

ANDRÉ MATHIAS BAPTISTA

**Correlação entre a expressão de
VEGF e a sobrevida no
osteossarcoma**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo

SÃO PAULO
2010

ANDRÉ MATHIAS BAPTISTA

**CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO
DE VEGF E A SOBREVIDA NO
OSTEOSSARCOMA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo

SÃO PAULO
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Baptista, André Mathias

Correlação entre a expressão de VEGF e a sobrevida no osteossarcoma /
André Mathias Baptista. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Olavo Pires de Camargo.

Descritores: 1.Osteossarcoma 2.Marcadores de tumor 3.Prognóstico 4.Análise de
sobrevida

USP/FM/DBD-337/10

DEDICATÓRIA

À minha esposa Adriana (Dri), mulher e companheira extraordinária, que me ilumina a cada dia e me fortalece na busca constante da nossa felicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Olavo Pires de Camargo, Professor Titular e Chefe do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, chefe do Grupo de Oncologia Ortopédica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que me recebeu e inseriu no Grupo de Oncologia Ortopédica, tornando-se amigo e companheiro de viagens e de consultório, ensinando-me a Oncologia Ortopédica, não só nos seus aspectos teóricos e técnicos, mas também e, principalmente, na sua parte humana.

Ao Dr. Marcelo Tadeu Caiero, médico assistente do Grupo de Oncologia Ortopédica, pela antiga amizade e ajuda na avaliação clínica dos pacientes.

Aos Drs. Daniel César Seguel Rebolledo e Luiz Filipe Marques Correia, companheiros de ambulatório e cirurgias no decorrer da realização deste trabalho, sem os quais a qualidade da rotina de atendimento seria comprometida.

À Dra. Cláudia Regina Gomes Cardim Mendes de Oliveira, Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo inestimável auxílio, não só na leitura e interpretação das lâminas, como também nas idéias utilizadas na realização deste trabalho.

À Dra. Renée Zon Filippi, patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela ajuda constante nos trabalhos do Grupo de Oncologia Ortopédica.

Ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto, Professor Associado do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela sua grande receptividade e pela contribuição na análise estatística deste trabalho de forma extremamente prestativa e objetiva.

À Dra. Telma Murias dos Santos, oncologista pediátrica do Grupo de Oncologia Ortopédica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo tratamento conjunto dos pacientes deste estudo, e pelo apoio e incentivo no dia a dia.

Ao biomédico Carlos Fernando Saito, pela competência e aparente facilidade com que coordena as atividades da reunião semanal do Grupo de Oncologia Ortopédica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, amigo que se tornou no decorrer dos anos de convívio, e pela contribuição efetiva na confecção das lâminas deste estudo.

A todos os residentes de quarto ano e estagiários de Grupo de Oncologia Ortopédica, os quais contribuíram e contribuem para o bom andamento do Grupo de Oncologia Ortopédica, e com os quais compartilhamos experiências e informações de maneira franca e mútua no dia a dia.

Às secretárias do Serviço de Pós-Graduação do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Rosana Moreno Costa e Tânia Maria Borges, pela extrema competência com que coordenam o complexo cotidiano do programa, sem as quais certamente as coisas não andariam “nos trilhos”.

ÍNDICE

1	RESUMO	7
2	SUMMARY	9
3	INTRODUÇÃO	11
4	REVISÃO DA LITERATURA	21
5	MATERIAL E MÉTODO	30
6	RESULTADOS	42
7	DISCUSSÃO	58
8	CONCLUSÃO	75
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
10	LISTA DAS TABELAS E DAS FIGURAS	88

RESUMO

RESUMO

BAPTISTA, A. M.

CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE VEGF E A SOBREVIVÊNCIA NO OSTEOSSARCOMA. São Paulo, 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Foram analisados 50 casos de osteossarcoma não metastáticos das extremidades tratados no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre 1986 e 2006 no que se refere à expressão de VEGF. Dezenove pacientes do sexo feminino e 31 do sexo masculino foram a casuística do trabalho. A idade variou de 5 a 28 anos (média de 16 anos) e o seguimento dos pacientes variou de 25 a 167 meses (média de 60,6 meses). As variáveis estudadas foram idade, sexo, localização anatômica, tipo de cirurgia, margens cirúrgicas, tamanho do tumor, necrose pós QT, recidiva local, metástase pulmonar e óbito. Trinta e seis pacientes apresentaram expressão de VEGF menor ou igual a 30% das células tumorais (baixa expressão), ao passo que os 14 restantes apresentaram expressão acima de 30% das células (alta expressão). Dos 36 pacientes com baixa expressão de VEGF, nove evoluíram com metástases pulmonares, dos quais quatro foram a óbito (11,1%). Dentre os 14 casos com alta expressão de VEGF, seis evoluíram com metástases pulmonares e três foram a óbito (21,4%). Porém, não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão de VEGF e qualquer das variáveis estudadas.

SUMMARY

SUMMARY

BAPTISTA, A. M.

CORRELATION BETWEEN THE EXPRESSION OF VEGF AND SURVIVAL IN OSTEOSARCOMA. São Paulo, 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Fifty cases of nonmetastatic osteosarcoma of the extremities treated between 1986 and 2006 at the Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo were evaluated regarding the expression of VEGF. There were 19 females and 31 males. The mean age was 16 years (5-28) and the mean follow-up was 60,6 months (25-167). The variables studied were age, gender, anatomic location, type of surgery, surgical margins, tumor size, post chemotherapy necrosis, local recurrence, pulmonary metastasis and death. Thirty-six patients showed VEGF expression equal or under 30% of the cells (low expression), as the remaining 14 cases had VEGF expression above 30% (high expression). Among the 36 patients with low VEGF expression, nine developed pulmonary metastasis and four died (11,1%). Among the 14 patients with high VEGF expression, six developed pulmonary metastasis and three died (21,4%). There was no statistical significant correlation between the VEGF expression and any of the variables studied.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

OSTEOSSARCOMA

A definição do osteossarcoma clássico pela Organização Mundial da Saúde é a de um tumor maligno de alto grau intramedular primário, no qual as células neoplásicas produzem tecido osteóide, mesmo que em pequenas quantidades.

Sua incidência anual nos Estados Unidos da América é de aproximadamente 4 a 5 casos por milhão de habitantes, o que representa de 1200 a 1500 casos novos por ano, ao passo que no Brasil a estimativa está em cerca de 350 casos novos por ano (IBGE, 2000). Acomete preferencialmente pacientes do sexo masculino, em uma proporção de 1,4 para 1 (ARNDT, 1999), a maioria na segunda década de vida. Sua localização preferencial são as metáfises dos ossos longos, principalmente o fêmur distal, a tíbia proximal e o úmero proximal.

A apresentação clínica geralmente é de dor e aumento de volume de partes moles na região metafisária do osso acometido. Não há sinais sistêmicos associados ou alterações laboratoriais significativas específicas, apesar de alguns estudos associarem altos níveis de fosfatase alcalina e desidrogenase láctica com pior prognóstico de sobrevida.

A radiografia simples geralmente mostra uma lesão óssea mal delimitada, na maioria das vezes blástica, que destrói o padrão trabecular, sem reação endosteal significativa. A destruição cortical é bastante freqüente, com a invasão das partes moles adjacentes. Pode haver reação periosteal importante, muitas vezes com a formação do triângulo de Codman. A imagem em raios de sol (“sunburst” ou “starburst appearance”), que são estrias de material calcificado perpendiculares ao eixo do osso, também é característica do osteossarcoma.

Outros exames de imagem, como a ressonância magnética, são mais úteis para a avaliação da extensão local do tumor, com propósitos mais de planejamento cirúrgico do que de exercício diagnóstico. A ressonância

magnética, a propósito, é o melhor exame para se avaliar a relação do tumor e seu componente de partes moles com o feixe neurovascular principal. Além disso, determina com precisão milimétrica a extensão intraóssea da lesão.

Para se avaliar a presença de metástases à distância, comuns nos pacientes portadores de osteossarcoma, são utilizadas a cintilografia óssea trifásica com Tecnécio 99m e a tomografia computadorizada de tórax.

Existem dois sistemas de estadiamento para os sarcomas ósseos: o estadiamento de Enneking (ENNEKING, 1980) e o da AJCC (American Joint Committee on Cancer) (EDGE, 2009).

O estadiamento de Enneking é eminentemente cirúrgico, sendo baseado no grau histológico do tumor, na compartimentalização anatômica dele e na presença ou não de metástases à distância. Ele é dividido basicamente em três estádios: I para tumores de baixo grau de malignidade, II para tumores de alto grau de malignidade e III para tumores com metástases à distâncias detectáveis. Dentre cada um deles há a subdivisão (a) para os tumores intracompartimentais e (b) para os tumores extracompartimentais.

Já o estadiamento da AJCC, um pouco mais complexo, é baseado em quatro variáveis: grau histológico do tumor, tamanho do tumor no maior eixo, presença ou não de metástases linfonodais e presença ou não de metástases à distância. Além disso, diferencia metástases pulmonares das não pulmonares. Compreende quatro estádios básicos, divididos em subestádios, conforme mostra a TABELA 1.

TABELA 1: Estadiamento da AJCC para tumores ósseos malignos

TX: Tumor primário não pode ser acessado

T0: Sem evidência de tumor primário

T1: Tumor até 8cm no seu maior eixo

T2: Tumor maior que 8 cm no seu maior eixo

T3: Presença de skip metástase

NX: Linfonodos regionais não podem ser acessados

N0: Sem metástase linfonodal regional

N1: Com metástase linfonodal regional

MX: Metástases à distância não podem ser acessadas

M0: Sem metástase à distância

M1a: Metástase pulmonar

M1b: Metástase à distância em outra localização

GX: Grau não pode ser acessado

G1: Bem diferenciado; baixo grau

G2: Moderadamente diferenciado; baixo grau

G3: Pouco diferenciado; alto grau

G4: Indiferenciado; alto grau

Estádio IA	T1	N0	M0	G1,2
Estádio IB	T2,3	N0	M0	G1,2
Estádio IIA	T1	N0	M0	G3,4
Estádio IIB	T2	N0	M0	G3,4
Estádio III	T3	N0	M0	G3,4
Estádio IVA	Qualquer T	N0	M1a	Qualquer G
Estádio IVB	Qualquer T	N1 ou M1b		Qualquer G

O tratamento atual do osteossarcoma é baseado em quimioterapia neoadjuvante (pré-operatória), cirurgia e quimioterapia adjuvante (pós-operatória). A função da quimioterapia neoadjuvante não é aumentar a sobrevida do paciente, e sim aumentar as chances de preservação do membro acometido. Quando a resposta é satisfatória, ocorre melhora da dor, diminuição

do volume tumoral e delimitação das margens tumorais, o que facilita a ressecção do tumor.

A avaliação pré-operatória deve incluir uma nova ressonância magnética de todo o osso acometido, realizada após o final da quimioterapia neoadjuvante. Se o feixe neurovascular principal não estiver acometido e a reconstrução do membro for funcionalmente aceitável, o cirurgião opta pela ressecção do tumor, preservando o membro. Contudo, ainda realizamos a amputação em aproximadamente 30% dos casos (PETRILLI, tese de livre-docência, UNIFESP, 2005), devido geralmente ao grande volume tumoral ao diagnóstico. Quando a preservação do membro está indicada, a margem cirúrgica deve ser ampla, ou seja, com dissecação através de tecido normal, ao redor da zona reativa peritumoral. Quando o osso ressecado for o fêmur, a tíbia ou o úmero, o defeito esquelético resultante deverá ser reconstruído através de endoprótese, enxerto ósseo autólogo (fíbula livre ou vascularizada com enxerto de ilíaco) ou enxerto ósseo homólogo (banco de ossos).

Até a década de 1970, a sobrevida dos pacientes com diagnóstico de osteossarcoma era de cerca de 10% em cinco anos (JAFFE, 1959). Após a introdução da quimioterapia (ROSEN, 1975), a sobrevida dos pacientes portadores destes tumores aumentou sensivelmente. Além disso, com a quimioterapia antes da cirurgia, a preservação do membro acometido começou a ser possível (ROSEN, 1976). A sobrevida livre de doença dos pacientes com doença localizada, ou seja, sem metástases detectáveis à distância, oscila hoje nos centros americanos e europeus ao redor de 65 a 70% (MEYERS, 1997). Além disso, a quimioterapia neoadjuvante tem aumentado em muito a possibilidade de preservação do membro acometido pela neoplasia.

Contudo, a sobrevida nos osteossarcoma permaneceu no mesmo patamar nos últimos 10 a 15 anos, o que certamente justifica esforços no sentido de buscar novos caminhos terapêuticos.

ANGIOGÊNESE

Apesar de haver um número muito grande de tipos de câncer, os mecanismos pelos quais as células tumorais crescem e sobrevivem são similares. A angiogênese é considerada um desses mecanismos.

A angiogênese é um processo no qual há a formação de uma rede vascular a partir de capilares pré-existentes. Este passo é fundamental para o crescimento, a invasão e a produção de metástases dos tumores sólidos. Por conseguinte, não existe tumor sólido com diâmetro acima de 2 milímetros sem que haja angiogênese (GIMBRONE, 1972). Isto ocorre porque as células tumorais devem estar a até 200 micrômetros de distância de um vaso para receberem oxigênio e nutrientes para sobreviver (HOLMGREEN, 1995, e CARMELIET, 2000).

O controle da angiogênese é complexo e regulado por uma série de fatores, estimuladores e inibidores, como resumido na TABELA 2:

TABELA 2: Reguladores da angiogênese

Reguladores da angiogênese	
Estimuladores (+)	Inibidores (-)
Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs)	Trombospondina-1
Fator de crescimento placentário (PIGF)	Angiostatina
Fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs)	Interferon alfa
Fatores de crescimento transformadores (TGFs)	Prolactina fragmento de 16-kd
Angiogenina	Inibidores de metaloproteinases
Interleucina-8 (IL-8)	Fator plaquetário 4
Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)	Genisteína
Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF)	Proteína placentária relacionada à proliferina (PPR)

Fator de crescimento de células endoteliais derivadas de plaquetas (PEGF)	Fator de crescimento transformador beta (TGF- β) ?
Angiopietina 1	Endostatina

Dentre os fatores acima citados, a família dos fatores de crescimento endoteliais vasculares (*vascular endothelial growth factors*, ou VEGFs) é uma das mais potentes estimuladoras de angiogênese.

