



**Título:** A expressão de fatores relacionados à migração celular (Anfirregulina e IMP-3) em Encondromas e Condrossarcomas grau 1

**Autores:**

Acadêmico: André Luiz da Cruz Ribeiro

Mestranda: Daniele Moraes Losada

Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

## I) INTRODUÇÃO

Dentre os tumores cartilagosos, o Condroma ocupa o segundo lugar em frequência, contribuindo com cerca de 3% a 10% de todos os tumores ósseos e de 10% a 25% de todas as neoplasias ósseas benignas ressecadas cirurgicamente (1-3). Por serem lesões assintomáticas são, em geral, achados incidentais ao exame radiológico; o que acaba subestimando sua real incidência na população (2-3). Localiza-se, mais frequentemente, na metáfise ou diáfise de ossos longos e nos ossos curtos tubulares das mãos e dos pés (1-3). Apresenta distribuição etária variável, com pico de incidência entre a 3ª e a 4ª décadas de vida, sem distinção quanto aos sexos (3). Histologicamente apresentam cartilagem madura, arquitetura lobular, baixa celularidade e distribuição uniforme. São constituídos por condrócitos típicos com núcleos pequenos e escuros, semelhantes a condrócitos normais.

Dentre os tumores ósseos malignos primários, o Condrossarcoma é o segundo em frequência (3). É definido como um tumor produtor de matriz condróide. Os Condrossarcomas Centrais Convencionais são histologicamente graduados em: grau I, também denominado Tumor Cartilaginoso Atípico (baixo grau), grau II (grau intermediário / moderado) e grau III (alto grau). Esta classificação baseia-se nos parâmetros morfológicos: tamanho e hiper cromatismo nucleares, celularidade e índice mitótico (4-5). Do ponto de vista morfológico, o CS I caracteriza-se por: densidade celular moderada, composta por condrócitos de pequenos núcleos exibindo cromatina homogênea sobre matriz variando de condróide a mixóide. Pode apresentar frequentes focos de calcificação e raras células binucleadas (5).

A distinção entre Encondromas e CS 1 pode ser difícil. Estas são entidades nosológicas histologicamente semelhantes, porém com comportamento biológico distinto. A diferença biológica fundamental entre um CS 1 e um Encondroma se traduz no potencial limitado de crescimento do Encondroma em comparação com o

padrão de crescimento lento, porém contínuo, e localmente invasivo do Condrossarcoma grau 1 (3). A localização da lesão é um parâmetro clínico muito importante: lesões da cartilagem envolvendo pequenos ossos das mãos e dos pés são, no geral, benignas; enquanto que as lesões cartilaginosas das costelas, esterno e ossos chatos (i.e.: pélvis e escápula) frequentemente são agressivas (5). A presença de dor, aumento de volume e idade acima dos 45 anos são parâmetros clínicos que favorecem malignidade.

Em neoplasias cartilaginosas, várias vias de sinalização oncogênica são implicadas na tumorigênese e/ou progressão tumorais como, por exemplo, as relacionadas à migração celular, por intermédio das proteínas IMP3 e Anfiregulina. A seguir, uma descrição destas proteínas.

### **Proteína de ligação ao mRNA do fator de crescimento II semelhante à insulina (IMP3):**

Membro da família oncofetal de proteínas, desempenha importante papel no tráfego e estabilização de mRNA, crescimento e migração celulares durante as fases iniciais da embriogênese (6) (7). Além disso, contribui para o desenvolvimento do câncer, através da formação de estruturas celulares semelhantes aos podossomos. Estas estruturas se relacionam à extensão da matriz extracelular e destruição da matriz circundante, aumentando a capacidade invasiva de células malignas. Estudos recentes correlacionam a expressão de IMP3 com o comportamento biológico agressivo tumoral em diversos tipos de carcinoma tais como pancreático, de células renais além de adenocarcinoma pulmonar, entre outros.(7) Chen e colaboradores encontraram diferentes padrões de expressão de IGF2 e IMP3 em osteossarcomas convencionais, parosteais e periosteais.(6) Chen e colaboradores (6) observaram que a superexpressão de IMP3 correlaciona-se com alto grau histológico em Condrossarcomas e que pode facilitar a progressão tumoral.

