

EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS VEGF E HER-2 EM BIÓPSIAS DE OSTEOSSARCOMA

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF VEGF AND HER-2 PROTEINS IN OSTEOSARCOMA BIOPSIES

RICARDO GEHRKE BECKER¹, CARLOS ROBERTO GALIA¹, SANDRA MORINI², CRISTIANO RIBEIRO VIANA²

RESUMO

Objetivos Identificar a prevalência de HER-2 e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em biópsias de osteossarcoma e correlacioná-los com possíveis fatores de prognóstico. Métodos: Estudo retrospectivo realizado no Hospital de Câncer de Barretos-SP incluindo 27 biópsias de osteossarcoma imuno-histoquimicamente coradas para VEGF e HER-2. Características clínico-patológicas foram coletadas dos prontuários médicos dos pacientes para correlação com marcadores. Resultados: Em 27 biópsias, quatro foram superexpressas para VEGF e três para HER-2. Dois terços dos pacientes eram não metastáticos. Quase todos os pacientes com VEGF superexpresso apresentaram metástases. A superexpressão para HER-2 apresentou relação inversa à presença de metástases. Não houve associação significativa entre os marcadores e o prognóstico. Conclusão: Identificamos baixa prevalência de VEGF e HER-2 na amostra. Não houve associação significativa entre superexpressão dos marcadores e características clínico-patológicas. A ampliação da amostra e do tempo de seguimento, além do emprego de novas técnicas laboratoriais pode determinar a real expressão de VEGF e HER-2 e seu papel em osteossarcomas. **Nível de Evidência III, Estudo de Caso-controle.**

Descritores: Fator A de crescimento do endotélio vascular. Genes HER-2. Osteossarcoma. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

*Objectives: To identify the prevalence of erbB-2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in osteosarcoma biopsies and to correlate them with possible prognosis factors. Methods: Retrospective study conducted at the Hospital do Câncer de Barretos-SP including 27 osteosarcoma biopsies immunohistochemically stained for VEGF and erbB-2. The pathological characteristics were collected from medical records of patients to correlate with markers. Results: In 27 biopsies, four overexpressed VEGF and three overexpressed erbB-2. Two thirds of patients had no metastases. Almost all patients with overexpression of VEGF showed metastases. Overexpression of erbB-2 was inversely related to the presence of metastases. There was no significant association between markers and prognosis. Conclusion: We identified a low prevalence of erbB-2 and VEGF in the sample. There was no significant association between overexpression of markers and pathological features. A larger sample and a longer follow-up, in addition to using new laboratory techniques can determine the real expression of VEGF and erbB-2 and its role in osteosarcoma. **Level of Evidence III, Case-Control Study.***

Keywords: Vascular endothelial growth factor A. Genes, erbB-2. Osteosarcoma. Immunohistochemistry.

Citação: Becker RG, Galia CR, Morini S, Viana CR. Expressão imuno-histoquímica das proteínas VEGF e HER-2 em biópsias de osteossarcoma. Acta Ortop Bras. [online]. 2013;21(4):233-8. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Becker RG, Galia CR, Morini S, Viana CR. Immunohistochemical expression of VEGF and HER-2 proteins in osteosarcoma biopsies. Acta Ortop Bras. [online]. 2013;21(4):233-8. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Osteossarcoma é um tipo de câncer ósseo agressivo de origem mesenquimal geralmente encontrado em jovens entre 10 e 25 anos. Qualquer osso do corpo humano pode ser acometido por esta neoplasia e a sobrevida geral em cinco anos é de aproximadamente 65 a 75%. A principal causa de óbito são as metástases pulmonares, diagnosticadas por tomografia computadorizada (TC) em 35 a 45% dos pacientes.¹ Diversos protocolos foram desen-

volvidos nas últimas décadas incluindo quimioterapia em altas doses e novas técnicas para ressecções com margem oncológica e reconstruções preservadoras de extremidades. Apesar da evolução no campo da oncologia, a busca por melhores resultados em curvas de sobrevida ainda continua sendo um desafio, principalmente em pacientes portadores de metástases.²⁻⁵ O crescimento tumoral depende da proliferação de novos vasos sanguíneos em seu interior, os quais estão diretamente e indireta-

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1. Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.
2. Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, SP, Brasil.