Quando as células apresentam hipóxia, elas liberam HIF (*hipoxia-inducible factor*), um fator de transcrição intracelular. O HIF, entre outras atividades, estimula a produção e a liberação extracelular de uma família de fatores chamada VEGF.

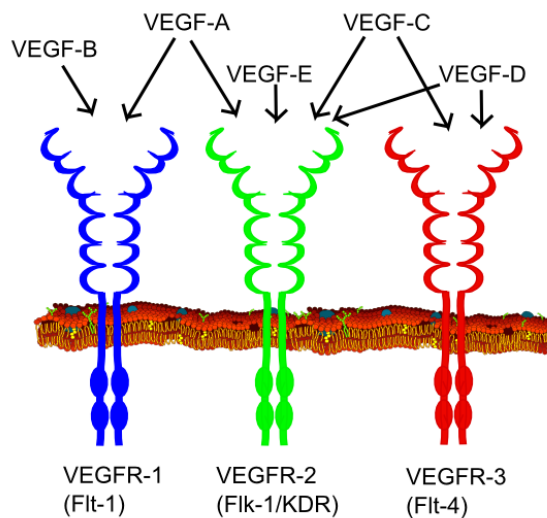
Esta família de fatores é composta por diversos agentes angiogênicos: os VEGFs A, B, C e D, além do o PlGF (*placenta growth factor*). Além destes, temos também os VEGFs E e F, que não são secretados por células humanas. As atividades dos seis VEGFs e do PlGF estão resumidas na TABELA 3.

TABELA 3: Família dos VEGFs

TIPO	FUNÇÃO
VEGF-A	Angiogênese, quimiotaxia para macrófagos e granulócitos e vasodilatação (pela liberação de NO)
VEGF-B	Angiogênese embrionária
VEGF-C	Linfangiogênese
VEGF-D	Linfangiogênese ao redor dos bronquíolos pulmonares
VEGF-E	Produzido por alguns vírus
VEGF-F	Encontrado no veneno de algumas cobras
PlGF	Vasculogênese Necessário também para a angiogênese durante isquemia, inflamação, cicatrização de feridas e câncer

Existem três receptores conhecidos dos VEGFs, chamados VEGFRs 1, 2 e 3. O VEGF-A se liga aos receptores 1 e 2, o VEGF-B se liga apenas ao receptor 1, os VEGF-C e D aos receptores 2 e 3, e o VEGF-E ao receptor 2, conforme a FIGURA 1:

FIGURA 1: Tipos de VEGF e interação com seus receptores

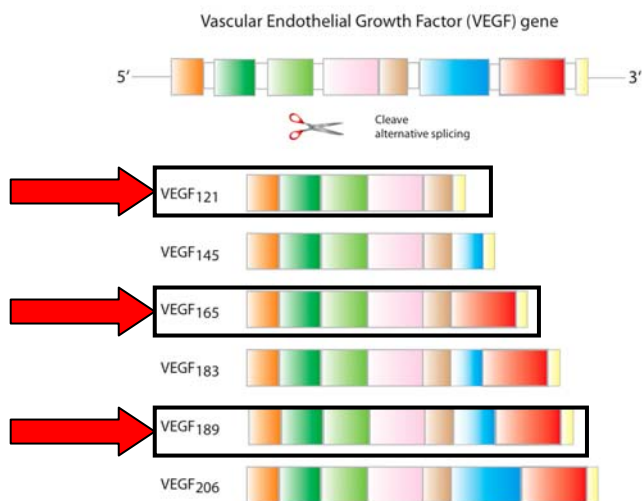


Um dos mais potentes agentes angiogênicos conhecidos é o VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor - A*). Trata-se de uma glicoproteína dimérica com peso de 36-46 quilodaltons (KDa) que age promovendo angiogênese e aumento da permeabilidade vascular.

Como o primeiro VEGF a ser descoberto foi o VEGF-A, na ocasião foi denominado apenas VEGF. Diante deste fato, doravante designaremos o VEGF-A como VEGF apenas.

Seis isoformas do VEGF foram identificadas, com 121, 145, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos, todas produzidas a partir do mesmo gene (FERRARA, 1991). Destas, as mais expressadas e estudadas são as isoformas 121, 165 e 189. (FIGURA 2).

FIGURA 2: Isoformas do VEGF (setas indicam as mais expressadas e estudadas)



A alta expressão do VEGF foi, pela primeira vez, correlacionada com mau prognóstico de sobrevida em osteossarcoma, especificamente no trabalho de LEE, 1999. Vários estudos subseqüentes obtiveram resultados similares, e alguns outros estudos, resultados inconclusivos ou conflitantes, gerando certa controvérsia.

Atualmente tem se dado muita ênfase aos estudos envolvendo possíveis terapias antiangiogênicas, devido ao fato de os vasos tumorais geralmente não sofrerem alterações gênicas que causem resistência a drogas, como nas células tumorais (SCAPPATICCI, 2002). Desta forma, o estudo da inibição da angiogênese, em vez da terapia direta contra as células tumorais, vem se tornando uma linha de pesquisa promissora da terapia contra o câncer.

Os anticorpos monoclonais anti-VEGF vêm sendo estudados em animais há algum tempo, com resultados promissores. Trabalhos com o de KIM, publicado na revista Nature em 1993, já mostravam os potentes efeitos inibitórios destes anticorpos em linhagens celulares tumorais de leiomiossarcoma, rabiomiossarcoma e glioblastoma multiforme (KIM, 1993). Subseqüentemente, outros autores demonstraram que a expressão de VEGF pode estar relacionada a mau prognóstico de sobrevida em outros cânceres,

como de mama (FOEKENS, 2001), próstata (MIYAKE, 2005 e PEYROMAURE, 2007), colorretal (WARREN, 1995), pulmão (BREMNES, 2006), carcinoma de células renais (JACOBSEN, 2004), glioblastoma (PELES, 2004) e ovário (HEFLER, 2007).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-VEGF humanizados (PRESTA, 1997), como o bevacizumab (Avastin®), aprovado pelo FDA em fevereiro de 2004, abriu possibilidade terapêutica real neste campo. Outro derivado de anticorpos como o ranibizumab (Lucentis®), também já é comercializado.

Outra linha de tratamento antiangiogênico desenvolvida são os inibidores de tirosina-quinases estimuladas pelo VEGF, como o lapatinib (Tykerb®), sunitinib (Sutent®), sorafenib (Nexavar®), axitinib, and pazopanib. Os três primeiros já estão sendo comercializados e os outros dois ainda estão em fase de ensaios clínicos.

Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo é estudar a correlação entre a expressão de VEGF e a presença de recidiva local, de metástases à distância e a sobrevida nos pacientes portadores de osteossarcoma de alto grau, não metastático, do esqueleto apendicular, tratados no nosso serviço. Desta forma, aumentando o lastro científico, serão desenhados e conduzidos novos protocolos terapêuticos utilizando drogas antiangiogênicas, visando contribuir para a melhora dos resultados do tratamento do osteossarcoma.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Os trabalhos relatados abaixo foram selecionados levando em consideração apenas o tema pertinente à presente tese, ou seja, trabalhos que correlacionam o VEGF com o osteossarcoma. São 21 trabalhos publicados e uma tese de doutorado da UNIFESP não publicada, de 1999 a 2010, totalizando 22 estudos. A TABELA 4, ao final da revisão da literatura, resume os 22 trabalhos.

1 - Lee et. al. (1999) são os primeiros autores a pesquisar o valor prognóstico do VEGF em pacientes portadores de osteossarcoma. Foi pesquisada por RT-PCR (*reverse transcriptase – polymerase chain reaction*) a presença do RNA mensageiro das isoformas 121 e 165 do VEGF, assim como dos receptores VEGFR1 e VEGFR2, em 30 casos de osteossarcoma não metastáticos. Apenas a presença da isoforma 165 teve correlação com o mau prognóstico de sobrevida dos pacientes. As demais moléculas foram indiferentes.

2 - Kaya et. al. (2000), no ano seguinte, pesquisam a expressão de VEGF e do CD-34 (marcador de vasos) em 27 casos de osteossarcoma. Eles demonstram maior vascularização e pior sobrevida nos casos com alta expressão de VEGF. Os autores utilizam, acima e abaixo de 30% de células positivas para definir os grupos de alta e baixa expressão, respectivamente.

3 - Holzer et. al. (2001) estudam o nível sérico de VEGF em 26 pacientes portadores de osteossarcoma (17), sarcoma de Ewing (6) e condrossarcoma (4). Apenas os pacientes com sarcoma de Ewing apresentaram níveis séricos de VEGF superiores aos controles em pessoas saudáveis. Nos demais tumores não houve diferença estatisticamente significativa. As variáveis epidemiológicas como idade, sexo, tempo de história e tipo de tumor, e a presença de metástases à distância, não tiveram correlação com os níveis séricos de VEGF.

4 - Sulzbacher et. al. (2002) estudam as expressões de osteopontina e de VEGF em material de biópsia de 11 osteoblastomas e de 57 osteossarcomas de alto grau. Foi utilizada imunohistoquímica em blocos de parafina e a expressão foi calculada através do percentual das células positivas. Os autores não observam nenhuma correlação estatisticamente significativa entre as expressões de osteopontina e de VEGF e o prognóstico dos pacientes. Houve, entretanto, uma tendência dos pacientes com expressão de VEGF acima de 60% apresentarem pior prognóstico de sobrevida.

5 - Kaya et. al. (2002) utilizaram o nível sérico de VEGF, bFGF e fator de crescimento placentário para avaliar o impacto prognóstico em 16 casos de osteossarcoma. Apenas o VEGF se mostrou aumentado nos pacientes que eram metastáticos ao diagnóstico ou que desenvolveram metástases à distância no primeiro ano de seguimento. A sensibilidade e a especificidade do nível sérico de VEGF acima da média para o grupo para identificar doença metastática precoce foi de, respectivamente, 100% e 88,9%, neste estudo.

6 - Rutkowski et. al. (2003) comparam os níveis séricos de VEGF e mais 10 citocinas em 72 casos de sarcomas ósseos não metastáticos, sendo 26 osteossarcomas, com controles saudáveis e com pacientes portadores de tumores ósseos benignos. Os pacientes portadores de sarcomas ósseos apresentaram níveis séricos de VEGF e bFGF elevados em relação aos controles, porém similares aos pacientes com tumores ósseos benignos. Contudo, não houve relação entre o maior nível sérico de VEGF e a sobrevida destes pacientes. O que se observou também foi que pacientes com tumores de alto grau, de grande dimensões e com grande invasão local apresentaram maiores níveis séricos de VEGF.

7 - El-Houseini (2004) estuda 45 crianças com tumores sólidos malignos (10 osteossarcomas, 11 sarcomas de Ewing, 13 neuroblastomas e 11

rabdomiossarcomas) e demonstra que o nível sérico de VEGF (por ELISA) está significativamente aumentado nos pacientes com doença metastática. Desta forma, o autor propõe que o VEGF sérico pode ser um marcador confiável para o seguimento oncológico destas neoplasias.

8 - Kaya et. al. (2004) estudam 10 casos de osteossarcoma com o intuito de observar resistência tumoral concomitante (CTR, ou *concomitant tumor resistance*), que é o aparecimento de metástases à distância logo após a ressecção do tumor primário. A hipótese é a de que o tumor primário inibe o crescimento das micrometástases à distância através da modulação de fatores angiogênicos. Os autores mediram os níveis séricos de VEGF, bFGF (*basic fibroblast growth factor*), PlGF (*placenta growth factor*), endostatina e TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*). Os níveis de VEGF e de endostatina caíram significativamente após a ressecção do tumor primário. Contudo, no grupo que desenvolveu metástases à distância os níveis de VEGF e de endostatina foram significativamente mais elevados.

9 - Jung et. al. (2005) estudam 25 casos de osteossarcoma em relação às expressões de TGF- β 1, 2 e 3 (*transforming growth factor-beta*), e VEGF em blocos de parafina submetidos a imunistoquímica. Os resultados mostram que a alta expressão das isoformas 2 e 3 do TGF- β está associada ao alto grau histológico do tumor. Já a expressão do VEGF, além de estar aumentada nos casos de alto grau histológico, está também aumentada nos casos com pior sobrevida.

10 - Charity et. al. (2006) estudam a expressão do VEGF por imunistoquímica nos tumores ressecados de 52 pacientes portadores de osteossarcoma estágio IIB ao nível do joelho (48 receberam quimioterapia pré-operatória). Os autores observam que os tumores que apresentavam expressão de VEGF acima de 25% carregam um pior prognóstico de sobrevida e um menor tempo livre de doença.

11 - Ek et. al. (2006) (1) estudam material de biópsia de 25 casos de osteossarcoma. Foram estudadas as expressões do CD-34, CD-31 e do VEGF por imunohistoquímica. A expressão do VEGF se mostrou aumentada nestes casos de osteossarcoma, o que os autores creditam ao fato de os radiologistas terem realizado as biópsias em áreas de alto metabolismo dos tumores. Não houve correlação entre a DMV (densidade microvascular), avaliada através da expressão do CD-34 e do CD-31, e a evolução oncológica dos casos. Da mesma forma, a expressão do VEGF não se mostrou correlacionada com o prognóstico dos pacientes.

12 - Ek et. al. (2006) (2) estudam 11 pacientes com osteossarcoma acima de 40 anos de idade. Os autores correlacionam as expressões de marcadores vasculares (CD-31 e CD-43) e do VEGF em oito dos 11 casos acima de 40 anos com 17 casos abaixo de 40 anos de idade (apenas oito tinham material disponível para análise imunohistoquímica). Os marcadores vasculares se mostraram mais expressados no grupo acima de 40 anos, apesar de não ser estatisticamente significativa. O VEGF, no entanto, se mostrou igualmente expresso nos dois grupos.

13 - Oda et. al. (2006) estudam a DMV e as expressões de CXCR4, VEGF e MIB-1 em 30 casos de osteossarcoma através de análise imunohistoquímica em material de biópsia. O VEGF foi avaliado, tanto quantitativa (negativa, 1+, 2+ e 3+) quanto qualitativamente, através da coloração citoplasmática. Os pacientes com expressão positiva de VEGF tiveram menor sobrevida quando comparados com os casos sem expressão de VEGF.

