

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

STEFANIE SAYURI SANTOS OISHI

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO
EXOMA NA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES CANDIDATOS E
BIOMARCADORES PARA TUMORES ÓSSEOS PRIMÁRIOS**

BOTUCATU-SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO
EXOMA NA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES CANDIDATOS E
BIOMARCADORES PARA TUMORES ÓSSEOS PRIMÁRIOS**

STEFANIE SAYURI SANTOS OISHI

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi

Coorientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

BOTUCATU-SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Oishi, Stefanie Sayuri Santos.

Aplicação da técnica de sequenciamento completo do exoma na identificação de novos genes candidatos e biomarcadores para tumores ósseos primários / Stefanie Sayuri Santos Oishi. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biotecnologia de Botucatu
Orientador: Marcelo Razera Baruffi
Coorientador: Ester Silveira Ramos
Capes: 20205007

1. Marcadores bioquímicos. 2. Neoplasias Ósseas. 3. Sequenciamento do Exoma.

Palavras-chave: Biomarcadores; Tumor ósseo primário; WES.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a Amora por todo o amor, carinho e dedicação ao longo da minha vida, e apoio incondicional a todos os meus maiores sonhos. Vocês são fundamentais na minha trajetória e pela minha chegada até aqui.

À minha família, meu namorado, meus avós, tios e tias, pelos conselhos, apoio e cuidado durante estes anos. Mesmo que muitas vezes à distância, compartilhar a minha vida com vocês é uma alegria.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Razera Baruffi e à coorientadora Profa. Dra. Ester Ramos pela orientação, ensinamentos, conselhos e oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Certamente levarei todos os aprendizados comigo para onde for.

À todas as moradoras da República MinaMora, por serem minha casa e companhia durante estes quatro anos, e por tornarem a vivência universitária mais leve e especial. Obrigada por me acolherem com tanto carinho e proporcionarem tantos momentos juntas, com aprendizados, amizade, alegria e amor.

Aos meus amigos de Botucatu por compartilharem todos os momentos da graduação e fazerem deles mais leves e alegres. Aos projetos que fiz parte, Meninas na Ciência, Congrebio e CVU Brasil, nos quais tive oportunidade de conhecer pessoas incríveis e pude me desenvolver profissionalmente.

Por fim, aos profissionais da UNESP Botucatu, em especial do Instituto de Biociências, por proporcionarem um ambiente repleto de oportunidades através da transmissão de conhecimento.

RESUMO

Os tumores ósseos primários são caracterizados por um aglomerado de células anormais gerado pelo crescimento celular exagerado e ausente de controle, que resulta em uma alteração no equilíbrio tecidual e invasão de tecidos adjacentes. Atualmente, este conjunto de tumores representa menos de 1% dos cânceres diagnosticados a cada ano, ainda assim, contribuem de modo significativo para o elevado índice de mortalidade e morbidade da população mundial, uma vez que, estes tumores possuem mecanismos complexos e ainda parcialmente desconhecidos, relacionados à sua carcinogênese, progressão e resistência terapêutica. O presente trabalho realizou uma revisão não sistemática da literatura atual com o objetivo de compreender a utilidade e precisão da técnica de Sequenciamento Completo do Exoma quando utilizada no estudo genético de tumores ósseos primários, visando a pesquisa de novos genes candidatos e biomarcadores para a aplicação clínica. Nesta revisão, vemos que o Sequenciamento Completo do Exoma tem auxiliado no entendimento dos mecanismos moleculares destes tumores e na detecção de possíveis marcadores genético, no entanto sua crescente relevância destaca desafios consideráveis, incluindo a necessidade de promover a integração entre a pesquisa e a prática clínica e a igualdade de acesso ao teste.

Palavras-chave: Tumor ósseo primário, WES, biomarcadores.

ABSTRACT

The primary bone tumors are a group of abnormal cells that are caused by the abnormal and uncontrolled cell growth, which results in a change in tissue balance and invasion of adjacent tissues. Nowadays, these tumors accounts for less than 1% of all cancers diagnosed each year, but they contribute significantly to the high mortality and morbidity rate of the world's population, since these tumors have complex and partially unknown mechanisms related to their carcinogenesis, progression and therapeutic resistance, which directly influences their diagnosis, prognosis and treatment. This paper carried out a non-systematic review of the current literature with the aim of understanding the usefulness and accuracy of the Whole Exome Sequencing technique when used in the genetic study of primary bone tumors, with a view to searching for new candidate genes and biomarkers for clinical application. In this review, we see that Whole Exome Sequencing has helped in the understanding of the molecular mechanisms of these tumors and in the detection of possible genetic markers, however its growing relevance highlights considerable challenges, including the need to promote integration between research and clinical practice and equal access to the test.

Keywords: Primary bone tumor, WES, biomarkers.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	8
1.1. Tumores Ósseos Primários.....	8
1.1.1. Osteossarcoma.....	9
1.1.2. Sarcoma de Ewing.....	10
1.1.3. Condrossarcoma.....	10
1.2. Sequenciamento de Tumores Ósseos.....	11
2. Metodologia	13
3. WES na oncologia.....	14
4. Mapeamento genético do Osteossarcoma.....	15
5. Mapeamento genético do Sarcoma de Ewing	18
6. Mapeamento genético do Condrossarcoma	20
7. Conclusão	22
8. Referências Bibliográficas	23

1. Introdução

Os tumores são definidos como portadores de um crescimento anormal de tecido causado pela transformação celular e sua replicação desregulada, que atinge o grau maligno quando se torna capaz de invadir e destruir tecidos saudáveis adjacentes (American Cancer Society, 2023). Um tumor é originado, principalmente, pelo acúmulo de mutações genéticas, que podem ser herdadas através da linhagem germinativa, adquiridas somaticamente ou induzidas pela exposição a agentes mutagênicos (Shyr, Liu, 2013). Estas alterações modificam a expressão e/ou função de genes essenciais, responsáveis pelo controle da proliferação celular normal e de mecanismos celulares fundamentais, impactando diretamente no processo tumorigênico (Kumar *et al.*, 2021, p. 808).