Trabalho realizado no Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – UFRGS – Porto Alegre, RS, Brasil.
Correspondência: Rua Ramiro Barcelos 2350, Térreo - Zona 10 (Sala de Gesso). 91035.095 – Porto Alegre, RS, Brasil. ricardogbecker@hotmail.com

mente relacionados à liberação de diversos fatores de crescimento tanto pelo tumor primário quanto pelas lesões metastáticas decorrentes. A identificação de marcadores tumorais tem sido motivo de pesquisas com o objetivo de identificar e estratificar pacientes com alto ou baixo risco para desenvolvimento de metástases. A superexpressão do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e do Receptor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER-2) tem evidenciado resultados conflitantes com relação ao prognóstico em portadores de osteossarcoma.⁴⁻¹⁰

O fator de crescimento do endotélio Vascular (VEGF) é uma proteína homodimérica que aumenta a permeabilidade endotelial vascular e estimula a proliferação de células endoteliais. Esta proteína está diretamente envolvida no processo de angiogênese, que é responsável pela neovascularização, crescimento tumoral e disseminação de metástases. A neovascularização é evidente em amostras histológicas de osteossarcomas clássicos, o que reflete a agressividade e o potencial metastático deste tipo de câncer.^{4,9,11} Em tumores do aparelho gastrointestinal como o carcinoma gástrico, os tumores esofágicos e os carcinomas colorretais, a superexpressão de VEGF sugere relação direta com pior prognóstico. No entanto, evidências clínicas ainda não estão bem estabelecidas entre a expressão deste marcador de angiogênese e sobrevida em portadores de osteossarcoma.^{2,4,5}

O oncogene HER-2 (ErbB-2 ou neu) é o responsável pela codificação de uma glicoproteína transmembrana chamada HER-2, que está superexpressa em 20 a 40% dos pacientes portadores de câncer de mama, sendo associada ao pior prognóstico.¹² Este marcador biológico também tem sido relacionado à menor sobrevida, má resposta à quimioterapia e à presença de metástases em alguns estudos envolvendo o osteossarcoma.^{6,8-10}

Esta coorte histórica tem o objetivo de identificar a prevalência de VEGF e HER-2 em biópsias de osteossarcoma anteriores à quimioterapia e correlacionar a superexpressão destes marcadores a características clínico-patológicas envolvidas com o prognóstico.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes e amostras histológicas

Neste estudo retrospectivo 27 pacientes com osteossarcoma tiveram seus prontuários médicos revisados e suas biópsias coradas para VEGF e HER-2. As amostras pertenciam a pacientes diagnosticados entre os anos de 2005 e 2009. Todas as amostras foram fixadas em formalina 10%, incluídas em blocos de parafina e armazenadas no departamento de patologia do Hospital de Câncer de Barretos - Brasil. Os critérios para inclusão foram pacientes de ambos os sexos, com idade entre 5 e 30 anos, diagnóstico de osteossarcoma sem tratamento prévio, além de presença ou ausência de metástases. A violação no protocolo de tratamento foi considerada critério de exclusão do estudo. Características clínico-patológicas como idade, sexo, subtipo histológico, término do protocolo, resposta à quimioterapia neoadjuvante e a presença de metástases foram analisados e tabulados. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (CEP #195/2009).

Técnica de imuno-histoquímica

Todas as amostras foram incluídas em blocos de parafina e submetidas a cortes de 2 a 3 micra em micrótomo padronizado e coradas imuno-histoquimicamente pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase. O anticorpo primário para VEGF foi um anticorpo anti-humano monoclonal de ratos em diluição de 1:50 (DakoCytomation, Denmark, A/S), e para HER-2, o anticorpo anti-humano policlonal de coelhos em diluição de 1:200 (DakoCi-

tomation, Denmark, A/S). A recuperação antigênica foi realizada através da incubação em calor úmido em tampão de citrato (Dako – 10 mM, pH 9,0 e 90°C). A amplificação da reação foi realizada no Dakoautostainer (Universal Staining System – Dako). Os controles positivos e negativos foram utilizados para cada teste.