14 - Mizobuchi et. al. (2008) estudam as expressões de HIF-1 α (*hipoxia-inducible factor 1 α*), VEGF, Fator VIII e Ki-67 em amostras de biópsias de 48 casos de osteossarcoma. O VEGF foi avaliado semiquantitativamente através da escala de cruces e a DMV foi avaliada pela expressão do Fator VIII. O Ki-67 foi utilizado para avaliar o índice de proliferação celular. Das quatro variáveis testadas,

apenas o HIF-1 α mostrou correlação com o mau prognóstico dos pacientes estudados. Dos pacientes que apresentaram metástases à distância, 61% mostraram positividade para HIF-1 α .

15 - Huang et. al. (2008) estudam blocos de parafina de 31 pacientes que receberam quimioterapia para osteossarcoma. Foram avaliadas as expressões de alfa V integrinas e do VEGF através de imunistoquímica. As expressões das integrinas e do VEGF estavam altas quando comparadas ao tecido ósseo normal e se reduziram de maneira importante após o tratamento quimioterápico. Ambos apresentaram também correlação com a recorrência da doença, estágio de Enneking e invasão local. Contudo, apenas a expressão do VEGF mostrou correlação com a presença de metástases à distância.

16 - Marinho (tese de doutorado UNIFESP, 2009) estuda 50 casos de osteossarcoma central de alto grau em material parafinado proveniente das biópsias. Foram pesquisadas as expressões de VEGF, CD-34 e CD-31 através de imunistoquímica, e estas foram correlacionadas às características clínicas, e à presença de metástases à distância e óbito no seguimento. Os pacientes foram positivos para VEGF quando mais do que 64,7% das células (média) eram positivas. A DMV foi mensurada através da contagem do número de vasos positivos para CD-34 e CD-31 em 10 campos de grande aumento (400X). Os pacientes com DMV acima da média foram considerados como alta DMV, e abaixo da média, como baixa DMV. Houve correlação estatisticamente significativa entre a alta expressão de VEGF e a pior sobrevida global e sobrevida livre de doença.

17 - Kaya et. al. (2009) estudam prospectivamente 15 pacientes portadores de osteossarcoma. O nível sérico de VEGF dos pacientes foi avaliado antes do início tratamento e os pacientes foram classificados em dois grupos: alta concentração sérica de VEGF (>1000pg/ml) e baixa concentração sérica de VEGF. Não houve correlação entre o nível sérico de VEGF e necrose pós-quimioterapia ou presença

de metástases à distância. Os autores concluem, entretanto, que os pacientes do grupo de alta concentração sérica de VEGF apresentam sobrevida menor do que o grupo com baixa concentração sérica de VEGF.

18 - Bajpai et. al. (2009) estudam 31 casos de osteossarcoma virgens de tratamento, sendo 23 não metastáticos. A expressão do VEGF foi estudada por imunistoquímica no material da biópsia e no tumor ressecado após quimioterapia. A expressão de VEGF no material da biópsia se mostrou altamente relacionada ao alto grau histológico (90% de correlação), mas não se correlacionou com a necrose pós-quimioterapia. Contudo, a alta expressão de VEGF no material do tumor pós-quimioterapia mostrou correlação com o mau prognóstico de sobrevida dos pacientes. Além disso, a diferença de expressão do VEGF no tumor pós-quimioterapia, em relação ao material da biópsia, também mostrou ser de valor prognóstico neste grupo de pacientes.

19 - Zhou et. al. (2009) estudam, em 65 casos de osteossarcoma, as expressões de VEGF e de EMMPRIM (*Extracellular matrix metalloproteinase inducer*) e as correlacionam com a sobrevida dos pacientes. Foram utilizados blocos de parafina e os ensaios foram realizados com anticorpos. As expressões de VEGF e de EMMPRIM foram positivas em 72% e 69%, respectivamente, dos casos. O estágio, a necrose pós-QT e as expressões de VEGF e de EMMPRIM correlacionaram com mau prognóstico de sobrevida global e sobrevida livre de eventos.

20 - Abdeen et. al. (2009) estudam 48 casos de osteossarcoma, sendo 28 mulheres e 20 homens com idade média de 22,1 anos. Quarenta e um casos eram estágio IIB de Enneking (alto grau histológico, extracompartimental) e sete eram estágio III de Enneking (metástase à distância). O tecido utilizado nos ensaios foi de blocos de parafina de 15 biópsias, 25 tumores ressecados e oito metástases à distância. Foi pesquisada a expressão de diversas moléculas por ensaios

imunoistoquímicos em material parafinado. Dentre as 29 moléculas estudadas, apenas o receptor três do VEGF (VEGFR-3) mostrou correlação entre a sua alta expressão e o mau prognóstico de sobrevida global e sobrevida livre de eventos dos pacientes. Além disso, a alta expressão de VEGF-B se correlacionou com a baixa necrose pós-quimioterapia. Em relação ao VEGF (VEGF-A), não houve correlação entre a sua expressão e a sobrevida dos pacientes neste estudo.

21 - Rossi et. al. (2010) estudam, em 16 casos de osteossarcoma não metastático, as expressões de CD-31 e de VEGF, no material da biópsia e no tumor pós-QT. Havia 12 homens e quatro mulheres, com idade média de 17,25 anos (13-40). Houve cinco casos que apresentaram recidivas locais, sete casos com metástases à distância no seguimento e cinco óbitos. Os autores observaram que quando a expressão de VEGF estava aumentada no tumor pós-QT em relação à biópsia, a chance de recidiva local era maior, a presença de metástases à distância era maior e o prognóstico de sobrevida era pior.

22 - Lin et. al. (2010) estudam a expressão de CXCR4 e VEGF em 56 casos de osteossarcoma. Havia 30 homens e 26 mulheres, com idade média de 22,4 anos (7-67). Doze pacientes eram estágio III de Enneking (metástase à distância) e, os demais, estágio IIB (alto grau histológico, extracompartmental). Os pacientes foram seguidos em média por 33,5 meses (20-75). Os ensaios foram realizados em material parafinado do tumor primário, e foram pesquisadas as expressões de CXCR4 e de VEGF por imunoistoquímica. Houve expressão de CXCR4 em 69,6% dos casos e de VEGF em 64,3% dos casos, sendo alta a correlação entre a expressão das duas moléculas ($p=0,02$). Os autores observaram também uma maior expressão de CXCR4 e de VEGF nos pacientes estágio III do que nos pacientes estágio IIB. Finalmente, os autores relatam que os casos com maior expressão de CXCR4 e de VEGF apresentaram maior evolução para metástases à distância e pior sobrevida.

TABELA 4: Revisão da literatura sobre a expressão do VEGF no osteossarcoma

Primeiro autor e ano de publicação	Número de casos	Material pesquisado	Correlação da alta expressão com o mau prognóstico
Lee et. al., 1999	30	Biópsia	Positiva
Kaya et. al., 2000	27	Biópsia	Positiva
Holzer et. al., 2001	17	Sangue periférico	Negativa
Sulzbacher et. al., 2002	57	Biópsia	Negativa
Kaya et. al., 2002	16	Sangue periférico	Positiva
Rutkowsky et. al., 2003	26	Sangue periférico	Negativa
El-Houseini et. al., 2004	10	Sangue periférico	Positiva*
Kaya et. al., 2004	10	Sangue periférico	Positiva
Jung et. al., 2005	25	Biópsia	Positiva
Charity et. al., 2006	52	Tumor pós QT	Positiva
Ek et. al., 2006 (1)	25	Biópsia	Negativa
Ek et. al., 2006 (2)	11	Biópsia	Negativa
Oda et. al., 2006	30	Biópsia	Positiva
Mizobuchi et. al., 2008	48	Biópsia	Negativa
Huang et. al., 2008	38	Biópsia	Positiva
Marinho, 2009**	50	Biópsia	Positiva
Kaya et. al., 2009	15	Sangue periférico	Positiva
Bajpai et. al., 2009	31	Biópsia + Tumor	Positiva
Zhou et. al., 2009	65	Biópsia	Positiva
Abdeen et. al., 2009	48	Biópsia + Tumor + Metástase	Negativa
Rossi et. al., 2010	16	Biópsia + Tumor	Positiva
Lin et. al., 2010	56	Biópsia	Positiva

Legenda: OS: osteossarcoma, QT: quimioterapia

*: Estatística realizada com 45 pacientes com outros três tipos de tumor

** : Tese de doutorado da UNIFESP, não publicada

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

O estudo foi realizado com base no Ambulatório do Grupo de Oncologia Ortopédica e no Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Todos os prontuários de pacientes portadores de osteossarcoma no período de 1986 a 2006 foram levantados e analisados, número que totalizou 195 casos.

Foram utilizados três critérios de inclusão:

1 - Osteossarcoma central primário de alto grau histológico, localizado no esqueleto apendicular, não metastático ao diagnóstico.

2 - Seguimento clínico de no mínimo 24 meses de período pós-operatório para os pacientes vivos.

3 - Dados do prontuário completos, com presença do bloco da biópsia.

Dos 195 casos iniciais, 50 preencheram os critérios de inclusão acima mencionados.

Nestes 50 casos, foram colhidos os seguintes dados:

1 - Número de registro HC

2 - Nome

3 - Idade

-
- 4 - Gênero
 - 5 - Localização anatômica
 - 6 - Data da biópsia
 - 7 - Data da cirurgia
 - 8 - Tipo de cirurgia (ressecção ou amputação)
 - 9 - Margens cirúrgicas (livres ou comprometidas)
 - 10 - Maior dimensão do tumor (em cm)
 - 11 - Necrose induzida pela QT (em %)
 - 12 - Presença ou não de recidiva local
 - 13 - Presença ou não de metástases à distância
 - 14 - Seguimento (em meses)
 - 15 - Status no último seguimento (sem evidência de doença (SED), vivo com doença (VCD), óbito pela doença (OPD) ou óbito por outras causas (OOC))
-

ESTUDO DA CASUÍSTICA

TABELA 5: Características da casuística (continua na página 34)

Caso	Idade	Gênero	Cirurgia	Status final	SG	SLE	Recidiva local	Metástase	Óbito
1	16	F	05/05/89	SED 26/08/2002	159	159	não	não	não
2	13	M	30/11/89	MPD 20/04/1996	77	44	44	47	77
3	16	M	09/04/90	VCD 09/03/1999	107	98	98	não	não
4	19	M	03/04/91	MPD 03/10/1995	42	26	não	26	42
5	17	M	24/10/91	MPD 08/02/1998	76	17	17	22	76
6	15	F	22/06/1992	SED 05/05/2006	167	167	não	não	não
7	12	M	26/10/92	SED 02/03/2004	137	137	não	não	não
8	24	M	21/06/93	VCD 14/12/1995	30	23	não	23	não
9	18	M	27/03/95	SED 13/01/1998	34	34	não	não	não
10	8	F	05/04/95	MPD 07/10/2001	78	35	não	35	78
11	17	M	19/04/95	VCD 30/04/1998	36	5	não	5	não
12	25	F	24/05/95	VCD 09/12/1997	31	22	22	22	não
13	17	M	20/11/95	MPD 03/12/1998	37	7	não	7	37
14	7	F	27/11/95	VCD 12/04/2006	101	2	2	5	não
15	18	M	15/01/96	SED 08/10/2008	105	105	não	não	não
16	14	F	14/02/96	SED 02/03/1999	37	37	não	não	não
17	16	F	15/04/96	VCD 18/05/2000	49	32	não	32	não
18	18	F	22/07/96	SED 29/04/2003	81	81	não	não	não
19	5	M	07/05/97	SED 20/04/2000	35	21	21	não	não
20	22	M	12/05/97	MPD 10/10/2001	53	26	não	26	53
21	19	F	11/02/98	SED 13/02/2007	108	108	não	não	não
22	22	F	10/06/98	SED 17/09/2008	123	123	não	não	não
23	13	F	03/08/98	SED 26/03/2002	43	43	não	não	não
24	24	M	02/09/98	SED 23/09/2008	120	24	24	não	não
25	12	M	11/11/98	SED 16/04/2008	113	113	não	não	não

Caso	Idade	Gênero	Cirurgia	Status final	SG	SLE	Recidiva local	Metástase	Óbito
26	28	M	01/12/99	AWD 08/01/2008	97	46	62	46	não
27	12	F	27/09/01	VCD 29/07/2008	82	25	25	59	não
28	17	M	16/09/02	SED 21/05/2008	68	68	não	não	não
29	19	M	02/10/03	SED 05/12/2007	50	50	não	não	não
30	15	F	24/11/03	SED 10/04/2007	41	41	não	não	não
31	14	M	27/05/04	VCD 20/05/2008	48	29	não	29	não
32	19	M	14/06/04	SED 19/08/2008	50	50	não	não	não
33	19	M	06/07/04	SED 15/07/2008	48	48	não	não	não
34	21	M	17/09/04	MPD 30/11/2008	50	10	10	20	50
35	22	F	08/11/04	SED 20/12/2008	49	49	não	não	não
36	24	F	18/11/04	SED 07/11/2007	36	36	não	não	não
37	14	F	13/01/05	SED 23/09/2008	44	44	não	não	não
38	13	M	04/04/05	SED 24/07/2007	27	27	não	não	não
39	11	F	25/04/05	SED 08/10/2008	42	42	não	não	não
40	14	F	05/05/05	SED 11/09/2007	28	28	não	não	não
41	8	M	29/08/05	SED 11/03/2008	31	31	não	não	não
42	13	M	03/10/05	SED 15/07/2008	33	33	não	não	não
43	16	M	13/10/05	SED 25/06/2008	32	32	não	não	não
44	15	M	26/01/06	SED 13/08/2008	31	31	não	não	não
45	13	M	03/04/06	SED 16/07/2008	27	27	não	não	não
46	16	M	15/05/06	SED 16/06/2008	25	25	não	não	não
47	9	M	09/06/06	SED 01/09/2008	27	27	não	não	não
48	16	M	13/07/06	SED 01/09/2008	26	26	não	não	não
49	13	F	05/10/06	SED 23/04/2009	30	30	não	não	não
50	10	M	09/10/06	SED 23/02/2009	28	28	não	não	não
Total:	Média:	31M e 19F	-	-	M.: 60,6	-	10 / 50 (20%)	15 / 50 (30%)	7 / 50 (14%)

A idade dos pacientes no momento do diagnóstico variou entre cinco e 28 anos, com média de 15,96 anos. O seguimento médio foi de 60,58 meses (25–167 meses).

A sobrevida global foi de 86%, a sobrevida livre de doença foi de 70% e a recidiva local ocorreu em 20% dos casos.