A tumorigênese é um processo derivado de múltiplas etapas decorrente do acúmulo de mutações independentes nas células, afetando os genes, que quando alterados, são associados ao câncer e favorecem a progressão tumoral. Assim, esse processo origina um conjunto de células transformadas, com uma genética heterogênea e instável (Shyr, Liu, 2013).

1.1. Tumores Ósseos Primários

Os tumores ósseos primários são compostos por aglomerados de células anormais que possuem origem no tecido ósseo. Este conjunto de células anormais é causado pelo crescimento celular excessivo e desordenado, mesmo após a parada do estímulo inicial, resultando no desequilíbrio da homeostase tecidual, com invasão e destruição de tecido normal adjacente (Kumar *et al.*, 2021, p. 808). Estes tumores possuem subtipos variados e heterogêneos, sendo o osteossarcoma, o sarcoma de Ewing e o condrossarcoma as formas mais frequentes entre os tumores ósseos primários (Aran *et al.*, 2021).

Os tumores ósseos são considerados neoplasias raras, pois representam apenas 0,2% de todas as doenças malignas no mundo e menos de 1% dos tumores diagnosticados a cada ano (Pullan, Lotfollahzadeh, 2022). Ainda assim, estão associados a uma mortalidade significativa, dado que os mecanismos complexos e, em sua maioria, desconhecidos tornam o diagnóstico desafiador, além da apresentação tardia de sintomas inespecíficos pelo paciente (Aran *et al.*, 2021). Dado que estes tumores são frequentemente agressivos, o tratamento fundamenta-se em protocolos que preconizam a sua excisão cirúrgica, ampla ou isolada, com o uso quimioterapia e radioterapia conjuntamente (Prater, Mckee, 2023).

No Brasil, esses tumores representam 4% de todas as neoplasias diagnosticadas durante a segunda década de vida, faixa etária que apresenta maior incidência (INCA, 2011). A Sociedade Americana de Câncer (ACS) estima que, em 2023, 3.970 novos casos de tumores ósseos serão diagnosticados, e cerca de 2.100 mortes ocorrerão em decorrência destes tumores.

1.1.1. Osteossarcoma

O osteossarcoma (OS) é a neoplasia óssea primária mais comum e uma das mais malignas, representando cerca de 20% de todos os tumores ósseos primários (Prater, Mckee, 2023). O OS é um tumor maligno que se origina a partir de células mesenquimais primitivas derivadas de osteoblastos, produzindo matriz osteóide ou osso imaturo (Ferguson, Turner, 2018). Nesta classe tumoral as células são similares às formas fisiológicas das células ósseas normais, contudo o tecido constituído não é resistente como o dos ossos normais. Este tumor se caracteriza pela alta atividade mitótica e pelo pleomorfismo celular, características que são utilizadas como principal achado clínico para o diagnóstico da neoplasia (Kumar *et al.*, 2021, p. 809).

A Sociedade Americana de Câncer (ACS), estima que aproximadamente 1.000 novos casos de osteossarcoma são diagnosticados nos EUA anualmente, e que a maioria dos casos se manifesta entre os 10 e 19 anos de idade. O OS representa cerca de 2,5% dos cânceres pediátricos, afetando principalmente os adolescentes, dado que a doença apresenta um pico de incidência durante o estirão do crescimento, iniciando-se nas áreas de ossos de crescimento rápido, como as metáfises de ossos longos dos membros inferiores (Kumar *et al.*, 2021, p. 809).

O OS possui diversos subtipos histológicos já descritos, estes são classificados de acordo com a localização do tumor no osso e posteriormente subdivididos de acordo com o grau do tumor (Pullan, Lotfollahzadeh, 2022). O osteossarcoma pode ser classificado como central ou intramedular (baixo grau, células pequenas, telangiectásica e alto grau ou convencional), superficial (parosteal, periosteal e alto grau), ou extraesquelético (baixo grau e alto grau) (Prater, Mckee, 2023). O grau do tumor é definido com base no achado histológico, velocidade de crescimento e sua agressividade, assim, os tumores de alto grau são os que as células, em sua maioria, apresentam divisão celular aumentada e rápido crescimento. Os OSs de baixo grau de malignidade são os que apresentam células semelhantes às normais e poucas em processo de divisão celular, possuindo um crescimento mais lento (FERGUSON, TURNER, 2018). Dentre os subtipos de osteossarcoma, o mais prevalente é o intramedular convencional ou de alto grau de malignidade, correspondendo a 80% de todos os casos (Pullan, Lotfollahzadeh, 2022).

1.1.2. Sarcoma de Ewing

O Sarcoma de Ewing (ES) é definido como um tumor maligno agressivo, derivado de células primitivas redondas em diferentes graus de diferenciação neuroectodérmica (Kumar *et al.*, 2021, p. 812). O ES foi descrito pela primeira vez em 1921 por James Ewing e, inicialmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) o agrupou com o sarcoma de Ewing extra esquelético, o tumor maligno de pequenas células da parede torácica (Tumor de Askin) e os tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) em uma mesma família, com base em suas semelhanças histológicas (Durer, Shaikh, 2022). Entretanto, em 2016, a OMS modificou a classificação, separando, diferenciando e classificando os sarcomas de Ewing das demais entidades tumorais (Dupuy *et al.*, 2023).

Atualmente, os ESs são classificados de acordo com a sua localização óssea. Em sua maioria, os ES possuem origem na diáfise óssea, entretanto, cerca de 20% dos ESs são do tipo extra esquelético ou extraósseo, com origem em partes moles, como as regiões ao redor dos ossos ou as paredes de cavidades adjacentes (Dupuy *et al.*, 2023).

Esta classe de tumores representa de 10% a 15% de todos os tumores do sistema músculo esquelético, de modo que ocupam a segunda posição na lista de tumores ósseos primários mais comuns em adolescentes (Kumar *et al.*, 2021, p. 812). O pico de incidência etária da doença se concentra na adolescência, com idade média de 15 anos, no entanto o ES também afeta jovens adultos acima de 20 anos em quase 30%. A cada ano, cerca de 200 adolescentes são diagnosticados com sarcomas de Ewing nos Estados Unidos (Durer, Shaikh, 2022).