Avaliação imuno-histoquímica

Dois patologistas (SM e CRV) analisaram as amostras de osteossarcomas sem qualquer informação sobre o histórico dos pacientes e utilizaram um microscópio de duas cabeças binoculares simultaneamente. Frequências quase similares de porcentagem de células coradas foram encontradas nas lâminas por ambos profissionais com índice *kappa* menor que 5%. VEGF foi considerado positivo quando corados mais de 30% tanto do citoplasma quanto da membrana das células tumorais⁴. HER-2 foi avaliado através de escala semi-quantitativa. As amostras foram graduadas de 0 (zero) até +3 de acordo com a proporção de células coradas tanto no citoplasma quanto na membrana. Resultados de zero a +1 foram considerados como até 30% das células coradas e, de +2 até +3, como acima de 30%. Apenas a coloração de imuno-histoquímica acima de 30% foi classificada como superexpressão de HER-2.^{8,13}

Análise estatística

Todas as variáveis foram descritas por frequências absolutas e relativas, exceto a idade que foi descrita por média e desvio padrão. Para comparar os grupos foi aplicado o teste *t student* (idade) e o teste exato de Fisher (demais variáveis). Para estimar as curvas de sobrevida, o método de Kaplan-Meier foi aplicado e para compará-las foi utilizado o teste log-rank. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa PEPI (*Programs for Epidemiologists*) versão 4.0 e baseado no estudo de Kaya et al.⁴, 2000. Para um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), um poder de 90%, uma proporção de sobrevida de 90% no grupo VEGF negativo e uma proporção de 20% no grupo de VEGF positivo, obteve-se um total mínimo de 22 pacientes. As análises foram realizadas no programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0.

RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2. Quinze pacientes eram do sexo masculino e 12 do sexo feminino, com média de idade de 13 anos (sete a 27 anos). Os casos foram divididos em acima ($n=21$) e abaixo ($n=6$) de 14 anos considerando como um maior ou menor risco de agressividade do tumor. Treze indivíduos concluíram o protocolo brasileiro (GBTO), nove permaneciam em tratamento durante este estudo³ e cinco não dispunham de dados nos prontuários. Todos osteossarcomas foram estadiados em IIB e III de acordo com o *Sistema de Estadiamento de Enneking*.¹⁴ Oito pacientes (30%) apresentaram metástases pulmonares no momento do diagnóstico e foram classificados como estágio III. Nenhum paciente apresentou descreção de metástases não pulmonares.

Os subtipos histológicos foram descritos de acordo com a OMS - Classificação de Tumores Ósseos, 2002.¹⁵ A classificação de Huvos-Ayala foi utilizada para descrever a resposta à quimioterapia neoadjuvante como pobre (I-II) e boa (III-IV).¹⁶ Mais da metade dos pacientes (56%) apresentaram pobre resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, 22% apresentaram boa resposta e outros 22% não apresentaram registros de exames anatomopatológicos. A Tabela 1 descreve todas variáveis clínico-patológicas analisadas. O intervalo de seguimento foi registrado desde a biópsia inicial até julho de 2009. O período mínimo de seguimento foi de seis meses.

Tabela 1. Significância das variáveis comparadas à expressão de VEGF.

Variáveis	Amostra total (n=27)	VEGF negativo (n=23)	VEGF positivo (n=4)	Valor-p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Faixa etária				0,545**
≤ 14	6 (22,2)	6 (26,1)	0 (0,0)	
> 14	21 (77,8)	17 (73,9)	4 (100)	
Sexo				0,106**
Masculino	15 (55,6)	11 (47,8)	4 (100)	
Feminino	12 (44,4)	12 (52,2)	0 (0,0)	
Subtipo histológico				0,554*
Osteoblástico	13 (48,1)	11 (47,8)	2 (50,0)	
Teleangiectásico	4 (14,8)	4 (17,4)	0 (0,0)	
Condroblástico	3 (11,1)	2 (8,7)	1 (25,0)	
Fibroblástico	3 (11,1)	2 (8,7)	1 (25,0)	
Indiferenciado	4 (13,8)	4 (17,4)	0 (0,0)	
Metástase				0,065**
Sim	8 (29,6)	5 (21,7)	3 (75,0)	
Não	19 (70,4)	18 (78,3)	1 (25,0)	
Resposta à QT (Huvos-Ayala)				0,053*
Pobre (I-II)	15 (55,6)	15 (65,2)	0 (0,0)	
Boa (III-IV)	6 (22,2)	4 (17,4)	2 (50,0)	
N.D.	6 (22,2)	4 (17,4)	2 (50,0)	
Protocolo completo				0,531*
Sim	13 (48,1)	11 (47,8)	2 (50,0)	
Não	9 (33,3)	7 (30,4)	2 (50,0)	
N.D.	5 (18,5)	5 (21,7)	0 (0,0)	

