

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

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 angiogênese. Growth factor. Neoplasia. immunosorbent assay. Immunohistochemical.

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.

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

- 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 metatatasis 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.; POUYSSSEGUR, 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.; JAUSSI, 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.