1.1.3. Condrossarcoma

Os condrossarcomas (CS) são tumores ósseos malignos produtores de cartilagem e formadores da matriz cartilaginosa (Kumar *et al.*, 2021, p. 812). Embora ainda não se conheça a linhagem celular exata de origem, estudos apontam que o início do tumor ocorre a partir de condrócitos transformados (Wan-Ibrahim *et al.*, 2015). Assim, esse tumor pode ter origem em qualquer local onde exista cartilagem, os mais atingidos são os ossos da pelve, pernas e braços (Lima *et al.*, 2023).

O CS é o terceiro tumor ósseo primário mais comum e é considerado um tumor cuja maior incidência ocorre na idade adulta e terceira idade (Pullan, Lotfollahzadeh, 2022). A doença apresenta risco aumentado com o envelhecimento e possui seu pico de incidência entre os 30 e 60 anos, sendo raro em pessoas com menos de 20 anos (ACS, 2023).

Os condrossarcomas são classificados quanto à sua histologia, assim o condrossarcoma convencional representa cerca de 85% dos casos e são sub-classificados em três graus. O grau I agrupa os tumores com lesões de baixo grau de malignidade e apresentam a matriz cartilaginosa. Os CSs de grau II reúnem tumores com lesões de alto grau de malignidade e sem a presença da matriz cartilaginosa (Kumar *et al.*, 2021, p. 812). Ademais, existe também um pequeno número de condrossarcomas não convencionais, perfazendo cerca de 10% de todos os casos, classificados como: desdiferenciado, periosteal, mesenquimal e de células claras. Normalmente, estes tumores são considerados agressivos, de alto grau e com pior prognóstico (Lima *et al.*, 2023).

1.2. Sequenciamento de Tumores Ósseos

Uma das principais técnicas de sequenciamento de primeira geração, o sequenciamento Sanger, foi desenvolvida por Fred Sanger na década de 1970, e se tornou um marco para a ciência quando utilizada no Projeto Genoma Humano de 2002 (Zhong *et al.*, 2021). Avanços tecnológicos, levaram ao aprimoramento das técnicas de Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*), que são caracterizadas pelo sequenciamento paralelo e de alto rendimento, permitindo o sequenciamento simultâneo de milhões de sequências de pares de bases do DNA ou RNA (Serrati *et al.*, 2016).

Atualmente, as plataformas de NGS mais utilizadas realizam o sequenciamento do material por síntese, ou seja, utilizam métodos que dependem da DNA polimerase para a incorporação de nucleotídeos em uma fita de DNA molde (Zhong *et al.*, 2021). No entanto, as plataformas podem variar quanto à sua metodologia. Desta forma, algumas plataformas utilizam nucleotídeos incorporados a corantes fluorescentes, que, ao serem conectados à fita molde de DNA, emitem sinais fluorescentes que são capturados pelo sistema de análise. Assim como existem plataformas que detectam a liberação de íons de hidrogênio durante a sua ligação ao nucleotídeo na cadeia molde de DNA, utilizando um chip semicondutor para detectar as alterações de pH geradas pela liberação de prótons e obter o sequenciamento (Serrati *et al.*, 2016).

As análises que utilizam estas metodologias mostram-se vantajosas e úteis para a obtenção de dados científicos, pois possibilitam o sequenciamento de material genético a partir de amostras iniciais baixas em material e propiciam um tempo de resposta mais rápido. Os métodos também possuem um menor custo e uma maior sensibilidade na detecção de variantes de baixa frequência, visto que o sequenciamento Sanger possui uma detecção de 2% a 10% de

variantes de baixa frequência e as técnicas de NGS possuem de 15% a 25% de detecção (Serrati *et al.*, 2016).

O sequenciamento completo do exoma (WES, do inglês *Whole Exome Sequencing*) pertence ao grupo de técnicas de NGS. Esta técnica avalia o exoma, com o objetivo de determinar as variações de todas as regiões codificantes conhecidas (Rabbani *et al.*, 2014). O exoma possui cerca de 21.000 genes, e estima-se que 85% das mutações causadoras de doenças estejam localizadas nele (Kamps *et al.*, 2017). O WES possui boa sensibilidade, cobrindo mais de 95% dos éxons presentes no genoma e permitindo a detecção de variantes em baixa frequência alélica e mosaicismo em linhagens germinativas (Chang *et al.*, 2020).

O primeiro relato do uso de WES em pesquisas foi publicado por Nik-Zainal *et al.*, em 2009. A técnica foi utilizada para sequenciar os exomas de 12 indivíduos sem doenças genéticas e quatro pacientes afetados por uma síndrome hereditária rara e dominante, a síndrome de Freeman-Sheldon. Após a análise de dados, foram relatadas cerca de 13.000 novas variantes encontradas e, ao compararem os dados dos dois grupos, o estudo definiu as mutações no gene *MYH3* como causadoras da síndrome de Freeman-Sheldon.

O WES tem sido aplicado no estudo genético de tumores ósseos, a fim de auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na etiologia dos tumores ósseos primários, e na detecção de alterações frequentes e críticas no genoma, apontando novos biomarcadores e genes condutores, que auxiliem na confecção de terapias gênicas personalizadas e nos protocolos de tratamentos oncológicos, propiciando terapias mais eficazes e com um melhor prognóstico para os pacientes.

2. Metodologia

A proposta deste trabalho é uma revisão não sistemática da literatura atual, com o objetivo de apresentar as aplicações da técnica de Sequenciamento Completo do Exoma (WES) no estudo para novos biomarcadores e genes candidatos para os tumores ósseos primários. Realizou-se uma pesquisa na literatura de artigos científicos nas plataformas PubMed e Scielo, a fim de identificar estudos genéticos publicados sobre osteossarcomas, sarcomas de Ewing e condrossarcomas a partir de janeiro de 2014. Foram utilizadas combinações dos termos: *Primary Bone Tumors* (39.457 resultados), *Primary Bone Tumors Biomarkers* (3.645 resultados), *Whole Exome Sequencing Tumor* (8.101 resultados) e *Whole Exome Sequencing Bone Tumor* (313 resultados). Outros artigos foram identificados a partir da bibliografia inicial encontrada.