### **Anfiregulina (AR):**

Membro da família do fator de crescimento epidérmico (EGF), é sintetizado como um precursor transmembrana. No desenvolvimento ósseo normal a Anfiregulina interfere no processo de migração celular. Valores elevados desta proteína relacionam-se a maior incidência de metástases através do aumento da expressão de Integrinas. As Integrinas constituem uma

família de glicoproteínas transmembranares heterodiméricas que permitem interações célula-célula ou célula-matriz. Tem sido demonstrado o aumento de sua expressão em diversos tipos de carcinomas: colorretal, mama, ovário, entre outros.(8) Estudos envolvendo Condrossarcomas Convencionais mostraram que a expressão e sinalização aumentadas de Integrinas relacionam-se com a migração, invasão e metástase de células cancerígenas.(9) Estudo prévio desenvolvido em cancer de pulmão postulou que a Anfiregulina é capaz de ativar a expressão do hormônio PTHrP, contribuindo para metástases osteolíticas.(10) Em estudo desenvolvido por Chen e colaboradores (8) a expressão de Anfiregulina correlacionou-se positivamente com o grau histológico de Condrossarcomas.

## II) OBJETIVOS

### Objetivo geral:

Avaliar as vias de progressão tumoral relacionadas à migração celular em Encondromas e Condrossarcomas Centrais Convencionais grau I.

### Objetivos Específicos:

Avaliar os Encondromas e Condrossarcomas Centrais Convencionais grau I quanto:

- a) a imunoexpressão de IMP3
- b) a imunoexpressão de Anfiregulina;
- b) a correlação da expressão de IMP3 e Anfiregulina com os achados clínicos, histológicos e evolutivos.

### Análise Qualitativa

A análise qualitativa se baseou na intensidade da imunorreação, e foi estratificada em três categorias, para cada anticorpo (**Tabela 1**): 0 (negativo/nenhuma expressão), 1 (fraco: castanho-claro), 2 (forte: castanho-escuro) (figura 10).

**Tabela 1:** Escore de intensidade

Escore de intensidade (EI)	Intensidade
0	Negativo/Sem marcação
1	Castanho-claro
2	Castanho-escuro

### Análise Quantitativa

De acordo com quantidade de células contadas em cada lâmina, foi estabelecido um escore de porcentagem de célula tumorais imunorreativas estratificadas da seguinte forma: 0 (0%), 1 (0 a 10%), 2 (10 a 50%), 3 (>50%) (**Tabela 2**).

**Tabela 2:** Escore de porcentagem

Escore de Porcentagem	Porcentagem de células positivas
0	0%
1	0 a 10%
2	10 a 50%
3	>50%

### Escore Final de Imunorreatividade

O Escore Final de Imunorreatividade (EFI) foi obtido multiplicando-se o Escore de Intensidade (EI) e o Escore de Porcentagem (EP). A interpretação dos valores finais de EFI foram classificadas da seguinte maneira: Negativo (valor = 0), Baixo (valores: 1, 2 e 3) e Alto (valores: 4 e 6) (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Escore Final de Imunorreatividade

EFI	EI x EP
Negativo	0
Baixo	1 a 3
Alto	4 e 6

## III) RESULTADOS

Foram evidenciados 31 pacientes com diagnóstico de Encondroma e 28 pacientes com diagnóstico de Condrossarcoma convencional Grau 1 (CS 1). A idade, ao diagnóstico, variou de 9 a 83 anos (média: 38,93). Dentre os pacientes com Encondroma a média de idade foi de 31,58 (entre 9 e 61 anos) e entre os com CS 1 apresentaram média de idade de 47,07 (entre 18 e 83 anos). À comparação, a idade média, ao diagnóstico, entre os pacientes com Encondroma foi menor que entre os pacientes com CS 1.

Quanto ao gênero, 38 eram homens (64,4% dos casos) e 21 eram mulheres (35,6%). Eram do sexo feminino 20 (64,5%) dos pacientes com Encondroma, ao passo que 11 (35,5%) eram do sexo masculino. Em relação ao CS 1, 18 eram do gênero feminino (64,3%), enquanto 10 eram do gênero masculino (35,7%).