As demais variáveis encontram-se nas TABELAS 6 a 14:

TABELA 6: Características da casuística: gênero

Gênero	Masculino	Feminino
Total: 50	31	19

TABELA 7: Características da casuística: localização anatômica

Localização anatômica	Membro superior	Membro inferior
Total: 50	8	42

TABELA 8: Características da casuística: tipo de cirurgia

Tipo de cirurgia	Ressecção	Amputação
Total: 50	43	7

TABELA 9: Características da casuística: margem cirúrgica

Margem cirúrgica	Livres	Comprometidas
Total: 50	44	6

TABELA 10: Características da casuística: tamanho do tumor

Tamanho do tumor	≤ 8cm	> 8cm
Total: 50	13	37

TABELA 11: Características da casuística: necrose pós quimioterapia

Necrose pós QT	≤ 50%	>50%	Não fez QT pré op.
Total: 50	27	17	6

TABELA 12: Características da casuística: presença de recidiva local

Recidiva local	Ausente	Presente
Total: 50	40	10

TABELA 13: Características da casuística: presença de metástase à distância

Metástase à distância	Ausente	Presente
Total: 50	35	15

TABELA 14: Características da casuística: status oncológico final

Status final	SED	VCD	OPD	OOC
Total: 50	35	9	6	0

Legenda:

QT: quimioterapia

SED: sem evidência de doença

VCD: vivo com doença

OPD: óbito pela doença

OOC: óbito por outras causas

ANÁLISE HISTOLÓGICA

O estudo das lâminas foi realizado por dois patologistas do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ambos com experiência em tumores musculoesqueléticos.

O diagnóstico de osteossarcoma foi confirmado através da análise de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina.

Todos os materiais analisados foram provenientes das biópsias ou dos produtos das ressecções dos tumores recém-diagnosticados, sem tratamento

quimioterápico ou radioterápico prévio. Cada caso foi estudado e classificado pelos dois patologistas, em uma análise cega da identidade e situação clínica do paciente.

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Cortes histológicos de quatro micrômetros de espessura dos tumores emblocados em parafina foram submetidos ao estudo imunoistoquímico. Foi empregado o seguinte anticorpo:

- Anticorpo monoclonal de camundongo anti-humano VEGF (Dako Corporation, Carpinteria CA, USA, clone VG1, isotipo IgG1, kappa, isoformas VEGF 121, 165 e 189), com diluição 1:100.

Os espécimes foram submetidos à recuperação antigênica com o uso do calor, utilizando-se panela de pressão. Foi utilizado o anticorpo acima descrito, avaliado em cortes histológicos em lâminas previamente silanizadas (3-aminopropyltriethoxysilane, Sigma Chemical CO, EUA, código A3 648), deixadas em estufa a 60^oC, por 24 horas, para maior adesão aos cortes. O método utilizado foi streptavidina-biotina-peroxidase. A reação de detecção foi realizada com o uso do "kit" DAKO StreptABComplex/HRP (estreptavidina-biotina-peroxidase) e LSAB, que consistiu nas seguintes etapas:

- 1) Incubação com o anticorpo primário, na diluição que será estabelecida previamente para cada anticorpo, em TBS, durante uma hora, a 37^oC;
 - 2) Lavagem em TBS e incubação no mesmo tampão durante cinco minutos;
 - 3) Incubação com o anticorpo secundário biotilado durante 30 minutos a temperatura ambiente e posterior lavagem com TBS;
 - 4) Incubação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase durante 30 minutos a temperatura ambiente;
 - 5) Lavagem e posterior incubação com TBS durante cinco minutos;
-

6) Incubação com o substrato DAB (6mg de tetrahydrocloridio de 3,3-diaminobenzidine em 10ml de 0,05 M TBS, pH 7.6, e 0,1ml de 3% H₂O₂) durante 5 minutos;

7) Lavagem em água destilada;

8) Contra-coloração com hematoxilina de Harrys;

9) Montagem com gelatina glicerizada.

A positividade da reação foi avaliada pela cor marrom, visualizada em microscopia ótica com aumento de 200X, representando o complexo antígeno-anticorpo formado, capaz de ligar o cromógeno. Foi selecionado o campo microscópico mais representativo possível, ou seja, com a maior expressão possível de VEGF. Em seguida, foram contadas as células com expressão positiva no campo selecionado e foi calculada a sua porcentagem sobre o total de células do campo.

A análise da expressão do VEGF foi realizada conforme o estudo de KAYA, 2000:

1. Baixa expressão de VEGF ($\leq 30\%$ das células tumorais), denominado Grupo 1
2. Alta expressão de VEGF ($> 30\%$ das células tumorais), denominado Grupo 2

Foi calculada a média das porcentagens obtidas pelos dois patologistas em cada caso e esse percentual ficou definido como a expressão de VEGF de cada caso.

FIGURA 3: Caso número 27, com expressão de VEGF de 18% (aumento de 400X)

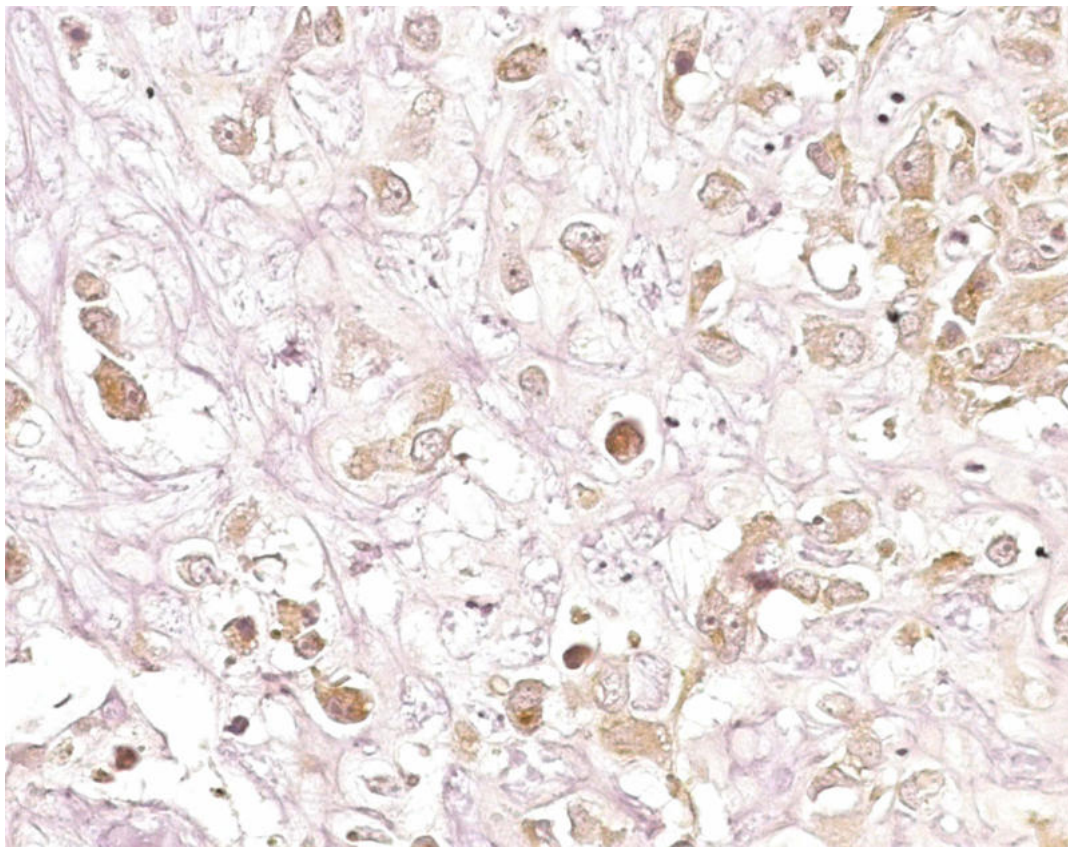
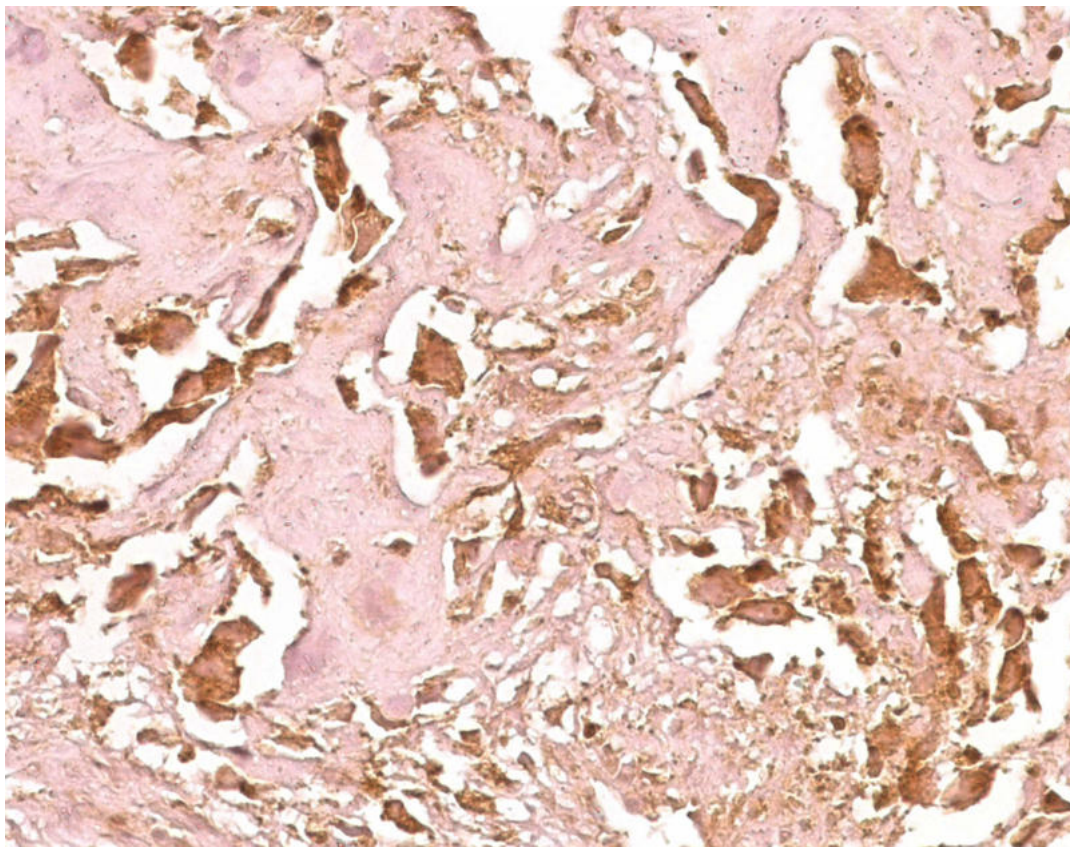


FIGURA 4: Caso número 26, com expressão de VEGF de 52% (aumento de 400X)



Estes dois grupos (baixa e alta expressão de VEGF) foram então comparados em relação aos seguintes parâmetros:

Idade: até 20 anos X acima de 20 anos

Gênero: masculino X feminino

Localização anatômica: membro superior X membro inferior

Tamanho do tumor: ≤ 8 cm X > 8 cm (AJCC)

Tipo de cirurgia: ressecção X amputação

Margens cirúrgicas microscópicas: livres X comprometidas

Necrose pós-quimioterapia: $\leq 50\%$ X $> 50\%$ (Huvos)

Recidiva local: ausente X presente

Metástase à distância: ausente X presente

Sobrevida livre de doença: (SED + OOC) X (VCD + OPD)

Sobrevida global: (SED + VCD + OOC) X OPD

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram construídas as curvas de Kaplan-Meyer da sobrevida global, tempo até recidiva e tempo até metástase à distância dos pacientes, segundo a expressão de VEGF. Os grupos 1 e 2 foram comparados segundo esses tempos, com o uso do teste log-rank (KLEINBAUM, 1996).

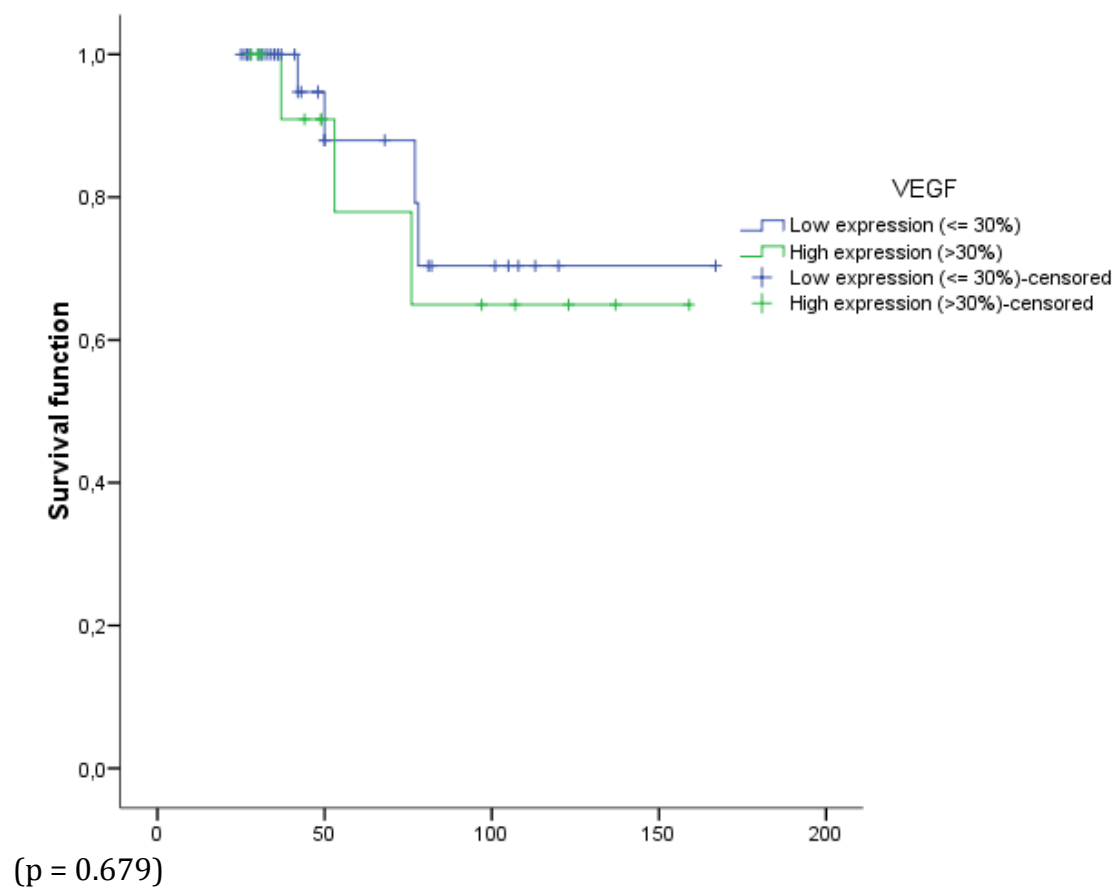
Para verificar a existência de associação entre o óbito e os grupos (VEGF) foram descritos os óbitos segundo VEGF e realizado o teste exato de Fisher (KIRKWOOD e STERN, 2006).