Os artigos selecionados para revisão foram incluídos com base nas técnicas utilizadas durante os estudos. Priorizou-se estudos que realizaram a extração do material genético de amostras de tumores ósseos, independente da metodologia utilizada e, posteriormente, o Sequenciamento Completo do Exoma e a análise bioinformática dos dados destas amostras, também sem interesse em um kit comercial específico ou plataforma de análise a ser utilizada.

3. WES na oncologia

Grande parte dos tumores possuem predisposição familiar com mutações genéticas associadas ao maior risco de desenvolvimento da doença durante a vida (Kamps *et al.*, 2017). Em resumo, o WES pode ser aplicado na pesquisa em oncologia para a detecção de mutações (variantes patogênicas) germinativas e somáticas com potencial de influenciar a predisposição ao câncer, concebendo novos *insights* sobre os mecanismos carcinogênicos e auxiliando na comparação das sequências de DNA de células cancerígenas com a de células normais para a compreensão do longo panorama de alterações genéticas que estas doenças abrigam (Rabbani *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, a técnica de WES vem desempenhando um papel importante para a identificação de novos genes relacionados a processos tumorigênicos, como os genes supressores *PALB2* e *ATM*, descritos e associados a maior suscetibilidade de desenvolvimento do câncer de pâncreas (Jones *et al.*, 2009). Atualmente, o WES possui grande aplicabilidade em pesquisas, como no *Cancer Genome Project*, desenvolvido pelo Instituto Sanger no Reino Unido, que reúne cerca de 5 milhões de alterações somáticas associadas ao câncer a partir do sequenciamento do exoma de 700 linhas celulares e 7.000 tumores primários (Kamps *et al.*, 2017).

O avanço na tecnologia de WES inovou a compreensão da base molecular e genômica destes tumores, elevando o conhecimento sobre sua iniciação, desenvolvimento, progressão e resistência em diferentes protocolos de tratamentos. Um dos principais avanços proporcionados foi o esclarecimento da biologia molecular dos tumores ósseos, que passaram a ser classificados em dois grupos principais, os tumores de cariótipo simples e os tumores de cariótipo complexo. O primeiro grupo inclui tumores que possuem mutações, translocações ou amplificações específicas, que são recorrentes na doença e possuem papel importante no processo tumoral. Enquanto o segundo grupo inclui tumores com cariótipo sem alterações moleculares específicas, apresentando pleomorfismo e mutações aleatórias (Lam *et al.*, 2017).

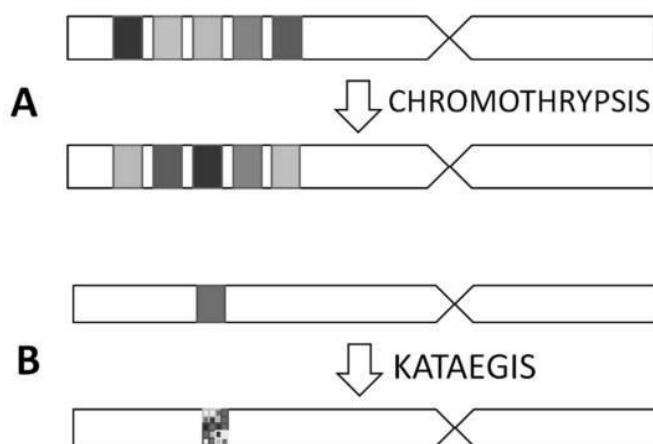
Na área da medicina genômica, o sequenciamento do exoma auxilia na classificação e no diagnóstico das neoplasias, visto que os subtipos de tumores podem ser definidos a partir da presença ou ausência de mutações genéticas específicas. O WES também contribui para o desenvolvimento de novas terapias personalizadas e direcionadas, através da detecção de mutações alvo específicas e mutações de resistência, que possibilitam a aplicação da medicina personalizada e de precisão (Gagan, Allen, 2015).

4. Mapeamento genético do Osteossarcoma

Os osteossarcomas compõem o grupo de tumores de cariótipo complexo, contendo diversas alterações estruturais e mecanismos moleculares carcinogênicos parcialmente desconhecidos (Gaeta *et al.*, 2023). Entretanto, alguns mecanismos desta doença já foram descritos na literatura e auxiliam no estudo e identificação de novas bases moleculares do tumor.

O OS é descrito como um tumor ósseo que possui alta instabilidade genômica (Gaeta *et al.*, 2023), sendo ela atribuída ao fenômeno da cromotripsia. Descrito pela primeira vez por Stephens *et al.*, em 2011, em uma pesquisa envolvendo cordoma e osteossarcoma. A cromotripsia é a quebra de um ou mais cromossomos em pequenos fragmentos que são rearranjados em uma ordem e orientação aleatória (Stephens *et al.*, 2011). O fenômeno pode ocorrer por dano físico ao cromossomo ou através do encurtamento progressivo dos telômeros, processos que levam ao comprometimento da integridade do genoma de células normais, resultando em genes condutores, os quais impulsionam a progressão tumoral (Gaeta *et al.*, 2023). Segundo o estudo de Stephens *et al* (2011), a ocorrência em 3% de todos os tipos de cânceres e em 30% dos osteossarcomas, no entanto o estudo de Behjati *et al* (2017) apresentou a cromotripsia ocorrendo em cerca de 85% dos osteossarcomas. Outro fenômeno encontrado no OS é o *kataegis*, o termo foi descrito pela primeira vez em 2012 por Nik Zainal *et al.*, e diz respeito a regiões críticas de instabilidade genômica em cromossomos com alto índice de mutações aleatórias e não recorrentes ocorrendo. No OS, a prevalência de *kataegis* varia entre 50 e 85% dos casos (Gaeta *et al.*, 2023).

Figura 1.