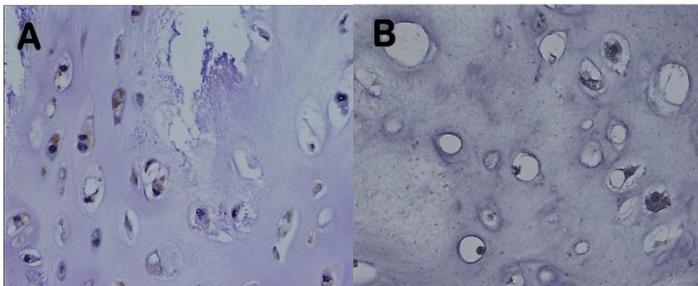
### Anticorpo IMP3 – caracterização da casuística

Vinte e cinco casos de Encondroma (80,6%) estavam localizados em ossos curtos de extremidades e seis (19,4%) estavam em ossos longos. Nenhum dos casos de Encondroma estava localizado em ossos chatos. Os CS 1 apresentavam a seguinte distribuição topográfica: 24 casos (85,7%) em ossos longos e 4 casos (14,3%) em ossos chatos. Não foi diagnosticado CS 1 em ossos curtos de extremidades. Dois pacientes apresentaram evolução clínica desfavorável, relacionada à CS 1 (recidiva local: n = 1; óbito: n = 1). Nenhum dos

pacientes com Encondroma apresentou evolução clínica desfavorável.

### Análise Imunoistoquímica do anticorpo IMP3

Cinco dos casos analisados exibiram positividade para o anticorpo IMP3, dos quais três correspondem à Encondroma e dois à CS 1. Todos estes casos foram classificados com Escore de Intensidade 1, (castanho-claro). Demais casos (54) não apresentaram qualquer expressão do anticorpo. Seguem abaixo exemplos de casos com imunoposição positiva para o anticorpo IMP3 (**Figura 1**):



**Figura 1:** Anticorpo IMP3 (400x). Ambas classificadas como Escore de Intensidade 1 (castanho-claro). As imagens: “A” representa um corte histológico de Encondroma e a “B” um Condrossarcoma Grau 1.

Dos casos positivos, dois foram contabilizados e classificados com o escore de porcentagem 2 (entre 10 e 50% de positividade), ao passo que 3 casos foram considerados escore 3 (mais de 50% de positividade para o anticorpo).

Todos os 5 casos apresentaram Escore Final de Imunorreatividade (EI X EP) igual a 1 (baixo).

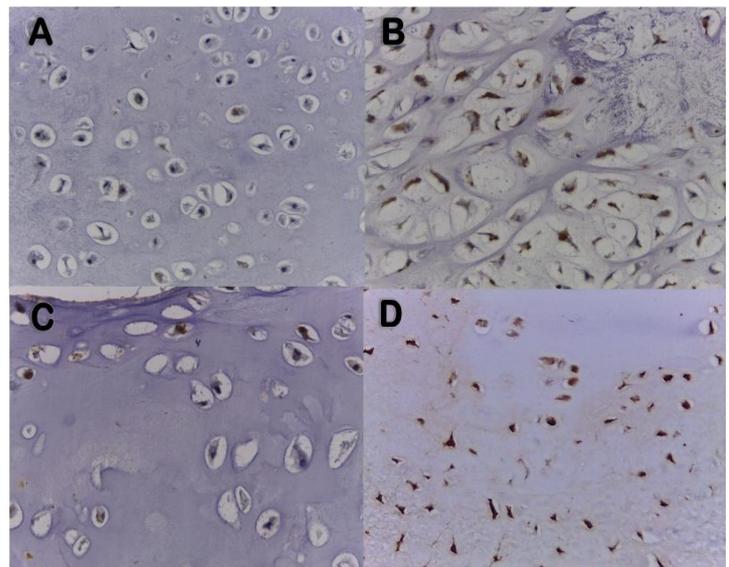
### Anticorpo Anfirregulina – caracterização da casuística

Vinte e cinco casos de Encondroma (80,60%) estavam localizados em ossos curtos de extremidades e seis (19,40%) estavam em ossos longos. Nenhum dos casos de Encondroma estava localizado em ossos chatos. CS 1 estavam localizados em ossos longos (25 casos, 89,3%) e chatos (3 casos, 10,7%). Não foi diagnosticado CS 1 em ossos curtos de extremidades.

Um paciente apresentou evolução clínica desfavorável, relacionada à CS Convencionais de grau 1 (recidiva local: n = 1) Nenhum dos pacientes com Encondroma apresentou sinal de mau prognóstico, neste estudo.