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

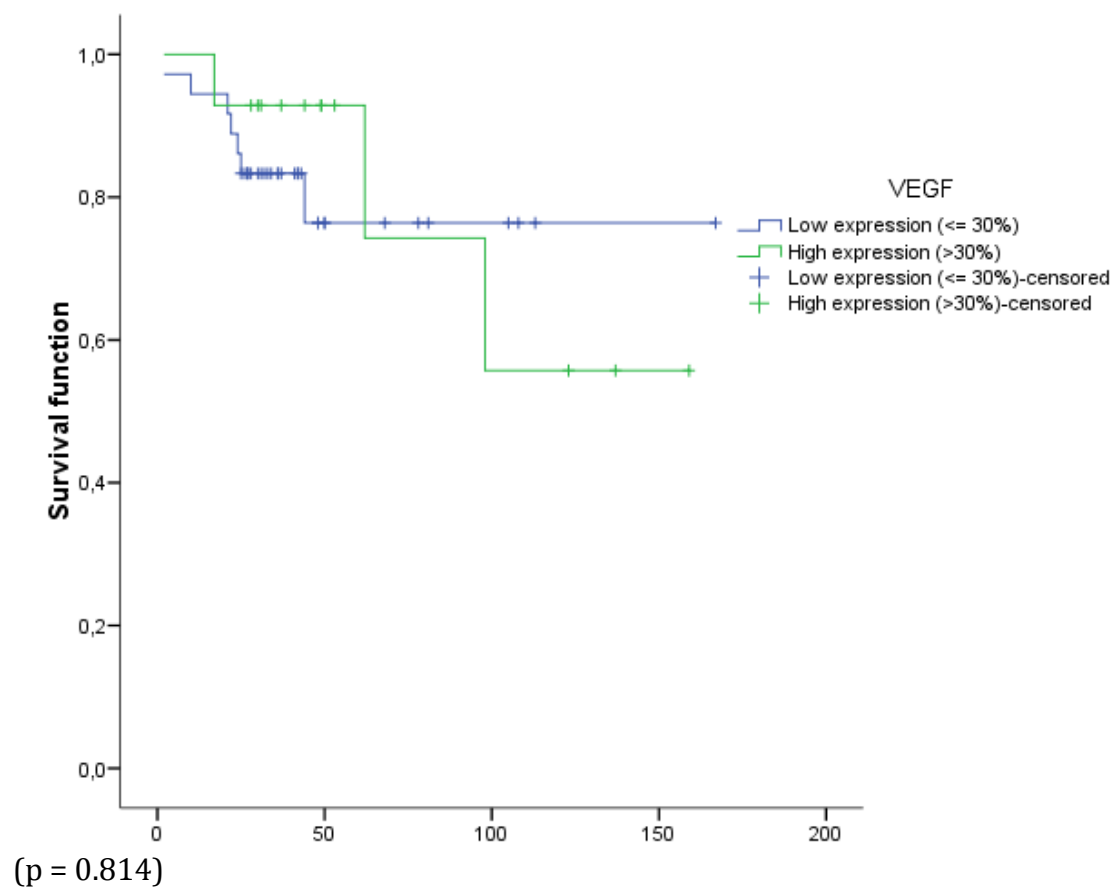
RESULTADOS

FIGURA 5: Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida global para os grupos 1 (baixa expressão de VEGF) e 2 (alta expressão de VEGF).



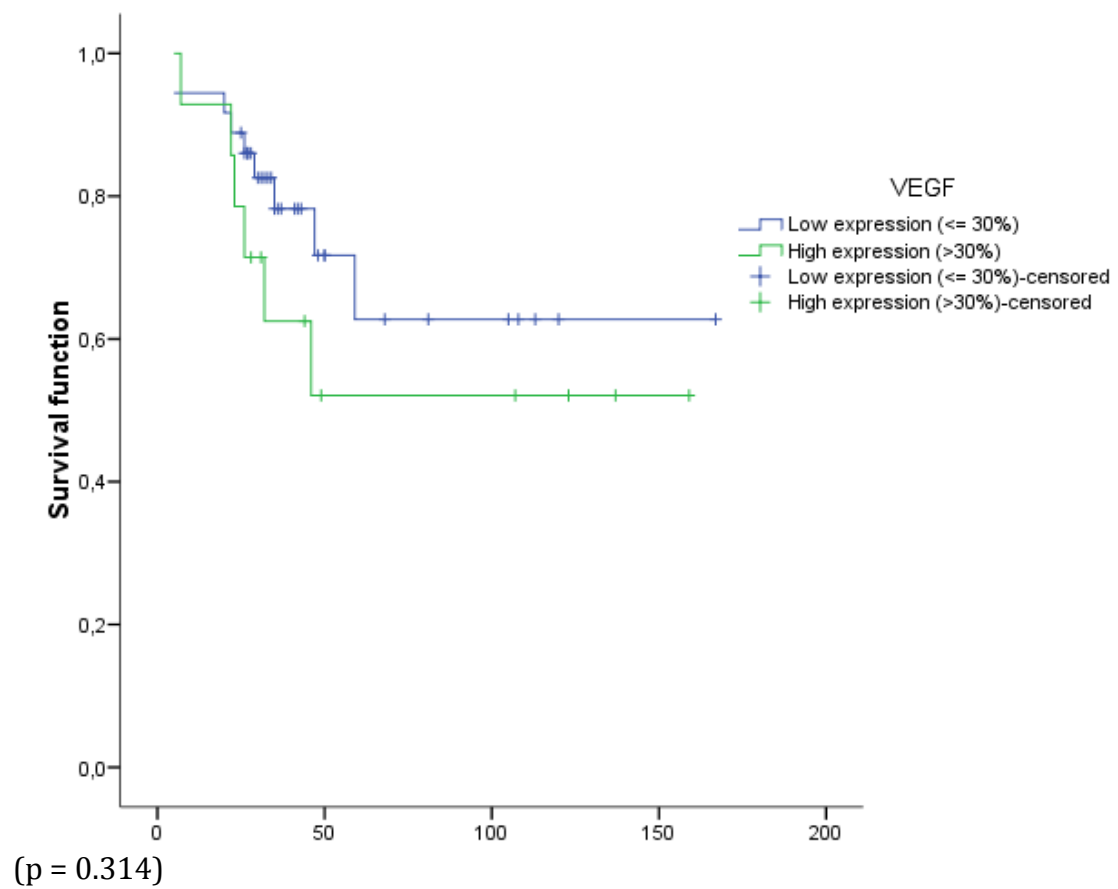
RESULTADOS

FIGURA 6: Curvas de Kaplan-Meier de recidiva local para os grupos 1 (baixa expressão de VEGF) e 2 (alta expressão de VEGF).



RESULTADOS

FIGURA 7: Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença para os grupos 1 (baixa expressão de VEGF) e 2 (alta expressão de VEGF).



 RESULTADOS

TABELA 15 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%),
DA FAIXA ETÁRIA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF.
COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

FAIXA ETÁRIA	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
≤ 20 anos	32	64	9	18
> 20 anos	4	8	5	10
TOTAL	36	72	14	28

$p = 0.056$ (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

 RESULTADOS

TABELA 16 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO GÊNERO SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

GÊNERO	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
MASCULINO	22	44	9	18
FEMININO	14	28	5	10
TOTAL	36	72	14	28

$p = 0.550$ (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

RESULTADOS

TABELA 17 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
MEMBRO SUPERIOR	4	8	4	8
MEMBRO INFERIOR	32	64	10	20
TOTAL	36	72	14	28

$p = 0.140$ (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

 RESULTADOS

TABELA 18 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO TIPO DE CIRURGIA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TIPO DE CIRURGIA	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
RESSECÇÃO	29	58	14	28
AMPUTAÇÃO	7	14	0	0
TOTAL	36	72	14	28

$p = 0.084$ (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

 RESULTADOS

TABELA 19 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA MARGEM CIRÚRGICA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

MARGEM CIRÚRGICA	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
LIVRE	31	62	13	26
COMPROMETIDA	5	10	1	2
TOTAL	36	72	14	28

$p = 0.455$ (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

 RESULTADOS

TABELA 20 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO TAMANHO DO TUMOR SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TAMANHO DO TUMOR	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
$\leq 8\text{cm}$	8	16	5	10
$>8\text{cm}$	28	56	9	18
TOTAL	36	72	14	28

$p = 0.264$ (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

 RESULTADOS

 TABELA 21 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA NECROSE PÓS QUIMIOTERAPIA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

NECROSE PÓS QT	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
$\leq 50\%$	18	36	9	18
$> 50\%$	12	24	5	10
TOTAL	30	60	14	28

(6 NA = 12%)

p = 0.528 (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

 RESULTADOS

TABELA 22 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA PRESENÇA DE RECIDIVA LOCAL SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

RECIDIVA LOCAL	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
AUSENTE	29	58	11	22
PRESENTE	7	14	3	6
TOTAL	36	72	14	28

$p = 0.717$ (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

 RESULTADOS

TABELA 23 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA PRESENÇA DE METÁSTASE À DISTÂNCIA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

METÁSTASE À DISTÂNCIA	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
AUSENTE	27	54	8	16
PRESENTE	9	18	6	12
TOTAL	36	72	14	28

$p = 0.185$ (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

 RESULTADOS

TABELA 24 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO ÓBITO SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

ÓBITO	EXPRESSÃO DE VEGF			
	≤ 30%		> 30%	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
AUSENTE	32	64	11	22
PRESENTE	4	8	3	6
TOTAL	36	72	14	28

p = 0.384 (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

 RESULTADOS

TABELA 25 - DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO STATUS ONCOLÓGICO SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

STATUS ONCOLÓGICO	EXPRESSÃO DE VEGF			
	$\leq 30\%$		$> 30\%$	
	Absoluta (n)	Relativa (%)	Absoluta (n)	Relativa (%)
SED	27	54	8	16
VCD + OPD	9	18	6	12
TOTAL	36	72	14	28

$p = 0.185$ (Teste Exato de Fisher calculado p/ monocaudal)

RESULTADOS

Os resultados mostraram que não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão de VEGF e quaisquer das variáveis estudadas.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A evolução histórica do tratamento do osteossarcoma se divide nitidamente em dois períodos: antes e após a quimioterapia.

Na era pré-quimioterapia, o tratamento constava simplesmente da amputação do membro acometido, quando possível, e a observação dos pacientes, dos quais mais de 90% pereciam da enfermidade em um curto espaço de tempo (MARCOVE, 1970).

Os primeiros estudos sobre a eficácia da quimioterapia no tratamento do osteossarcoma foram publicados na década de 1970 (ROSEN, 1975). Inicialmente, a quimioterapia foi utilizada nos pacientes após a amputação do membro (chamada quimioterapia adjuvante). Os oncologistas observaram que os pacientes experimentavam um maior tempo de sobrevida, além da estabilização das metástases pulmonares em muitos casos. Contudo, havia ainda um certo ceticismo por parte da comunidade científica.

Foi o estudo multi-institucional MIOS (Multinstitutional Osteosarcoma Study), coordenado por Michael Link e publicado no *New England Journal of Medicine* em 1986, que acabou com as dúvidas em relação à eficácia da quimioterapia no tratamento do osteossarcoma. Foram comparados prospectivamente dois grupos de pacientes portadores de osteossarcoma: em um deles (grupo controle) foi instituído o tratamento tradicional da época, ou seja, cirurgia ablativa seguida de observação dos pacientes; em outro, foi realizada poliquimioterapia adjuvante com metotrexate em altas doses, doxorubicina, cisplatina, bleomicina, ciclofosfamida e actinomicina D. O grupo controle mostrou sobrevida livre de doença em dois anos de 17%, contra 66% do grupo submetido à quimioterapia adjuvante. Esta melhora na sobrevida livre de doença se manteve no seguimento de seis anos, com 11% para o grupo controle e 61% no grupo tratado com poliquimioterapia (LINK, 1986).

Estimulados pelos bons resultados, muitos autores começaram a sugerir a administração das drogas para os pacientes antes da cirurgia (chamada

quimioterapia neoadjuvante). O principal apelo era o de que a quimioterapia, além de diminuir o tumor, permitindo a preservação do membro, aumentava também significativamente o tempo de sobrevida dos pacientes. Dentro deste contexto, foi sugerida a quimioterapia antes da cirurgia dos pacientes portadores de osteossarcoma das extremidades (ROSEN, 1976).

Desde então, o tratamento padrão do osteossarcoma inclui quimioterapia. Sempre adjuvante, e sempre que possível, neoadjuvante também.

Os resultados oncológicos dos pacientes melhoraram muito, sendo que a sobrevida dos pacientes saltou de 10 a 15% em cinco anos, para cerca de 60 a 70% em cinco anos. Inúmeros estudos subseqüentes confirmaram a eficácia da quimioterapia no tratamento do osteossarcoma. Contudo, nos últimos 25 anos, não houve uma melhora significativa da sobrevida dos pacientes portadores de osteossarcoma. Houve muitas variações nos diversos protocolos, com mudanças tanto nas drogas, quanto no número delas, nas suas doses e nos seus regimes de administração. Mesmo assim, não se conseguiu avançar na melhora dos resultados. Foi atingido um platô do qual não se consegue sair.

Tendo este panorama histórico em mente, outros caminhos vêm sendo estudados nos últimos anos como alternativos, com o intuito de melhorar o resultado do tratamento do osteossarcoma. Um destes caminhos, considerado bastante promissor, é o das drogas antiangiogênicas, dentre as quais o bevacizumab (Avastin®), um anticorpo monoclonal anti-VEGF, foi uma das primeiras a ser comercializada.