(Representação esquemática de um cromossomo normal e um cromossomo após o evento de cromotripsia (A). Representação esquemática de um cromossomo normal e um cromossomo após o evento de *kataegis* (B)). Fonte: Czarnecka *et al.*, 2020.)

O gene *TP53* é um gene supressor de tumor muito estudado e suas alterações genéticas são frequentemente encontradas e associadas a diversos tumores. Este gene codifica uma proteína supressora, a p53, envolvida com a resposta a estresses celulares por meio da parada do ciclo celular, por reparo do DNA ou por apoptose (OMIM Database, ID 191170). Mutações neste gene podem inativar a proteína e impactar nas atividades regulatórias desempenhadas por ela, permitindo o processo de tumorigênese (Czarnecka *et al.*, 2020).

Chen *et al.* (2014) analisaram amostras de osteossarcomas utilizando as técnicas de Sequenciamento Completo do Genoma (WGS, do inglês *Whole Genome Sequencing*) e WES, e revelaram que 55% dos tumores apresentavam variações estruturais no gene *TP53*, sendo que 90% destas amostras possuíam translocações com pontos de quebra no íntron 1 do gene. O estudo também descreveu a perda de alelo no locus *TP53* em 40% dos tumores analisados, caracterizando a perda de heterozigiosidade do gene. Segundo a estimativa feita por Chen *et al.* (2014), a mutação no *TP53* ocorre em ambos os alelos em 80% dos OS, e cerca de 90% dos OS sofrem mutação em pelo menos um dos alelos. Portanto, os dados do estudo elucidaram o mecanismo de inativação do gene e sugeriram que a sensibilidade e a instabilidade genômica na região do primeiro íntron, causada pelas variações estruturais, podem anteceder a inativação do *TP53*, sendo este um possível processo importante e um facilitador para o mecanismo inicial de desenvolvimento do osteossarcoma (Bousquet *et al.*, 2016).

O segundo gene mais comumente alterado no osteossarcoma é o *RB1*, no qual são encontradas mutações em 40% - 70% dos OS (Czarnecka *et al.*, 2020). O gene *RB1* é um supressor tumoral responsável por regular negativamente o ciclo celular, sua proteína codificante tem como função estabilizar a heterocromatina e manter a estrutura da cromatina (OMIM Database, ID 180200). Desta forma, a mutação mais encontrada no gene é a perda de heterozigiosidade no local onde o gene está mapeado, o cromossomo 13q, ocasionando a perda de função do gene, a desregulação no ciclo celular e alterações no reparo a danos na cadeia do DNA (Behjati *et al.*, 2017). Estudos recentes relatam a associação de mutação no gene *RB1* com o mau prognóstico e uma má resposta ao tratamento, fato corroborado pelo estudo de Gaeta *et al.* (2023), em que dois grupos foram analisados por WES e o grupo com pior resposta à quimioterapia e com o pior prognóstico apresentou maior taxa de mutação no gene, 56%, enquanto o grupo com melhor prognóstico apresentou uma taxa de 20%.

Quando avaliados juntos, os genes *TP53* e *RB1* são os mais descritos como alterados nos casos de OS. No trabalho de Kovac *et al.* (2015), foram encontradas mutações em um dos

dois genes em 47% dos casos e estas foram relacionadas com o mecanismo inicial de evolução do tumor, enquanto a outra parte dos tumores podem estar envolvidos com mutações em outros oncogenes condutores. Além da prevalência de mutações, essas alterações estão altamente relacionadas com a suscetibilidade do indivíduo em desenvolver OS (Franceschini *et al.*, 2019).

Além destes principais genes envolvidos, outros já foram descritos como alterados em OS e são apresentados na tabela 1. Por exemplo, o gene *ATRX* apresenta mutações somáticas em cerca de 30% dos OS (Chen *et al.*, 2014). Sabe-se que o gene compõe um complexo multiproteico responsável pela remodelação da cromatina e da manutenção dos telômeros (OMIM Database, ID 300032), entretanto a mutação e a sua relação com a tumorigênese do osteossarcoma ainda é desconhecida.

Tabela 1. Alterações genéticas recorrentes em osteossarcomas primários

Gene	Mutação	Frequência em OS	Literatura
<i>TP53</i>	Deleção; mutação	55% - 80%	Chen <i>et al.</i> , 2014
<i>RB1</i>	Deleção; mutação	40% - 70%	Czarnecka <i>et al.</i> , 2020; Chen <i>et al.</i> , 2014
<i>PTEN</i>	Deleção; mutação	12% - 50%	Behjati <i>et al.</i> , 2017; Kovac <i>et al.</i> , 2015
<i>BRCA2</i>	Deleção; mutação	40% - 78%	Kovac <i>et al.</i> , 2015; Gaeta <i>et al.</i> , 2023
<i>ATRX</i>	Deleção; mutação	30%	Chen <i>et al.</i> , 2014
<i>BRCA1</i>	Deleção; mutação	21%	Gaeta <i>et al.</i> , 2023
<i>CDKN2A</i>	Deleção; mutação	15%	Kovac <i>et al.</i> , 2015
<i>DLG2</i>	Deleção	24% - 53%	Chen <i>et al.</i> , 2014; Kovac <i>et al.</i> , 2015
<i>CREBBP</i>	Mutação	78%	Gaeta <i>et al.</i> , 2023
<i>ARID1A</i>	Mutação	43% - 78%	Gaeta <i>et al.</i> , 2023
<i>RAD50</i>	Mutação	56%	Gaeta <i>et al.</i> , 2023
<i>CDK4</i>	Amplificação	9% - 11%	Francischini <i>et al.</i> , 2020
<i>MDM2</i>	Amplificação	5% - 12%	Francischini <i>et al.</i> , 2020