### Análise Imuno-histoquímica do anticorpo Anfirregulina

Vinte e um dos casos apresentaram positividade para o anticorpo Anfirregulina, sendo 15 Encondromas e seis CS1. Dentre esses casos, 8 deles foram classificados com o Escore de Intensidade 1, (castanho-claro). Outros 13 foram considerados positivos com Escore de Intensidade 2 (castanho-escuro). Em 38 lâminas não foi detectada qualquer expressão do anticorpo (Escore de Intensidade 0). Segue abaixo casos com imunoposição positiva do anticorpo Anfirregulina (**Figura 2**):



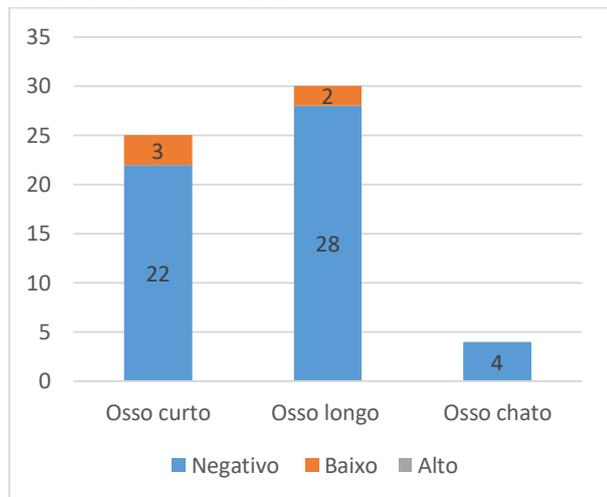
**Figura 2:** Anticorpo Anfirregulina (400x). “A” e “B” exemplos de Encondromas. “A” com Escore de Intensidade 1 (castanho-claro) e “B” Escore de intensidade 2 (castanho-escuro). “C” e “D” representam Condrossarcomas Grau 1. “C” com Escore de intensidade 1, enquanto “D” Escore de Intensidade 2.

Todos os 21 casos apresentaram Escore de Porcentagem 3 (mais de 50% de células positivas para o imunomarcador).

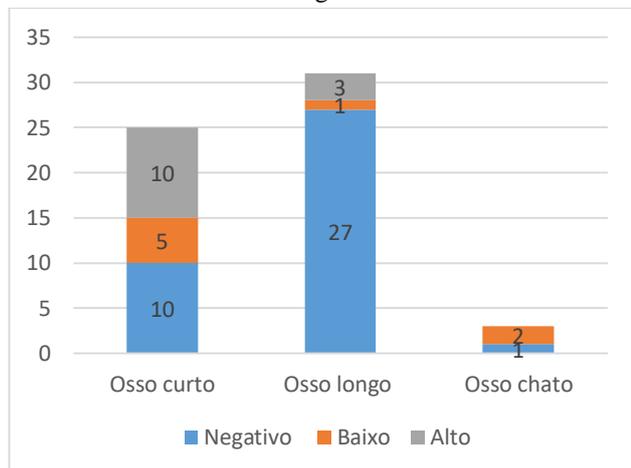
Oito casos foram classificados com Escore Final de Positividade (EFI) igual a 1 (baixo), sendo 5 Encondromas e 3 CS1; enquanto 13 resultaram em EFI 2 (Alto), sendo 10 Encondromas e 3 CS1.

Observar a distribuição quanto à topografia das lesões e o Escore Final de Imunorreatividade (EFI) para cada anticorpo testado (IMP3 e Anfirregulina), o que pode ser notado, respectivamente, nos **gráficos 1 e 2**.

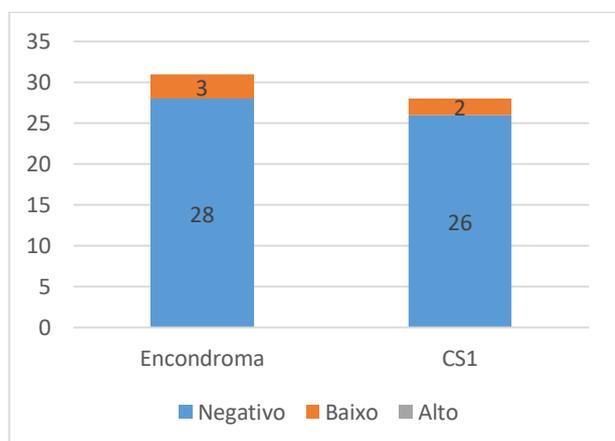
**Gráfico 1:** Topografia da lesão X Escore Final de Imunorreatividade do IMP3