Os estudos sobre angiogênese no osteossarcoma são bastante recentes. Prova disso é o fato de que o período de tempo entre o primeiro trabalho que estudou a expressão de VEGF como fator de prognóstico em pacientes com osteossarcoma (LEE, 1999), e a presente data (abril de 2010), é de apenas onze anos. Desde o estudo de LEE, publicado em julho de 1999, até o trabalho de LIN, publicado em março de 2010, 22 trabalhos estudaram o VEGF e sua relação com o prognóstico dos pacientes portadores de osteossarcomas (TABELA 4). Apenas

um deles não foi ainda publicado (MARINHO, tese de doutorado, UNIFESP, 2009). Destes 22, 15 utilizaram material de biópsia para pesquisar a expressão imunoistoquímica de VEGF (TABELA 26), metodologia semelhante ao atual estudo.

Antes de iniciarmos a comparação dos resultados do presente estudo com os da literatura, considero necessário primeiramente comparar as características das casuísticas do atual estudo com os diversos estudos com metodologia semelhante.

Em relação às características da casuística, podemos dizer que a idade média dos pacientes do atual estudo foi de 16 anos de idade, considerada relativamente baixa quando comparamos à idade média dos pacientes de outros estudos semelhantes. Excetuando-se o estudo de EK, 2006 (2), no qual foram selecionados apenas pacientes com idade acima dos 40 anos, quase todos os demais estudos apresentaram idades médias acima do presente estudo. As exceções foram os estudos de ODA, 2006, com 15 anos de idade média, e de MARINHO, 2009, com 15,4 anos de idade média. SULZBACHER, 2002, com 21 anos de média, JUNG, 2005, com 24 anos de idade média, e ABDEEN, 2009, com 22,1 anos de idade média são alguns exemplos. É interessante notar que dentre os dois estudos com idade média inferior à do atual, está o único estudo brasileiro da literatura selecionada com metodologia semelhante.

Além disso, quando dividimos os pacientes em até 20 anos de idade e acima de 20 anos de idade, pudemos notar que houve uma nítida tendência dos pacientes com idade acima de 20 anos apresentarem uma maior expressão de VEGF do que nos pacientes mais jovens (≤ 20 anos de idade). Dos nove pacientes com idade superior a 20 anos, cinco estavam no grupo de alta expressão de VEGF (55%), contra apenas nove dos 41 casos com idade abaixo ou igual a 20 anos (22%). O p foi de 0.056, ou seja, muito próximo da significância estatística adotada no presente estudo. O estudo de ZHOU, 2009, também comparou idades

até 20 anos e acima de 20 anos em relação à expressão de VEGF: dos 42 pacientes com idade até 20 anos, 31 apresentavam positividade para VEGF (72%), contra 16 dos 23 pacientes com idade acima de 20 anos (72%). Contudo, foram considerados positivos para VEGF os casos com expressão acima de 10% das células, ao contrário do presente estudo, onde consideramos 30% das células como corte para alta e baixa expressão (ZHOU, 2009). Apesar de não terem demonstrado significância estatística quando compararam a expressão de VEGF e idades acima e abaixo de 40 anos, EK, 2006 (1) ressaltaram que houve uma tendência de as expressões de CD-31 e CD-34, marcadores vasculares, estarem aumentadas no grupo com idade acima de 40 anos (EK, 2006(1)). Nos demais estudos, a grande maioria não correlacionou a idade com a expressão de VEGF. Os poucos que o fizeram não obtiveram correlação estatisticamente significativa. Um exemplo é o estudo de LIN, no qual os pacientes foram divididos em abaixo de 15 anos de idade e com 15 ou mais anos de idade ($p=0.798$) (LIN, 2010).

Se formos analisar a prevalência por gênero, vamos observar que no atual estudo houve predominância do sexo masculino, com 31 pacientes, contra apenas 19 do sexo feminino. Quando comparamos este dado com os outros 15 estudos com metodologia semelhante (TABELA 26), vemos que apenas em dois deles houve mais pacientes do sexo feminino do que masculino. Foram os estudos de MIZOBUCHI, 2008, E ABDEEN, 2009. Nos referidos estudos, observou-se respectivamente, 26 pacientes do sexo feminino e 22 do sexo masculino, e 28 do sexo feminino e 20 do sexo masculino. Nos outros 13 estudos houve predominância do sexo masculino. Nosso estudo acompanhou a maioria da literatura, com mais pacientes do sexo masculino.

Em relação à expressão de VEGF nos grupos masculino e feminino, observamos que, dos 31 pacientes do sexo masculino, 22 apresentavam baixa expressão de VEGF e nove apresentavam alta expressão (29%). Nas 19 pacientes do sexo feminino, 14 apresentavam baixa expressão de VEGF e cinco apresentavam alta expressão (26%). Não houve diferença estatisticamente

significante entre os dois grupos ($p=0.55$). LIN, 2010, também não obteve significância estatística quando comparou os gêneros com a expressão de VEGF: dos 29 pacientes do sexo masculino, 19 apresentaram expressão positiva para VEGF (65%). Similarmente, dos 27 pacientes do sexo feminino, 17 apresentaram positividade para VEGF (63%) ($p=0.968$). É importante ressaltar que no estudo de LIN, 2010, foram considerados como expressão positiva de VEGF os casos com mais de 10% das células positivas. No presente estudo, consideramos com alta expressão de VEGF os casos com mais de 30% das células positivas, assim como KAYA, 2000. Foi interessante notar que, no estudo no qual nos baseamos para definir como 30% o corte de alta e baixa expressão de VEGF, os autores obtiveram significância estatística quando compararam o gênero com a expressão de VEGF: dos 15 pacientes do sexo masculino, 12 apresentavam alta expressão de VEGF (80%), contra cinco dos 12 pacientes do sexo feminino (42%) ($p<0.05$) (KAYA, 2000).

Observamos também que a localização no membro inferior foi claramente predominante no presente estudo, com 42 casos, contra apenas oito localizados no membro superior. Comparando este dado com os estudos semelhantes, observamos que apenas nos estudos de EK, 2006 (1) e (2) houve mais casos no membro superior do que no membro inferior (TABELA 26). Como os dois estudos compartilham casos em comum, podemos considerar como uma única casuística para efeito de discussão. É importante frisar que, nos estudos nos quais houve casos no esqueleto axial, estes não foram considerados para efeito de comparação porque no presente estudo foram selecionados apenas casos localizados no esqueleto apendicular. Desta forma, o presente estudo mostrou, assim como a esmagadora maioria dos estudos, uma maior prevalência de casos no membro inferior. Um exemplo é o estudo de ZHOU, 2009, no qual 40 dos 65 casos estavam localizados no fêmur ou na tíbia (ZHOU, 2009).

Ao analisarmos os grupos de alta e baixa expressão de VEGF, observamos que os pacientes com tumores localizados no membro superior tiveram uma

tendência a apresentar alta expressão de VEGF. Dos oito casos localizados no membro superior, quatro apresentavam alta expressão de VEGF (50%). Por outro lado, dos 42 casos localizados no membro inferior, apenas 10 mostravam alta expressão de VEGF (24%). Contudo, o p foi de 0.14, o que configura uma relação estatisticamente não significativa. Novamente utilizando o estudo de ZHOU, 2009, como comparação, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os casos localizados nestes dois ossos e os demais ossos em relação à expressão de VEGF: 26 dos 40 casos localizados no fêmur ou na tíbia apresentaram expressão positiva de VEGF (65%), contra 19 dos 25 casos localizados em outros ossos (76%) ($p > 0.05$) (ZHOU, 2009). Outros estudos como SULZBACHER, 2002, HUANG, 2008, MIZOBUCHI, 2008 e LIN, 2010, também não mostraram correlação estatisticamente significativa entre localização do tumor (membro superior X membro inferior) e expressão de VEGF.

As demais características epidemiológicas estudadas também não mostraram correlação com a expressão de VEGF.

A variável que mais se aproximou de significância estatística foi o tipo de cirurgia. Sete pacientes dos 50 (14%) foram submetidos à amputação do membro acometido como tratamento cirúrgico inicial. Este índice de amputação é consistente com a maioria dos estudos norte americanos e europeus. Estudos como o de ROSSI, 2010, não apresentaram nenhum caso de amputação do membro em 16 casos. Alguns outros, em contrapartida, como o de BAJPAI, 2009, em estudo realizado na Índia, apresentaram taxa de amputação mais elevada do que o presente estudo: 26% (8/31).

Dos 43 casos submetidos a cirurgias preservadoras de membro, 14 (28%) apresentavam alta expressão de VEGF. Em contrapartida, nenhum dos sete casos submetidos inicialmente a amputação do membro acometido mostrava alta expressão de VEGF ($p = 0.084$).

É importante frisar que, no estudo desta variável, levamos em consideração apenas o procedimento cirúrgico inicial. Sabemos também que, dos dez casos que evoluíram com recidiva local, oito foram submetidos à amputação do membro, um recusou a cirurgia ablativa e outro já apresentava doença metastática muito avançada para se indicar a amputação do membro. Desta forma, tivemos oito casos que foram submetidos inicialmente a cirurgia preservadora de membro, evoluíram com recidiva local e foram amputados em um segundo tempo. Estes casos foram considerados como submetidos a cirurgias preservadoras de membro.

Outras variáveis como margem cirúrgica, tamanho do tumor e necrose pós quimioterapia não mostraram significância estatística quando relacionadas à expressão de VEGF.

Em relação à margem cirúrgica, dividimos os pacientes em margem cirúrgica microscópica livre e comprometida. Apenas seis dos 50 casos apresentaram margem cirúrgica microscópica comprometida (12%). Destes seis pacientes com margem cirúrgica comprometida, apenas um apresentava alta expressão de VEGF (17%). Já dos 44 pacientes operados com margem livre, 13 (30%) mostravam alta expressão de VEGF ($p=0.455$). A maioria dos estudos semelhantes não faz sequer menção da margem cirúrgica como variável a ser estudada em relação à expressão de VEGF. EK, 2006 (2) foram um dos poucos estudos que citaram margem cirúrgica. Contudo, não tiveram em nenhum dos 11 casos estudados margem cirúrgica comprometida, o que não permite a comparação em relação à expressão de VEGF.

O tamanho do tumor também não se mostrou correlacionado com a expressão de VEGF. Assim como preconiza o último estadiamento da AJCC (American Joint Committee on Cancer) (TABELA 1) (EDGE, 2009), dividimos os pacientes em portadores de tumores até 8 cm de extensão no maior eixo (T1), e

portadores de tumores maiores que 8 cm no maior eixo (T2). Não houve nenhum caso com *skip metastasis* (T3). Observamos que, dos 13 pacientes com tumores até 8 cm, cinco apresentavam alta expressão de VEGF (38%), contra apenas nove dos 37 pacientes com tumores acima de 8 cm de extensão (24%) ($p=0.264$). Houve, portanto, uma leve tendência de os tumores maiores apresentarem menor expressão de VEGF. MARINHO, 2009, mostrou que, dos 48 casos nos quais havia menção do tamanho do tumor no prontuário, 30 eram maiores ou iguais a 12 cm, e 18 menores do que 12 cm. Não há menção na tese do motivo pelo qual a autora utilizou 12 cm como corte para o tamanho do tumor. Mas suponho que tenha sido pelo fato de os pacientes se apresentarem com tumores de grandes dimensões no nosso país.

Utilizamos os critérios de Huvos para se avaliar a necrose pós quimioterapia (ROSEN, 1983). Os tumores são divididos em quatro grupos: até 50% de necrose (Huvos I), de 50 a 90% de necrose (Huvos II), acima de 90% de necrose (Huvos III) e 100% de necrose (Huvos IV). A necrose pós quimioterapia foi considerada baixa quando comparamos com os demais estudos. Considerando que seis dos 50 pacientes não realizaram quimioterapia neoadjuvante, tivemos 44 casos submetidos à avaliação da necrose pós quimioterapia. Todos os casos do presente estudo apresentaram apenas necrose abaixo de 90%, ou seja, Huvos I e II. Vinte e sete pacientes apresentaram tumores Huvos I e 17 Huvos II. Por este motivo, decidimos dividir os pacientes apenas em Huvos I (baixa necrose) e Huvos II (alta necrose). Dos 27 pacientes com necrose menor ou igual a 50%, nove (33%) mostravam alta expressão de VEGF. No grupo com necrose acima de 50%, dos 17 casos, cinco (29%) apresentavam alta expressão de VEGF ($p=0.528$). BAJPAI, 2009, reporta que em 21 dos 31 casos a necrose pós quimioterapia foi abaixo de 90%, ou seja, má resposta. Apenas 10 casos (33%) obtiveram boa resposta à quimioterapia. Já o estudo de HUANG, 2008, mostra 15 dos 31 casos (48%) com boa resposta à quimioterapia. Ocorre que, no estudo de HUANG, 2008, assim como na grande maioria dos estudos

(ABDEEN, 2009, ZHOU, 2009, ROSSI, 2010), a boa resposta ocorre quando a necrose pós quimioterapia é acima de 90%.

Não há explicação plausível para os baixos índices de necrose pós quimioterapia relatados no presente estudo. Peculiaridades geográficas ou sociais poderiam ser explicações. Contudo, na tese de doutorado de MARINHO, 2009, defendida na Unifesp, dos 50 pacientes incluídos no estudo, houve 24 casos Huvos I, seis casos Huvos II, 10 casos Huvos III e oito casos Huvos IV (em dois casos não havia informação disponível). Desta forma, houve 18 casos (36%) com necrose pós quimioterapia acima de 90%, ou seja, bons respondedores. Quando MARINHO, 2009, estudou a correlação da necrose pós quimioterapia com a expressão de VEGF, verificou que dos 30 casos com má resposta (Huvos I e II), nove (30%) apresentaram VEGF elevado. Por outro lado, dos 18 casos com boa resposta (Huvos III e IV), seis apresentavam alta expressão de VEGF ($p=1.000$). Ou seja, não houve qualquer correlação entre o grau de necrose e a expressão de VEGF.

Para se estudar as variáveis oncológicas propriamente ditas, como recidiva local, sobrevida global e sobrevida livre de doença, faz-se necessária a análise separada de cada variável.

Em relação à presença de recidiva local, houve 10 casos (20%) no período de seguimento dos pacientes. Pelas curvas de Kaplan-Meier, não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão de VEGF e a recidiva local ($p=0.814$). Quando analisamos simplesmente a presença ou não de recidiva local através do teste exato de Fisher, sem a variável tempo, observamos que, dos 10 pacientes que experimentaram recidiva local, três apresentavam alta expressão de VEGF (30%). No grupo de 40 pacientes sem recidiva local, 11 apresentavam alta expressão de VEGF (27%). Não houve correlação estatisticamente significativa, com p de 0.717.