Legenda: N.D. = Não determinado; VEGF = Fator de crescimento do endotélio vascular.* teste qui-quadrado de Pearson; ** teste exato de Fisher.

Tabela 2. Significância das variáveis comparadas à expressão de HER-2.

Variáveis	Amostra total (n=27)	HER-2 negativo (n=24)	HER-2 positivo (n=3)	Valor-p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Faixa etária				0,545**
≤ 14	6 (22,2)	5 (20,8)	1 (33,3)	
> 14	21 (77,8)	19 (79,2)	2 (66,7)	
Sexo				0,231**
Masculino	15 (55,6)	12 (50,0)	3 (100)	
Feminino	12 (44,4)	12 (50,0)	0 (0,0)	
Subtipo histológico				0,686*
Osteoblástico	13 (48,1)	11 (45,8)	2 (66,7)	
Teleangiectásico	4 (14,8)	4 (16,7)	0 (0,0)	
Condroblástico	3 (11,1)	3 (12,5)	0 (0,0)	
Fibroblástico	3 (11,1)	3 (12,5)	0 (0,0)	
Indiferenciado	4 (13,8)	3 (12,5)	1 (33,3)	
Metástase				1,000**
Sim	8 (29,6)	7 (29,2)	1 (33,3)	
Não	19 (70,4)	17 (70,8)	2 (66,7)	
Resposta à QT (Huvos-Ayala)				0,003*
Pobre (I-II)	15 (55,6)	15 (62,5)	0 (0,0)	
Boa (III-IV)	6 (22,2)	6 (25,0)	0 (0,0)	
N.D.	6 (22,2)	3 (12,5)	3 (100)	
Protocolo completo				0,758*
Sim	13 (48,1)	12 (50,0)	1 (33,3)	
Não	9 (33,3)	8 (33,3)	1 (33,3)	
N.D.	5 (18,5)	4 (16,7)	1 (33,3)	

Legenda: N.D. = Não determinado; HER-2 = Fator de crescimento epidermal tipo 2.* teste qui-quadrado de Pearson; ** teste exato de Fisher.

Apenas quatro amostras (15%) apresentaram superexpressão de VEGF. Todas as amostras positivas para VEGF foram encontradas no sexo masculino, e acima de 14 anos. Três quartos (75%) dos pacientes que superexpressaram VEGF apresentaram metástases pulmonares, inferindo um risco teórico para pior prognóstico já descrito em publicações prévias.^{4,7} A Tabela 1 sumariza a correlação entre VEGF e as variáveis analisadas. Não encontramos correlação significativa quando realizadas análises descritiva e univariada. Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para VEGF estão descritas na Figura 1. A superexpressão de HER-2 foi observada em três casos (11%). Todos do sexo masculino, e dois (67%), acima de 14 anos. Metástases pulmonares foram identificadas em apenas um terço dos pacientes com HER-2 considerados positivos (>1+). As amostras coradas como positivas para HER-2 não apresentavam descrição sobre resposta à quimioterapia em nossos arquivos médicos. Não encontramos correlação significativa quando realizadas análises descritiva e