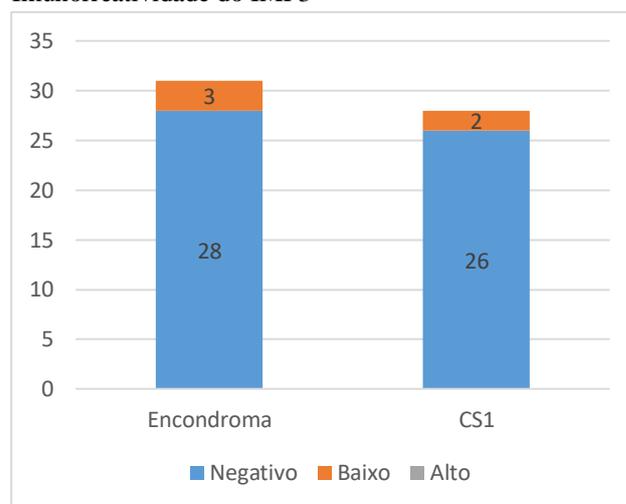
**Gráfico 2:** Topografia das lesões X Escore Final de Imunorreatividade da Anfirregulina



A distribuição das lesões quanto ao diagnóstico (Encondroma e CS1) e sua relação com o Escore Final de Imunorreatividade para cada imunomarcador (IMP3 e Anfirregulina), está demonstrada, respectivamente, nos gráficos 3 e 4.



**Gráfico 4:** Classificação tumoral x Escore Final de Imunorreatividade do IMP3



#### IV) CONCLUSÃO:

Ambos os marcadores (IMP3 e Anfirregulina) são expressos em Encondromas e CS1. O anticorpo IMP3 não se mostrou útil para distinguir Encondroma de CS1. A Anfirregulina parece ser um imunomarcador promissor nesta distinção, contudo é necessária análise estatística completa para melhor interpretação dos resultados e conclusão mais acurada.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nascimento A. ANÁLISE COMPARATIVA DE FATORES DE CRESCIMENTO E TRANSCRIÇÃO DA PLACA EPIFISÁRIA (SOX-9, RUNX-2, Ihh, PTHrP) E EXPRESSÃO DE FATOR MODULADOR DE APOPTOSE (BCL-2) EM TUMORES CARTILAGINOSOS BENIGNOS E MALIGNOS. CORRELAÇÃO COM ACHADOS CLÍNICOEVOLUTIVOS E MORFOL. Universidade Estadual de Campinas; 2017.
2. C.D.M. Fletcher, K. Unni FM. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. Cancer. 2002;177(3):1365–76.
3. Czerniak B. Dorfman and Czerniak's bone tumors No Title. 2nd ed. Elsevier; 2016.
4. Amstalden E. Tumores do sistema osteoarticular. In: Billis A, Altemani AMA, Andrade LALA E, editor. Patologia diagnóstica de tumores. 3rd ed. 2017. p. 415–39.

5. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW MF. World Health Organization classification of tumors of soft tissue and bone. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2013.

6. Chen P, Wang SJ, Wang HB, Ren P, Wang XQ, Liu WG, et al. The distribution of IGF2 and IMP3 in osteosarcoma and its relationship with angiogenesis. *J Mol Histol.* 2012;43(1):63–70.

7. Shooshtarizadeh T, Nazeri A, Zare-Mirzaie A, Movahedinia S. Expression of insulin-like growth factor II mRNA binding protein 3 (IMP3) in enchondroma and chondrosarcoma. *Pathol Res Pract* [Internet]. 2016;212(4):335–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2016.02.006>

8. Chen J-C, Chen Y-J, Lin C-Y, Fong Y-C, Hsu C-J, Tsai C-H, et al. Amphiregulin enhances alpha6beta1 integrin expression and cell motility in human chondrosarcoma cells through Ras/Raf/MEK/ERK/AP-1 pathway. *Oncotarget* [Internet]. 2015;6(13):11434–46. Available from: <http://oncotarget.com/abstract/3397>

19. Chen JC, Fong YC, Tang CH. Novel strategies for the treatment of chondrosarcomas: Targeting integrins. *Biomed Res Int.* 2013;2013.

10. Gilmore JL, Gonterman RM, Menon K, Lorch G, Riese DJ, Robling A, et al. Reconstitution of Amphiregulin-Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Lung Squamous Cell Carcinomas Activates PTHrP Gene Expression and Contributes to Cancer-Mediated Diseases of the Bone. *Mol Cancer Res* [Internet]. 2009;7(10):1714–28. Available from: <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-09-0131>