Ao verificarmos a presença de recidiva local nos estudos semelhantes, observamos que em muitos deles não se faz nem sequer menção da incidência de recidiva local como variável (JUNG, 2005, MIZOBUCHI, 2008, ABDEEN, 2009, MARINHO, 2009). Nos trabalhos em que pudemos observar índices de recidiva local, obtivemos números parecidos com os do presente estudo. LEE, 1999 e LIN, 2010 observaram os mesmos 20% de recidiva local do atual estudo. ZHOU, 2009, apresentou 26% de recidiva local, e ROSSI, 2010, obteve 31% de recidiva local. Apenas dois trabalhos mostraram índices de recidiva local anormalmente baixos: SULZBACHER, 2002, com 5% (3/57), e EK, 2006 (2), com nenhum caso em 11 pacientes estudados.

Já em relação à sobrevida livre de doença, o presente estudo mostrou índice de 70% (35/50). Como foram incluídos apenas casos localizados nas extremidades, e todos os 10 casos de recidiva local foram manejados cirurgicamente, geralmente através de cirurgias ablativas, não houve nenhum caso vivo com doença, com recidiva local do tumor. Quando observamos as curvas de Kaplan-Meier de sobrevida livre de doença, notamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de alta e baixa expressão de VEGF ($p=0.314$). Contudo, quando comparamos os pacientes com metástase à distância com os sem evidência de doença pelo teste exato de Fisher, pudemos observar uma leve tendência de os pacientes que evoluíram com metástases à distância apresentarem alta expressão de VEGF. Dos 15 pacientes que evoluíram com metástases à distância no seguimento, seis apresentavam alta expressão de VEGF (40%). Por outro lado, dos 35 pacientes que não apresentaram metástases à distância, apenas oito mostravam alta expressão de VEGF (23%). Apesar de não ter havido significância estatística ($p=0.185$), nota-se uma tendência. Todos os pacientes com metástases à distância apresentavam metástases pulmonares, sendo que apenas um deles (caso 34) apresentava também metástase de partes moles na coxa contralateral (tumor primário no fêmur distal esquerdo). Quatro pacientes dos 15 com metástases pulmonares (27%) foram submetidos à

ressecção das metástases pulmonares, sendo um deles submetido a três procedimentos.

Finalmente, o atual estudo apresentou 86% (43/50) de sobrevida global. Dos 50 pacientes iniciais, 15 evoluíram com metástases à distância (30%) e sete foram a óbito (14%). Não obtivemos correlação estatisticamente significativa entre a expressão de VEGF e o óbito na análise das curvas de Kaplan-Meier ($p=0.679$). Ao observar o teste exato de Fisher para óbito versus expressão de VEGF, notamos que dos sete casos que foram a óbito, três (43%) apresentavam alta expressão de VEGF. Já nos 43 casos que estavam vivos na última avaliação, apenas 11 apresentavam alta expressão de VEGF (26%). Apesar de notarmos uma leve tendência de que os casos que foram a óbito tinham maior expressão de VEGF, não houve significância estatística ($p=0.384$). Este fato pode ser explicado parcialmente pelo fato de que a sobrevida global no nosso estudo foi de 86%, alta quando comparada aos demais estudos com metodologia semelhante (TABELA 26). Desta forma, como houve poucos óbitos, o poder estatístico diminuiu sobremaneira, dificultando a obtenção de significância estatística entre os dois grupos.

Quando comparamos o atual estudo com os demais em termos de sobrevida global, observamos que o índice de sobrevida global variou bastante, mais especificamente de 26% (ZHOU, 2009) a 84% (EK, 2006 (1)). Há explicações para este fenômeno.

No trabalho de ZHOU, 2009, por exemplo, dos 65 pacientes, 28 (43%) entraram no estudo já com doença metastática. Esta informação é fundamental na interpretação do índice de sobrevida global do referido estudo. O estudo de ODA, 2006 incluiu apenas pacientes com doença metastática pulmonar, ao contrário do presente estudo, que selecionou apenas pacientes sem metástases à distância. Na tese de doutorado de MARINHO, 2009 podemos observar que, dos 50 pacientes incluídos no estudo, 22 já apresentavam metástase à distância na apresentação (44%), o que certamente tem que ser levado em consideração na

comparação com o atual estudo. Se observarmos apenas os 28 casos não metastáticos de MARINHO, 2009, a sobrevida global deste subgrupo foi de 61%, acima dos 50% da casuística total do estudo.

Quando analisamos apenas os estudos que utilizam o material das biópsias, notamos que, dos 15 trabalhos (relatados nas TABELAS 26 e 27), dez mostram correlação positiva entre a alta expressão de VEGF e o mau prognóstico dos pacientes. Os demais cinco trabalhos, assim como o atual estudo, não mostraram significância estatística entre a alta expressão de VEGF e o mau prognóstico de sobrevida. Desta forma, temos 10 trabalhos que obtiveram significância estatística entre a alta expressão de VEGF no material de biópsia e o pior prognóstico dos pacientes, e seis trabalhos que não obtiveram tal correlação.

Apesar de o presente estudo estar dentro de uma minoria (seis em 16), temos que ter uma visão macroscópica da realidade da literatura atual. A visão global deste conjunto de trabalhos nos permite inferir que há, no mínimo, uma tendência a se acreditar que a alta expressão de VEGF no tecido tumoral é um fator de mau prognóstico nos pacientes portadores de osteossarcoma.

Certamente seria muito difícil, senão impossível, selecionar um número razoável de estudos com metodologia igual ou muito semelhante, a fim de se realizar uma metanálise. Este é o grande empecilho no avanço das normatizações de conduta em relação aos sarcomas. Por serem neoplasias muito mais raras do que os carcinomas, mesmo os escassos estudos cooperativos não apresentam número significativo de casos. A randomização torna-se difícil, o que limita em muito a interpretação das conclusões dos estudos.

TABELA 26: Revisão da literatura sobre a expressão do VEGF em material de biópsia de osteossarcoma. Estudo das características da casuística: idade média, gênero e localização anatômica

Primeiro autor e ano de publicação	Número de casos	Idade média (anos)	Gênero (M / F)	Localização anatômica (MS / MI)	Material pesquisado	Correlação com mau prognóstico
1 - Lee et al, 1999	30	ND	ND	ND	Biópsia	Positiva
2 - Kaya et al, 2000	27	24,9	14 / 13	5 / 21	Biópsia	Positiva
3 - Sulzbacher et al, 2002	57	21	36 / 21	4 / 49	Biópsia	Negativa
4 - Jung et al, 2005	25	24	20 / 5	2 / 22	Biópsia	Positiva
5 - Ek et al, 2006 (1)	25	26	15 / 10	9 / 8	Biópsia	Negativa
6 - Ek et al, 2006 (2)	11	58,3	9 / 2	8 / 2	Biópsia	Negativa
7 - Oda et al, 2006	30	15	18 / 12	3 / 26	Biópsia	Positiva
8 - Mizobuchi et al, 2008	48	21	22 / 26	5 / 31	Biópsia	Negativa
9 - Huang et al, 2008	31	23	22 / 9	4 / 27	Biópsia	Positiva
10 - Bajpai et al, 2009	31	17	25 / 6	ND	Biópsia + Tumor	Positiva
11 - Zhou et. al., 2009	65	18,5	35 / 29	ND	Biópsia	Positiva
12 - Abdeen et. al., 2009	48	22,1	20 / 28	8 / 28	Biópsia + Tumor + Metástase	Negativa
13 - Marinho, 2009 (TD)*	50	15,4	30 / 20	2 / 44	Biópsia	Positiva
14 - Rossi et. al., 2010	16	17,2	12 / 4	2 / 14	Biópsia + Tumor	Positiva
15 - Lin et. al., 2010	56	22,4	30 / 26	ND	Biópsia	Positiva
Presente estudo	50	16	31 / 19	8 / 42	Biópsia	Negativa

TABELA 27: Revisão da literatura sobre a expressão do VEGF em material de biópsia de osteossarcoma. Estudo das variáveis oncológicas: recidiva local, sobrevida global e sobrevida livre de doença

Primeiro autor e ano de publicação	Número de casos	Recidiva local	Sobrevida global	Sobrevida livre de doença	Material pesquisado	Correlação com mau prognóstico
1 - Lee et al, 1999	30	20% (6)	37% (11)	30% (9)	Biópsia	Positiva
2 - Kaya et al, 2000	27	ND	55% (15)	44% (12)	Biópsia	Positiva
3 - Sulzbacher et al, 2002	57	5% (3)	77% (44)	65% (37)	Biópsia	Negativa
4 - Jung et al, 2005	25	ND	80% (20)	68% (17)	Biópsia	Positiva
5 - Ek et al, 2006 (1)	25	ND	84% (21)	72% (18)	Biópsia	Negativa
6 - Ek et al, 2006 (2)	11	0% (0)	54% (6)	45% (5)	Biópsia	Negativa
7 - Oda et al, 2006	30	ND	27% (8)	23% (7)	Biópsia	Positiva
8 - Mizobuchi et al, 2008	48	ND	ND	ND	Biópsia	Negativa
9 - Huang et al, 2008	31	ND	ND	ND	Biópsia	Positiva
10 - Bajpai et al, 2009	31	ND	ND	ND	Biópsia + Tumor	Positiva
11 - Zhou et. al., 2009	65	26% (17)	26% (17)	ND	Biópsia	Positiva
12 - Abdeen et. al., 2009	48	ND	71% (34)	67% (32)	Biópsia + Tumor + Metástase	Negativa
13 - Marinho, 2009 (TD)*	50	ND	50% (25)	44% (22)	Biópsia	Positiva
14 - Rossi et. al., 2010	16	31% (5)	69% (11)	56% (9)	Biópsia + Tumor	Positiva
15 - Lin et. al., 2010	56	20% (11)	45% (25)	45% (25)	Biópsia	Positiva
Presente estudo	50	20%(10)	86%(43)	70% (35)	Biópsia	Negativa

Legendas das tabelas 25 e 26:

M: masculino

F: feminino

MS: membro superior

MI: membro inferior

ND: não descrito

TD: tese de doutorado

*: não publicada

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como foi dito ao final da introdução, o objetivo do presente estudo foi estudar a correlação entre a expressão do VEGF e o prognóstico dos pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades não metastáticos no que se refere à presença de recidiva local, à presença de metástase à distância e à sobrevida. O fato de não termos obtido, no atual estudo, correlação estatisticamente significativa entre a expressão de VEGF e quaisquer das variáveis oncológicas citadas não diminui em nada a importância dos resultados. Apenas enriquece mais a literatura pertinente ao assunto, a qual ainda é bastante escassa.

Num futuro próximo, através de um ensaio clínico prospectivo randomizado para a utilização do bevacizumab (Avastin®) em casos de osteossarcoma, pretendemos avaliar a real eficácia clínica e oncológica da droga neste grupo de pacientes. Apesar de sabermos que será um estudo de médio a longo prazo devido à raridade desta doença, só assim saberemos realmente se há ou não o benefício da utilização da droga. E, desta forma, veremos se vamos ou não conseguir subir mais um degrau no tratamento do osteossarcoma, o que ainda não foi alcançado desde o estudo de LINK em 1986, há 24 anos.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A expressão do VEGF não é fator de prognóstico de recidiva local, de doença metastática ou de sobrevida nos osteossarcomas primários não metastáticos do esqueleto apendicular.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

ABDEEN A, CHOU AJ, HEALEY JH, KHANNA C, OSBORNE TS, HEWITT SM, KIM M, WANG D, MOODY K, GORLICK R. Correlation between clinical outcome and growth factor pathway expression in osteogenic sarcoma. *Cancer* 115(22):5243-50,2009.

ARNDT CA, CRIST WM. Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N Engl J Med* 341:342-52,1999.

BAJPAI J, SHARMA M, SREENIVAS V, KUMAR R, GAMNAGATTI S, KHAN SA, RASTOGI S, MALHOTRA A, BAKHSHI S. VEGF expression as a prognostic marker in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 53(6):1035-9,2009.

BERSE B, BROWN LF, VAN DE WATER L, DVORAK HF, SENGER DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 3:211-20,1992.

BREMNES RM, CAMPS C, SIRERA R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer*. 51(2):143-58,2006.

CARMELIET P, JAIN RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-57,2000.

CHARITY RM, FOUKAS AF, DESHMUKH NS, GRIMER RJ. Vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma. *Clin Orthop Rel Res* 448:193-8,2006.

CHENG S, NAGANE M, HUANG H, CAVENEE WK. Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor

isoforms VEGF-121 e VEGF-165 but not VEGF-189. Proc Nat Acad Sci USA 94:12081-7,1997.

CRESSEY R, WATTANANUPONG O, LERTPRASERTSUKE N, VINITKETKUMNUEN U. Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumorigenesis. BMC Cancer 5:128-35,2005.

EDGE SB, BYRD DR, COMPTON CC, FRITZ AG, GREENE FL, TROTTI III A. AJCC Cancer Staging Manual. 7th edition. New York, NY: Springer, Part V, Chapter 27: Bone, p. 281-90,2009.

EK ET, OJAIMI J, KITAGAWA Y, CHOONG PF. Does the degree of intratumoral microvessel density and VEGF expression have prognostic significance in osteosarcoma? Oncology Reports 16:17-23,2006.

EK ET, OJAIMI J, KITAGAWA Y, CHOONG PF. Outcome of patients with osteosarcoma over 40 years of age: is angiogenesis a marker of survival? Int Semin Surg Oncol 3:7,2006.

EL-HOUSEINI ME, ABDEL-AZIM SA, EL-DESOUKY GI, ABDEL-HADY S, EL-HAMAD MF, KAMEL AM. Clinical significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in sera of patients with pediatric malignancies. J Egypt Natl Canc Inst. 16(1):57-61,2004.

ENNEKING WF, SPANIER SS, GOODMAN MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. Clin Orthop Relat Res. 153:106-20,1980.

FERRARA N, HOUCK KA, JAKEMAN LB, WINER J, LEUNG DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. J Cell Biochem 47:211-8,1991.

FERRARA N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 25:581-611,2004.

FOEKENS JA, PETERS HA, GREBENCHTCHIKOV N, LOOK MP, MEIJER-VAN GELDER ME, GEURTS-MOESPOT A, VAN DER KWAST TH, SWEEP CG, KLIJN JG. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer Res.* 61(14):5407-14,2001.

FUH G, GARCIS C, DE VOS AM. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1. *J Biol Chem* 275:26690-5,2000.