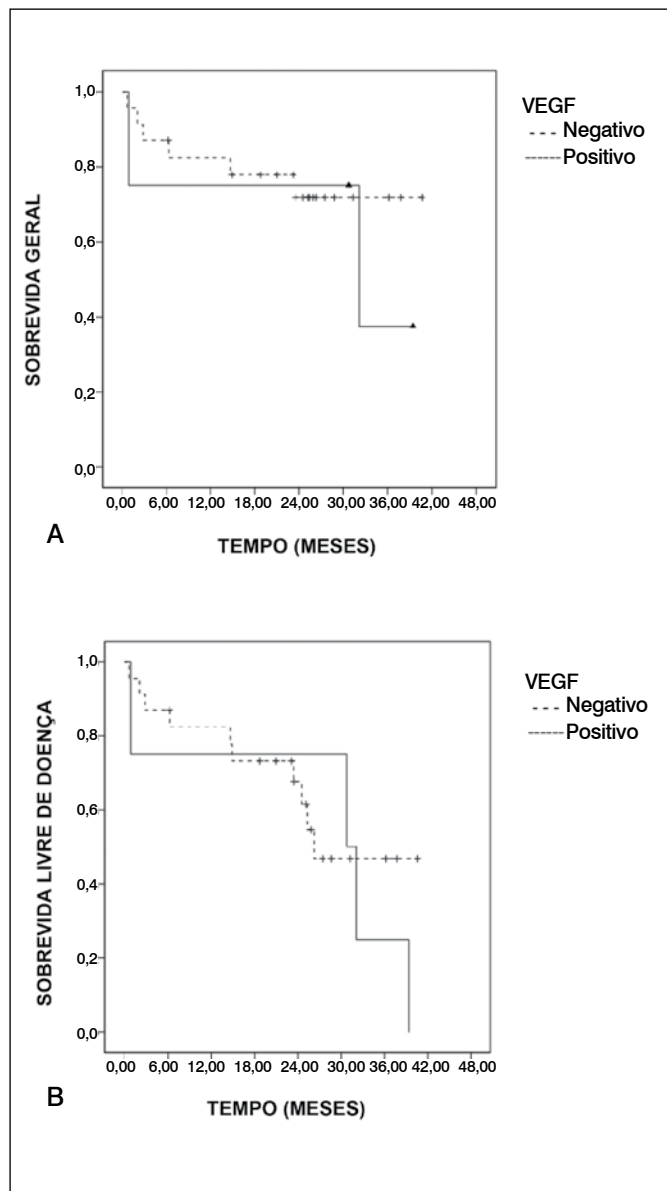


Figura 1. Curva de Kaplan-Meier para (A) sobrevida geral e (B) sobrevida livre de doença para casos positivos de VEGF comparados com negativos.