5. Mapeamento genético do Sarcoma de Ewing

O Sarcoma de Ewing, em nível genético, pertence ao grupo de tumores de cariótipo simples, visto que o ES é caracterizado por translocações balanceadas que originam genes quiméricos decorrentes da fusão do gene *EWSR1* com um membro da família do fator de transcrição *ETS*. O rearranjo cromossômico mais comum está descrito em 90% dos casos de ES, e ocorre através de t(11;22)(q24; q12), originando a translocação *EWSR1-FLI1* (Delattre *et al.*, 1992; Sand *et al.*, 2015). Tirode *et al.* (2014) apresentaram análise de 112 ES, em que 101 dos casos apresentaram translocações *EWSR1-FLI1* ou outra translocação do gene *EWSR1* com membros diferentes da família do fator de transcrição *ETS*. Em geral, a fusão EWS-ETS é encontrada no início da tumorigênese e está presente durante todo o seu desenvolvimento, causando desregulação transcricional em diversos genes alvo, interrompendo mecanismos celulares normais e induzindo a transformação celular (Scotlandi *et al.*, 2020). Deste modo, a detecção de uma destas translocações específicas auxilia na diferenciação e classificação de tumores, e são utilizadas como ferramenta diagnóstica desde 1990 (Lam *et al.*, 2017).

Em geral, os ES apresentam um número baixo de variações cromossômicas estruturais quando comparado a outros tumores ósseos pediátricos, assim como não estão presentes áreas de cromotripsia neste tumor (Sand *et al.*, 2015). Ageopoulos *et al.* (2015) e Brohl *et al.* (2017) confirmaram estas características através de seus estudos ao utilizar o sequenciamento do exoma e obter uma média de seis mutações somáticas por exoma (0,15 mutações/Mb de sequência codificadora) e uma média de nove mutações somáticas por exoma (0,38 mutações/Mb de sequência codificadora), respectivamente.

No entanto, mesmo a proteína quimérica EWS-ETS sendo um oncogene transformador e estimulador da proliferação celular, sabe-se que são necessárias mais alterações secundárias no genoma para o desenvolvimento de ES (Ageopoulos *et al.*, 2015). A alteração genética secundária mais frequentemente encontrada é a deleção ou perda de função do gene *STAG2*, presente em cerca de 20% dos casos (Surdez *et al.*, 2021). O gene *STAG2* é o codificador da proteína que compõe o complexo de coesina, responsável pela manutenção das cromátides irmãs durante a divisão celular (OMIM Database, ID 300826), sua inativação causa defeitos de coesão das cromátides irmãs e influencia a expressão gênica, visto que erros durante segregação cromossômica na mitose podem gerar mutações estruturais e aneuploidia (Brohl *et al.*, 2017). O gene também foi descrito como um gene supressor de tumor frequentemente mutado em outros tumores, como na Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Além disso, os estudos realizados

por Sand *et al.* (2015) e Brohl *et al.* (2017) descreveram que tumores afetados por mutações no gene *STAG2* estão associadas a um pior prognóstico e ao risco aumentado de metástase, além de encontrarem alterações menos frequentes envolvendo outros genes (Tabela 2).

No Sarcoma de Ewing também foram descritas alterações cromossômicas estruturais envolvendo ganho do cromossomo 8 (47%), ganho do cromossomo 12 (21%), ganho do braço longo do cromossomo 1 (18%), perda do braço longo do cromossomo 16 (17%) e perda do locus do gene *CDKN2A* mapeado no cromossomo 9 (12%) (Brohl *et al.*, 2017). O gene *CDKN2A* é um supressor tumoral já descrito, que atua no controle do ciclo celular nas fases G1 e G2 e na regulação negativa da proliferação celular (OMIM Database, ID 600160). O papel desempenhado pelo gene na tumorigênese ainda não foi elucidado, entretanto sabe-se que a perda de *CDKN2A* e as mutações de *STAG2* forma mutuamente exclusivas, podendo indicar que os genes estão envolvidos em processos complementares (Tirode *et al.*, 2014).

Tabela 2. Alterações genéticas recorrentes no sarcoma de Ewing primário

Gene	Mutação	Frequência em ES	Literatura
<i>EWSR1-FL1</i>	Translocação	85% - 90%	Sand <i>et al.</i> , 2015; Agelopoulos <i>et al.</i> , 2015
<i>STAG2</i>	Deleção; mutação	20%	Surdez <i>et al.</i> , 2021
<i>CDKN2A</i>	Deleção	12%	Brohl <i>et al.</i> , 2017
<i>FGFR1</i>	Amplificação	31%	Agelopoulos <i>et al.</i> , 2015
<i>CCDC2</i>	Mutação	11%	Agelopoulos <i>et al.</i> , 2015
<i>TP53</i>	Deleção; mutação	5% - 9%	Sand <i>et al.</i> , 2015; Brohl <i>et al.</i> , 2017
<i>BRCA2</i>	Deleção	7%	Brohl <i>et al.</i> , 2017
<i>EZH2</i>	Mutação	2%	Tirode <i>et al.</i> , 2014
<i>BCOR</i>	Mutação	2%	Tirode <i>et al.</i> , 2014
<i>ZMYM3</i>	Deleção; mutação	2%	Tirode <i>et al.</i> , 2014

6. Mapeamento genético do Condrossarcoma

O condrossarcoma convencional é um tumor caracterizado pela presença de mutações somáticas no gene da proteína isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1* e *IDH2*) (Dermawan *et al.*, 2023). Mutações *hotspots* são encontradas nestes genes nas posições *IDH1* p.Arg132 e *IDH2* p.Arg172, sendo a primeira a mais frequente e presente em cerca de 50% dos casos de CS (Scotlandi *et al.*, 2020). A IDH é uma enzima do ciclo de Krebs responsável pela catalização da descarboxilação oxidativa do isocitrato em alfa-cetoglutarato (OMIM Database, ID 147700), desta forma mutações em *IDH1* e *IDH2* causam o acúmulo de 2-hidroxiglutarato no interior das células, que inibem a ação das desmetilases de histonas e concentram histonas em todo o genoma (Nakagawa *et al.*, 2022). Assim, a presença de histonas resulta na hipermetilação do DNA e altera a expressão genética, contribuindo com o processo de tumorigênese (Scotlandi *et al.*, 2020). Além disso, as mutações *IDH1/2* também são encontradas em condrossarcomas desdiferenciados em cerca de 50% - 80% dos casos (Dermawan *et al.*, 2023).

