATURA: _____

RG: _____