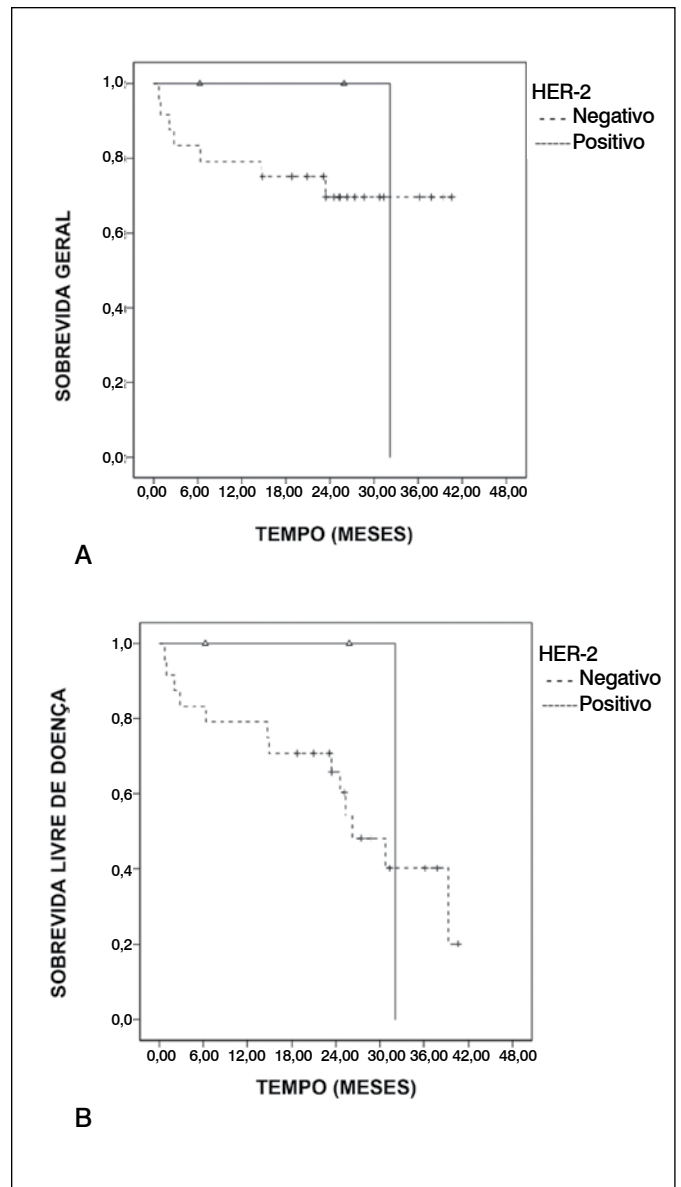


Figura 2. Curva de Kaplan-Meier para (A) sobrevida geral e (B) sobrevida livre de doença para casos positivos de HER-2 (ErbB-2) comparados com negativos.

univariada. Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para HER-2 estão descritas na Figura 2. Imuno-histoquímica de VEGF é demonstrada na Figura 3A. Imuno-histoquímica de HER-2 é demonstrada na Figura 3B.

DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstrou-se a baixa prevalência de VEGF (15%) e HER-2 (11%) em biópsias de osteossarcoma analisadas através de imuno-histoquímica. Diferentes métodos para quantificar a presença de marcadores biológicos teoricamente envolvidos na proliferação e disseminação de tumores têm sido descritos nas últimas décadas. Testes laboratoriais como a imuno-histoquímica, pesquisa de DNA e de RNA estão entre os mais conhecidos. Diferenças entre protocolos de pesquisa incluindo uma grande variedade de anticorpos e de técnicas sem padronização para a identificação de genes são responsáveis pela discrepância em estudos ao redor do mundo.^{15,17}

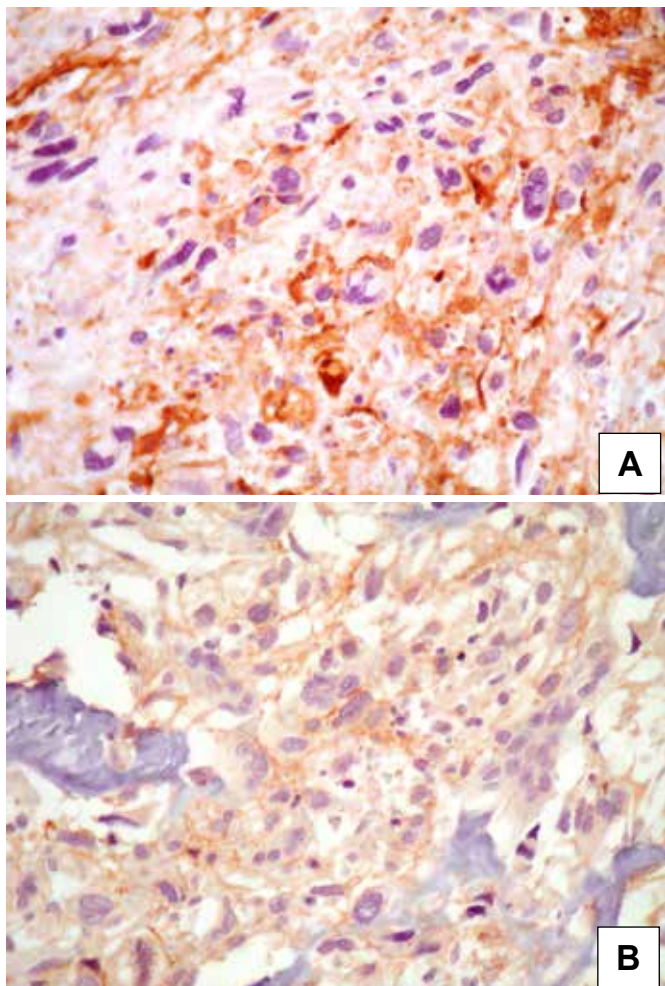


Figura 3. Fotomicrografia de (A) osteossarcoma com positividade citoplasmática de VEGF (400X) e fotomicrografia de (B) osteossarcoma com positividade de membrana de HER-2 (400X).