Em estudo, Nakagawa *et al.* (2022) avaliaram amostra tumorais de CS e revelaram que 39% dos casos apresentavam mutações no gene *IDH1*, enquanto 13% dos tumores apresentavam mutações em *IDH2*. O estudo investigou a relação entre as mutações de *IDH1/2* e os impactos clínicos do CS, e relacionou as mutações de IDH com um pior prognóstico e uma pior sobrevida, possivelmente resultante das características mais agressivas dos tumores com mutações neste gene.

Tarpey *et al.* (2013) analisaram por WES 75 casos de CS, incluindo condrossarcomas convencionais e desdiferenciados. O estudo identificou nestas amostras cerca de 1.400 mutações somáticas, que variaram de acordo com o grau do tumor, sendo que os tumores de alto grau e desdiferenciados apresentaram mais que o dobro de mutações do que os tumores de baixo grau. O principal achado do estudo foi a identificação de mutações no gene *COL2A1*, que possuía ao menos uma alteração em 44% das amostras. O gene *COL2A1* codifica a proteína da cadeia alfa-1 do colágeno tipo II, o colágeno fibrilar constituinte da cartilagem articular (OMIM Database, ID 120140). As mutações que afetam este gene geram deficiências na biossíntese normal da cartilagem, comprometendo a deposição e sinalização da matriz extracelular, e contribuindo para a tumorigênese a partir da desregulação de mecanismos normais de diferenciação (Miwa *et al.*, 2022). Tarpey *et al.* (2013) também avaliaram o gene *COL2A1* em outros tumores ósseos, como osteossarcomas, cordomas e em fibromas, para comparação dos padrões de mutação, como resultado foi detectado que o acúmulo de mutações no gene *COL2A1*

é exclusivo ao CS, apresentando um padrão hipermutável na doença. Além do gene *COL2A1*, foram encontrados outros genes mutados com prevalências significativas que estão representados na Tabela 3.

Mutações na região promotora do gene da transcriptase reversa da polimerase humana (TERT) são frequentemente descritas em condrossarcomas. O gene *TERT* é o responsável pela manutenção das extremidades dos telômeros ao adicionar a repetição TTAGGG na região telemétrica (OMIM Database, ID 187270). Desta forma, mutações neste gene provocam a desregulação do controle da expressão da telomerase nas células somáticas e estão relacionadas com o processo de tumorigênese (Zhang *et al.*, 2021). Zhang *et al.* (2021) avaliaram 190 amostras de CS e encontraram mutações na região promotora do gene *TERT* em 45% delas. O estudo relacionou as mutações deste gene com o alto grau de malignidade deste tumor, e a maior probabilidade de metástase e de um pior prognóstico desta doença, dado que a região promotora mutada do gene *TERT* indica um curso clínico mais agressivo da doença, desde os mecanismos de transformação celular.

Tabela 3. Alterações genéticas recorrentes no condrossarcoma primário

Gene	Mutação	Frequência em OS	Literatura
<i>IDH1/IDH2</i>	Deleção; mutação	50% - 80%	Dermawan <i>et al.</i> , 2023; Nakagawa <i>et al.</i> , 2022
<i>COL2A1</i>	Mutação	44%	Tarpey <i>et al.</i> , 2013
<i>TERT</i>	Mutação	45%	Zhang <i>et al.</i> , 2021
<i>TP53</i>	Deleção; mutação	13% - 50%	Tarpey <i>et al.</i> , 2013; Dermawan <i>et al.</i> , 2023
<i>RB1</i>	Mutação	27%	Zhang <i>et al.</i> , 2021
<i>PTCH1</i>	Mutação	8%	Tarpey <i>et al.</i> , 2013
<i>PTEN</i>	Deleção	2%	Tarpey <i>et al.</i> , 2013
<i>TSC1</i>	Deleção	2%	Tarpey <i>et al.</i> , 2013

7. Conclusão

Os avanços das técnicas moleculares de NGS foram essenciais para acelerar o esclarecimento da paisagem molecular dos tumores ósseos primários e elucidar em grande parte os mecanismos biológicos envolvidos na etiologia da tumorigênese no sistema músculo esquelético. Os principais tumores ósseos primários apresentados e discutidos neste trabalho ilustram como as alterações genéticas recorrentes e específicas são determinantes como biomarcadores diagnósticos, preditivos e de prognóstico destas doenças. A identificação de biomarcadores da tumorigênese são os mais pesquisados atualmente, visando alcançar um melhor resultado clínico para os pacientes, além das suas aplicações no campo da genética clínica, impactando positivamente desde a triagem até o monitoramento da progressão tumoral, bem como no desenvolvimento de novas terapias alvo.

Apesar de haver um significativo número de pesquisas sendo desenvolvidas nesta área, envolvendo estudos sobre potenciais biomarcadores para os tumores ósseos, a aplicação clínica destes achados ainda não é uma realidade. Para isso, a medicina de precisão voltada para tumores e a utilização de testes de sequenciamento genético necessitam adotar novas abordagens científicas e metodologias, a fim de possibilitar a reprodutibilidade dos estudos realizados, o acesso e a utilização correta destas novas informações obtidas. A integração entre a pesquisa e a prática clínica é necessária para promover a associação das informações genéticas do sequenciamento completo do exoma com o fenótipo clínico da doença, permitindo o desenvolvimento e a atuação eficiente da medicina de precisão na oncologia humana.

Apesar do grande progresso na área, mais estudos envolvendo os mecanismos genéticos de iniciação, proliferação e progressão tumoral são necessários, principalmente para a identificação de novos biomarcadores tumorais e detecção de alvos genômicos terapêuticos para a oncologia humana. Assim, a tecnologia WES e as ferramentas de bioinformática poderão evoluir continuamente e serem aplicadas como método de diagnóstico decisivo, contribuindo significativamente para a melhoria da medicina de precisão.