GERBER H AND FERRARA N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 65:671-80,2005.

GIMBRONE MA, LEAPMAN SB, COTRAN RS, FOLKMAN J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 136:261-76,1972.

GOLDMAN CK, KENDALL RL, CABRERA G, SOROCEANU L, HEIKE Y, GILLESPIE GY, SIEGAL GP, MAO X, BETT AJ, HUCKLE WR, THOMAS KA, CURIEL DT. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc Nat Acad Sci USA* 95:8795-800,1998.

HEFLER LA, MUSTEA A, KÖNSGEN D, CONCIN N, TANNER B, STRICK R, HEINZE G, GRIMM C, SCHUSTER E, TEMPFER C, REINTHALLER A, ZEILLINGER R.

Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 13(3):898-901,2007.

HOANG BH, DYKE JP, KOUTCHER JA, HUVOS AG, MIZOBUCHI H, MAZZA BA, GORLICK R, HEALEY JH. VEGF expression in osteosarcoma correlates with vascular permeability by dynamic MRI. *Clin Orthop Rel Res* 426:32-8,2004.

HOLMGREN L, O'REILLY MS, FOLKMAN J: Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1:149-53,1995.

HOLZER G, OBERMAIR A, KOSCHAT M, PREYER O, KOTZ R, TRIEB K. Concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the serum of patients with malignant bone tumors. *Med Pediatr Oncol* 36:601-4,2001.

HUANG Y, LIN Z, ZHUANG J, CHEN Y, LIN J. Prognostic significance of alpha V integrin and VEGF in osteosarcoma after chemotherapy. *Onkologie* 31(10):535-40,2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Censo Demográfico. <http://www.ibge.gov.br>,2000.

JACOBSEN J, GRANKVIST K, RASMUSON T, BERGH A, LANDBERG G, LJUNGBERG B. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU Int.* 93:297-302,2004.

JUNG ST, MOON ES, SEO HY, KIM JS, KIM GJ, KIM YK. Expression and significance of TGF- β isoform and VEGF in osteosarcoma. *Orthopedics*; 28:755-60,2005.

KAYA M, WADA T, AKATSUKA T, KAWAGUCHI S, NAGOYA S, SHINDOH M, HIGASHINO F, MEZAWA F, OKADA F, ISHII S. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6:572-7,2000.

KAYA M, WADA T, KAWAGUCHI S, NAGOYA S, YAMASHITA T, ABE Y, HIRAGA H, ISU K, SHINDOH M, HIGASHINO F, OKADA F, TADA M, YAMAWAKI S, ISHII S. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. *Br J Cancer* 86:864-9,2002.

KAYA M, WADA T, NAGOYA S, KAWAGUCHI S, ISU K, YAMASHITA T. Concomitant tumour resistance in patients with osteosarcoma. A clue to a new therapeutic strategy. *J Bone Joint Surg Br* 86(1):143-7,2004.

KAYA M, WADA T, NAGOYA S, SASAKI M, MATSUMURA T, YAMASHITA T. The level of vascular endothelial growth factor as a predictor of a poor prognosis in osteosarcoma. *J Bone Joint Surg Br* 91:784-8,2009.

KIM KJ, LI B, WINER J, ARMANINI M, GILLETT N, PHILLIPS HS, FERRARA N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362:841-4,1993.

KIRKWOOD BR, STERN, AC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, USA. p.502.,2006.

KLEINBAUM DG. *Survival analysis: a self-learning text*. 1st Ed. New York: Springer. 324p.,1996.

KREUTER M, BIEKER S, BIELACK SS, AURAS T, BUERGER H, GOSHEGER G, JURGENS H, BERDEL WE, MESTERS RM. Prognostic relevance of increased angiogenesis in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 10:8531-7,2004.

LEE YH, TOKUNAGA T, OSHIKA Y, SUTO R, YANAGISAWA K, TOMISAWA M, FUKUDA H, NAKANO H, ABE S, TATEISHI A, KIJIMA H, YAMAZAKI H, TAMAOKI N, UEYAMA Y, NAKAMURA M. Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur J Cancer* 35:1089-93,1999.

LIN F, ZHENG SE, SHEN Z, TANG LN, CHEN P, SUN YJ, ZHAO H, YAO Y. Relationships between levels of CXCR4 and VEGF and blood-borne metastasis and survival in patients with osteosarcoma. *Med Oncol*. Mar 27,2010. [Epub ahead of print]

LINK MP, GOORIN AM, MISER AW, GREEN AA, PRATT CB, BELASCO JB, PRITCHARD J, MALPAS JS, BAKER AR, KIRKPATRICK JA, ET AL. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med*. Jun 19;314(25):1600-6,1986.

MAEDA T, KAWANE T, HORIUCHI N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology* 144:681-92,2003.

MARCOVE RC, MIKÉ V, HAJEK JV, LEVIN AG, HUTTER RV. Osteogenic sarcoma under the age of twenty-one. A review of one hundred and forty-five operative cases. *J Bone Joint Surg Am*. 52(3):411-23, 1970.

MARINHO LC. Estudo do fator de crescimento endotelial vascular e da densidade de microvasos em osteossarcomas humanos. Tese de doutorado, UNIFESP, Escola Paulista de Medicina, 2009.

MEYERS PA, GORLICK R. Osteosarcoma. *Pediatr Clin North Am* 44:973-89,1997.

MIYAKE H, MURAMAKI M, KURAHASHI T, YAMANAKA K, HARA I. Urinary levels of vascular endothelial growth factor in patients with prostate cancer as a predictor of disease progression. *Anticancer Res.* 25(5):3645-9,2005.

MIKULIC D, ILIC I, CEPULIC M, ORLIĆ D, GILJEVIĆ JS, FATTORINI I, SEIWERTH S. Tumor angiogenesis and outcome in osteosarcoma. *Pediatr Hematol Oncol* 21:611-9,2004.

MIZOBUCHI H, GARCIA-CASTELLANO JM, PHILIP S, HEALEY JH, GORLICK R. Hypoxia markers in human osteosarcomas: an exploratory study. *Clin Orthop Relat Res* 466:2052-9,2008.

ODA Y, YAMAMOTO H, TAMIYA S, MATSUDA S, TANAKA K, YOKOYAMA R, IWAMOTO Y, TSUNEYOSHI M. CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis. *Mod Pathol* 19:738-45,2006.

PARK HR, MIN K, KIM HS, JUNG WW, PARK YK. Expression of vascular endothelial growth factor-C and its receptor in osteosarcomas. *Pathol Res Pract.* 204(8):575-82,2008.

PELES E, LIDAR Z, SIMON AJ, GROSSMAN R, NASS D, RAM Z. Angiogenic factors in the cerebrospinal fluid of patients with astrocytic brain tumors. *Neurosurgery*. 55(3):562-7; discussion 567-8,2004.

PETRILLI AS. Experiência brasileira em osteossarcoma: fatores prognósticos e impacto na sobrevida. Tese de Livre-Docência, UNIFESP, Escola Paulista de Medicina, 2005.

PEYROMAURE M, CAMPARO P, BADOUAL C, DESCAZEAUD A, DINH-XUAN AT. The expression of vascular endothelial growth factor is associated with the risk of cancer progression after radical prostatectomy. *BJU Int*. 99(5):1150-3,2007.

PRESTA LG, CHEN H, O'CONNOR SJ, CHISHOLM V, MENG YG, KRUMMEN L, WINKLER M, FERRARA N. Humanization of an antivascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57(20):4593-9,1997.

ROSEN G, TAN C, SANMANEECHAI A, BEATTIE EJ JR, MARCOVE R, MURPHY ML. The rationale for multiple drug chemotherapy in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer*. Mar;35(3 suppl):936-45,1975.

ROSEN G, MURPHY ML, HUVOS AG, GUTIERREZ M, MARCOVE RC. Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer*. Jan;37(1):1-11,1976.

ROSEN G, MARCOVE RC, HUVOS AG, CAPARROS BI, LANE JM, NIRENBERG A, CACAVIO A, GROSHEN S. Primary osteogenic sarcoma: eight-year experience with adjuvant chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 106 Suppl:55-67,1983.

ROSSI B, SCHINZARI G, MACCAURO G, SCARAMUZZO L, SIGNORELLI D, ROSA MA, FABBRICIANI C, CARLO B. Neoadjuvant multidrug chemotherapy including High-Dose Methotrexate modifies VEGF expression in Osteosarcoma: an immunohistochemical analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 16;11:34,2010.

RUTKOWSKI P, KAMINSKA J, KOWALSKA M, RUKA W, STEFFEN J. Cytokine and cytokine receptor serum levels in adult bone sarcoma patients: correlations with local tumor extent and prognosis. *J Surg Oncol* 84:151-9,2003.

SCAPPATICCI FA: Mechanisms and future directions for angiogenesis based cancer therapies. *J Clin Oncol* 20:3906-27,2002.

SORENSEN FB, JENSEN K, VAETH M, HAGER H, FUNDER AM, SAFWAT A, KELLER J, CHRISTENSEN M. Immunohistochemical estimates of angiogenesis, proliferative activity, p53 expression, and multiple drug resistance have no prognostic impact in osteosarcoma: a comparative clinicopathological investigation. *Sarcoma*, Article ID 874075,14 pages,2008.

SULZBACHER I, BIRNER P, TRIEB K, LANG S, CHOTT A. Expression of osteopontin and vascular endothelial growth factor in benign and malignant bone tumors. *Virchows Arch* 441:345-9,2002.

VERMEULEN PB, GASPARINI G, FOX SB, TOI M, MARTIN L, MCCULLOCH P, PEZZELLA F, VIALE G, WEIDNER N, HARRIS AL, DIRIX LY. Quantification of

angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 32A (14):2474-84,1996.

WANG JJ, ZHANG SX, LU K, CHEN Y, MOTT R, SATO S, MA J. Decreased expression of pigment epithelium-derived factor is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes* 54:243-50,2005.

WARREN RS, YUAN H, MATLI MR, GILLETT NA, FERRARA N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 95:1789-97,1995.

WEISS KR, COOPER GM, JADLOWIEC JA, MCGOUGH III RL, HUARD J. VEGF and BMP expression in mouse osteosarcoma cells. *Clin Orthop Rel Res* 450:111-7,2006.

YANG S, YU H, KRYGIER JE, WOOLEY PH, MOTT MP. High VEGF with rapid growth and early metastasis in a mouse osteosarcoma model. *Sarcoma*, Article ID 95628, 7 pages,2007.

ZHOU Q, ZHU Y, DENG Z, LONG H, ZHANG S, CHEN X. VEGF and EMMPRIN expression correlates with survival of patients with osteosarcoma. *Surg Oncol*, Oct 14 2009 [Epub ahead of print].

LISTA DAS TABELAS E DAS FIGURAS

LISTA DAS TABELAS E DAS FIGURAS

A - TABELAS

TABELA 1: ESTADIAMENTO DA AJCC PARA TUMORES ÓSSEOS MALIGNOS

TABELA 2: REGULADORES DA ANGIOGÊNESE

TABELA 3: FAMÍLIA DOS VEGFS

TABELA 4: REVISÃO DA LITERATURA SOBRE A EXPRESSÃO DO VEGF NO
OSTEOSSARCOMA

TABELA 5: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA

TABELA 6: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: GÊNERO

TABELA 7: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA

TABELA 8: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: TIPO DE CIRURGIA

TABELA 9: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: MARGEM CIRÚRGICA

TABELA 10: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: TAMANHO DO TUMOR

TABELA 11: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: NECROSE PÓS
QUIMIOTERAPIA

TABELA 12: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: PRESENÇA DE RECIDIVA
LOCAL

TABELA 13: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: PRESENÇA DE METÁSTASE À DISTÂNCIA

TABELA 14: CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: STATUS ONCOLÓGICO FINAL

TABELA 15: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA FAIXA ETÁRIA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 16: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO GÊNERO SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 17: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 18: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO TIPO DE CIRURGIA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 19: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA MARGEM CIRÚRGICA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 20: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO TAMANHO DO TUMOR SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 21: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA NECROSE PÓS QUIMIOTERAPIA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF.

COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 22: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA PRESENÇA DE RECIDIVA LOCAL SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF.

COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 23: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DA PRESENÇA DE METÁSTASE À DISTÂNCIA SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF.

COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 24: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO ÓBITO SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 25: DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA, ABSOLUTA E RELATIVA (%), DO STATUS ONCOLÓGICO SEGUNDO A EXPRESSÃO DE VEGF. COMPARAÇÃO PELO TESTE EXATO DE FISHER ($\alpha = 0,05$)

TABELA 26: REVISÃO DA LITERATURA SOBRE A EXPRESSÃO DO VEGF EM MATERIAL DE BIÓPSIA DE OSTEOSSARCOMA. ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS DA CASUÍSTICA: IDADE MÉDIA, GÊNERO E LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA

TABELA 27: REVISÃO DA LITERATURA SOBRE A EXPRESSÃO DO VEGF EM MATERIAL DE BIÓPSIA DE OSTEOSSARCOMA. ESTUDO DAS VARIÁVEIS ONCOLÓGICAS: RECIDIVA LOCAL, SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

LISTA DAS TABELAS E DAS FIGURAS

B - FIGURAS

FIGURA 1: TIPOS DE VEGF E INTERAÇÃO COM SEUS RECEPTORES

FIGURA 2: ISOFORMAS DO VEGF (SETAS INDICAM AS MAIS EXPRESSADAS E ESTUDADAS)

FIGURA 3: CASO NÚMERO 27, COM EXPRESSÃO DE VEGF DE 18% (AUMENTO DE 400X)

FIGURA 4: CASO NÚMERO 26, COM EXPRESSÃO DE VEGF DE 52% (AUMENTO DE 400X)

FIGURA 5: CURVAS DE KAPLAN-MEIER DE SOBREVIDA GLOBAL PARA OS GRUPOS 1 (BAIXA EXPRESSÃO DE VEGF) E 2 (ALTA EXPRESSÃO DE VEGF).

FIGURA 6: CURVAS DE KAPLAN-MEIER DE RECIDIVA LOCAL PARA OS GRUPOS 1 (BAIXA EXPRESSÃO DE VEGF) E 2 (ALTA EXPRESSÃO DE VEGF).

FIGURA 7: CURVAS DE KAPLAN-MEIER DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA PARA OS GRUPOS 1 (BAIXA EXPRESSÃO DE VEGF) E 2 (ALTA EXPRESSÃO DE VEGF).