Desde que o DNA complementar do HER-2 foi isolado há aproximadamente 25 anos, vieram à tona importantes descobertas no mecanismo de ação dos receptores de tirosinoquinases (RTQ), que quando mutados ou alterados, tornam-se potentes oncoproteínas. Em 1985, o grupo de Ullrich da Genentech descreveu a estrutura primária completa de suposto RTQ que demonstrou alto grau de homologia com o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) humano, tendo sido denominado de *human EGFR-related 2*, ou HER2 (17). Dois anos mais tarde, Slamon *et al.*¹² relataram que o HER2 encontrava-se amplificado em 30% dos casos de câncer de mama invasivos e, pela primeira vez, demonstraram correlação significativa entre a superexpressão de HER2, redução da sobrevida e recidiva tumoral aumentada.

No final dos anos 90, dois estudos sugeriram que a superexpressão de HER-2 em osteossarcoma poderia estar associada à menor sobrevida e ao desenvolvimento de metástases. Em um destes estudos, 26 amostras de osteossarcomas foram analisadas para HER-2 através de imuno-histoquímica, e a superexpressão de HER-2 foi identificada em 42% das amostras. No entanto, os pacientes metastáticos foram incluídos na mesma amostra e os protocolos de quimioterapia não foram adequadamente descritos. Por fim, pacientes em estágios IIB e III deveriam ter sido analisados

separadamente para HER-2, pois é de conhecimento geral que o prognóstico de indivíduos metastáticos (III) é inferior ao dos não metastáticos (IIB).⁶ Em outro estudo, 53 amostras de osteossarcomas foram analisadas, enquanto todos pacientes portadores de metástases (estágio III) foram excluídos. Nem dados à respeito da sobrevida geral, nem qualquer descrição sobre análises uni ou multivariadas foram descritos.¹⁰

Em 2002, Akatsuka *et al.*⁸ propuseram diferente explicação para a associação entre a superexpressão de HER-2 e os achados clínicos em osteossarcoma, comparando os níveis de HER-2 entre amostras de biópsias, de tumores ressecados após a quimioterapia neoadjuvante e de metástases pulmonares em 19 pacientes não metastáticos ao diagnóstico. O desaparecimento de HER-2 foi visível durante o tratamento com quimioterapia em 14 de 19 pacientes (74%) a medida que se tornaram metastáticos. Estes achados sugerem que a superexpressão de HER-2 não tem um papel importante no desenvolvimento de metástases, e que tumores onde o HER-2 é superexpresso existirá maior benefício com a quimioterapia em relação à sobrevida geral e livre de doença quando comparados aos com HER-2 negativo.

A expressão de VEGF tem sido utilizada como um marcador mais objetivo para avaliar a importância da angiogênese em tumores sólidos como o osteossarcoma. Um estudo com 30 pacientes identificou que o mRNA de VEGF estava expresso em todas as amostras tumorais, e em 80% na isoforma de VEGF165. Apenas 20% expressava a isoforma VEGF121. 83% dos VEGF165-positivos desenvolveram metástases, enquanto o mesmo ocorreu em apenas 16% dos VEGF165-negativos. Nos mesmos grupos, VEGFR-1 e 2 (receptores tipo 1 e 2 de VEGF) foram expressos em mais da metade dos pacientes, porém a expressão não se correlacionou com o prognóstico. Os indivíduos deste estudo não haviam sido submetidos a tratamento prévio e também não apresentavam metástases ao diagnóstico, e o VEGF foi analisado através da reação em cadeia de polimerase transcriptase (RT-PCR).^{7,18}

Em outro estudo, 63% de 27 pacientes expressaram VEGF através de imuno-histoquímica. Oitenta e dois por cento das amostras onde o VEGF foi positivo desenvolveram metástases, enquanto apenas 10% nas amostras onde VEGF foi negativo. Como esperado, a sobrevida nos indivíduos com VEGF positivo foi menor que a dos negativos.⁴ Um grupo de pesquisas norte-americano descreveu em 2004 a possível relação entre a expressão de VEGF em biópsias de osteossarcoma e o nível de permeabilidade vascular através de ressonância nuclear magnética (RNM) em 15 pacientes. Dez amostras coraram-se positivas à imuno-histoquímica, sendo quatro com 1+, outras quatro com 2+, e mais duas com 3+.