8. Referências Bibliográficas

- AGELOPOULOS, C. et al. Deep Sequencing in Conjunction with Expression and Functional Analyses Reveals Activation of FGFR1 in Ewing Sarcoma. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 21, p. 4935-4946, 2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY, INC. Disponível em: <https://www.cancer.org>. Acesso em: 07 set. 2023.
- ARAN, V. et al. Osteosarcoma, chondrosarcoma and Ewing sarcoma: Clinical aspects, biomarker discovery and liquid biopsy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 162, 2021.
- BEHJATI, S. et al. Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma. **Nature Communications**, v. 8, jun. 2017.
- BOUSQUET, M. et al. Whole-exome sequencing in osteosarcoma reveals important heterogeneity of genetic alterations. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 4, p. 738-744, abr. 2016.
- BROHL, A. S. et al. Frequent inactivating germline mutations in DNA repair genes in patients with Ewing sarcoma. **Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 19, n. 8, p. 955-958, ago. 2017.
- CHANG, Y. et al. Pathway Mutations in Breast Cancer Using Whole-Exome Sequencing. **Oncology Research**, v. 28, n. 2, p. 107-116, 2020.
- CHEN, X. et al. Recurrent Somatic Structural Variations Contribute to Tumorigenesis in Pediatric Osteosarcoma. **Cell Reports**, v. 7, n. 1, p. 104-112, 2014.
- CZARNECKA, A. M. et al. Molecular Biology of Osteosarcoma. **Cancers**, v. 12, n. 8, jul. 2020.
- DELATTRE, O. et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. **Nature**, v. 359, p. 162-165, set. 1992.
- DERMAWAN, J. et al. Distinct IDH1/2-associated Methylation Profile and Enrichment of TP53 and TERT Mutations Distinguish Dedifferentiated Chondrosarcoma from Conventional Chondrosarcoma. **Cancer Research Communications**, v. 3, n. 3, p. 431-443, mar. 2023.
- DUPUY, M. et al. Ewing Sarcoma from molecular biology to the clinic. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, setembro 2023.
- DURER, S.; SHAIKH, H. Ewing Sarcoma. **StatPearls Publishing**, Date last edited: 07 mar 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559183/>. Acesso em: 17 set. 2023.
- FERGUSON, J. L.; TURNER, S. P. Bone Cancer: Diagnosis and Treatment Principles. **American family physician**, v. 98, n. 4, p. 205-213, 2018.

FRANCESCHINI, N. et al. What's new in bone forming tumours of the skeleton? **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, v. 476, p. 147-157, 2020.

GAETA, R. et al. Identification of New Potential Prognostic and Predictive Markers in High-Grade Osteosarcoma Using Whole Exome Sequencing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, jun. 2023.

GAGAN, J.; VAN ALLEN, E. Next-generation sequencing to guide cancer therapy. **Genome Medicine**, v. 7, n. 80, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. **Ministério da Saúde**, 2011.

JONES, S. et al. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. **Science**, v. 324, p. 217, 2009.

KAMPS, R. et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, jan. 2017.

KOVAC, M. et al. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. **Nature communications**, v. 6, dez. 2015.

KUMAR, V. et al. Robbins basic pathology. **Editora Guanabara Koogan**, v. 10, n. 2, 2021.

LAM, S. et al. Molecular Pathology of Bone Tumors. **The Journal of Molecular Diagnostics**, dezembro 2017.

LIMAIEM, F. et al. Chondrosarcoma. **StatPearls Publishing**, Date last edited: 14 ago 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538132/>. Acesso em: 17 set. 2023.

MIWA, S. et al. Therapeutic Targets and Emerging Treatments in Advanced Chondrosarcoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n.3, jan. 2022.

NAKAGAWA, M. et al. Prognostic impact of IDH mutations in chondrosarcoma. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 27, n. 6, p. 1315-1322, nov. 2022.

NIK-ZAINAL, S. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, p. 415-421, 2013.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN, OMIM. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. Disponível em: <https://omim.org/>. Acesso em: 23 set. 2023.

PRATER, S.; MCKEON B. Osteosarcoma. **StatPearls Publishing**, Date last edited: 23 mai 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549868/>. Acesso em: 15 set. 2023.

PULLAN, J.; LOTFOLLAHZADEH, S. Primary Bone Cancer. **StatPearls Publishing**, Date last edited: 03 dez 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560830/23>. Acesso em: 12 set. 2023.

RABBANI, B.; TEKIN, M.; MAHDIEH, N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. **Journal of Human Genetics**, v. 59, p. 5-15, 2014.

SAND, G. et al. Sequencing Overview of Ewing Sarcoma: A Journey across Genomic, Epigenomic and Transcriptomic Landscapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 16176-16215, jul. 2015.

SERRATÌ, S. et al. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 7355-7365, 2016.

SHYR, D.; LIU, Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application. **Biological Procedures Online**, v. 15, n. 4, 2013.

SCOTLANDI, K. et al. Genomics and Therapeutic Vulnerabilities of Primary Bone Tumors. **Cells**, v. 9, n. 4, abr. 2020.

STEPHENS, P. J. et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 27-40, 2011.

SURDEZ, D. et al. STAG2 mutations alter CTCF-anchored loop extrusion, reduce cis-regulatory interactions and EWSR1-FLI1 activity in Ewing sarcoma. **Cancer Cell**, v. 39, ed. 6, p. 810-826, jun. 2021.

TARPEY, P. et al. Frequent mutation of the major cartilage collagen gene COL2A1 in chondrosarcoma. **Nature Genetics**, v. 45, n. 8, ago. 2013.

TIRODE, F. et al. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 11, p. 1342-1353, set. 2014.

WAN-IBRAHIM, I. et al. Biomarkers for Bone Tumors: Discovery from Genomics and Proteomics Studies and Their Challenges. **Molecular Medicine**, v. 21, p. 861-872, 2015.

ZHANG, Y. et al. TERT promoter mutation is an objective clinical marker for disease progression in chondrosarcoma. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology**, v. 34, n. 11, p. 2020-2027, junho 2021.

ZHONG, Y. et al. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 4, ed. 1, p. 25-43, jan. 2021.