Qualquer positividade tanto em citoplasma quanto em membrana foi considerada. O único achado significativo entre VEGF superexpresso e alto coeficiente de permeabilidade foi possível quando as amostras foram estratificadas, ou seja, avaliadas separadamente (0, 1+, 2+, 3+) de acordo com o número de cruzes.¹⁹ Uma metanálise incluindo 387 pacientes em 11 publicações identificou taxa de risco de 2,84 para VEGF positivos em relação ao risco de óbito quando comparados aos VEGF negativos. Estes achados, apesar da heterogeneidade das publicações incluídas, sugerem pior prognóstico para biópsias onde VEGF apresentou-se superexpresso.²⁰

Em nosso estudo, além da baixa prevalência dos marcadores imunológicos, foi apresentada de maneira descritiva uma tendência à presença de metástases em portadores de osteossarcoma com VEGF positivo e HER-2 negativo. Não foi encontrada correlação significativa entre HER-2 e VEGF quanto à sobrevida geral e livre

de doença, assim como das variáveis clínico-patológicas. Apesar de ainda não existir consenso na literatura, a positividade de VEGF e a negatividade de HER-2 têm sugerido piores resultados na evolução desta doença.

CONCLUSÃO

A superexpressão das proteínas de VEGF e HER-2 demonstrou baixa prevalência, sendo de apenas 11% e 15%, respectiva-

mente. Apesar da adequada metodologia empregada, estes resultados encontram-se no limite inferior das publicações vigentes. Nossos achados, apesar da limitada significância, colocam em discussão a real prevalência de VEGF e HER-2 e sua possível associação com o prognóstico. O aumento do tamanho da amostra e do período de seguimento podem fornecer mais informações a respeito da relevância destes marcadores em portadores de osteossarcoma.

REFERÊNCIAS

1. Unni KK. Osteossarcoma. In: Unni KK, editor. *Dahlin's bone tumors*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 122-57.
2. Kaya M, Wada T, Kawaguchi S, Nagoya S, Yamashita T, Abe Y, et al. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. *Br J Cancer*. 2002;86(6):864-9.
3. Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, et al; Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol*. 2006;24(7):1161-8.
4. Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2000;6(2):572-7.
5. DuBois S, Demetri G. Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma. *Cancer*. 2007;109(5):813-9.
6. Onda M, Matsuda S, Higaki S, Iijima T, Fukushima J, Yokokura A, et al. ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer*. 1996;77(1):71-8.
7. Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, Suto R, Yanagisawa K, Tomisawa M, et al. Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur J Cancer*. 1999;35(7):1089-93.
8. Akatsuka T, Wada T, Kokai Y, Kawaguchi S, Isu K, Yamashiro K, et al. ErbB2 expression is correlated with increased survival of patients with osteosarcoma. *Cancer*. 2002;94(5):1397-404.
9. Akatsuka T, Wada T, Kokai Y, Sawada N, Yamawaki S, Ishii S. Loss of ErbB2 expression in pulmonary metastatic lesions in osteosarcoma. *Oncology*. 2001;60(4): 361-6.
10. Gorlick R, Huvos AG, Heller G, Aledo A, Beardsley GP, Healey JH, et al. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1999;17(9):2781-8.
11. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer*. 1998;77(6): 956-64.
12. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
13. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET, Koerner F, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med*. 1994;330(18):1260-6.
14. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 1980;(153):106-20.
15. Fletcher CDM, Unni KK, *Mertens F*, editors. *Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press; 2002.
16. Huvos AG. *Bone tumors: diagnosis, treatment, and prognosis*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1991.
17. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. 1985; 230(4730):1132-9.
18. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist*. 2000;5 (Suppl 1):3-10.
19. Hoang BH, Dyke JP, Koutcher JA, Huvos AG, Mizobuchi H, Mazza BA, et al. VEGF expression in osteosarcoma correlates with vascular permeability by dynamic MRI. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(426):32-8.
20. Qu JT, Wang M, He HL, Tang Y, Ye XJ. The prognostic value of elevated vascular endothelial growth factor in patients with osteosarcoma: a meta-analysis and systemic review. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(5):819-25.