

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

ISABELLA DE FREITAS CAVALCANTE

**MECANISMOS GENÉTICOS DO OSTEOSSARCOMA PARA A ELUCIDAÇÃO DE
NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado em formato de artigo científico ao CEUB como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da Prof^a Dr^a Fernanda Costa Vinhaes de Lima.

BRASÍLIA
2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu primo, Filipe, que veio a falecer em 2017, aos 19 anos, decorrente do osteossarcoma. Apesar de não sermos tão próximos, toda a situação me abalou de forma inexplicável e me fez tomar decisões importantes na minha vida. A partida dele me impulsionou a escolher a Biomedicina, um curso que amo tanto, para tentar fazer a diferença no ramo científico. E nada mais justo do que homenageá-lo, no fim de toda essa jornada da faculdade. Mesmo com todas as dificuldades do tratamento, o Filipe sempre se manteve muito otimista e resiliente, e essa é sempre a imagem que terei dele. Obrigada por tudo primo.

Também dedico esse trabalho a minha família Oliveira-Cavalcante, principalmente aos meus tios, Helena e Carlos, pais do Filipe, e à sua irmã, Fernanda, que fizeram de tudo por ele. Tenho certeza que ele cumpriu a sua jornada e sempre esteve amando muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora, Fernanda Vinhaes, por aceitar estar comigo na produção deste trabalho, por acreditar em mim e por ter conseguido me motivar e acalmar nesse momento de tanto estresse, que vinculado à pandemia e à minha rotina, se tornou mais complicado.

Estendo esses agradecimentos à minha mãe e ao meu pai, Suelena e José, que apesar de certas dificuldades, me apoiaram e acompanharam meu estresse diário e momentos de ansiedade durante a elaboração deste, além de terem se preocupado com a minha educação desde o princípio, me proporcionando todos os meios e privilégios para eu estar onde estou hoje. Obrigada por acreditarem em mim, no meu futuro e por me amarem. Agradeço ao restante da minha família e, em especial, à minha tia Solange, que, sem ela eu nem estaria na faculdade, muito obrigada por sempre se preocupar comigo, tia.

Sou grata também aos meus amigos que foram compreensíveis, solícitos e escutaram meus desabafos sobre a produção deste, ressaltando a minha parceira da vida e de curso, Giovanna. Obrigada Biomedicina, por ter me dado amigas que fizeram parte da minha rotina, nos anos de curso antecedentes à pandemia, me divertiram, me estressaram e fizeram com que eu sentisse falta de ir para a faculdade, congressos e cursos.

Ademais, obrigada às minhas colegas de trabalho, que me alegram diariamente e tornaram esse momento mais leve, apesar de corrido. Obrigada a todos os professores que sempre acreditaram em mim e no meu potencial, principalmente àqueles que oportunizaram meu maior crescimento acadêmico, seja nas monitorias, nas produções científicas ou nas conversas motivadoras.

Agradeço a mim mesma, que mesmo diante do semestre da faculdade, um estágio de segunda a sábado e uma Iniciação Científica, tudo em meio à pandemia da COVID-19, fui persistente, confiei em mim e consegui finalizar este Trabalho de Conclusão de Curso. Por fim, agradeço a Deus e à vida por ter me dado sabedoria e meios para chegar até aqui.

Amo todos que foram mencionados e sou grata por tê-los.

Mecanismos genéticos do osteossarcoma para a elucidação de novos alvos terapêuticos

Isabella de Freitas Cavalcante¹
Fernanda Costa Vinhaes de Lima²

Resumo

O osteossarcoma é um câncer raro, metastático e com diversas alterações genéticas, que atinge com frequência crianças e adolescentes, sendo o tumor primário ósseo mais diagnosticado. Entretanto, ao longo de quase 50 anos, as taxas de sobrevida permanecem praticamente as mesmas: 15 a 30% em casos metastáticos. Este trabalho propôs apresentar os mecanismos genéticos presentes nessa neoplasia, a fim de contribuir com a elucidação de alvos terapêuticos. Trata-se de uma revisão bibliográfica narrativa, construída por referências do período de 2015 e 2021. A genética do osteossarcoma é complexa, apresentando elevado número de mutações cromossômicas, demonstradas por uma cromotripsia importante. Os miRNAs foram indicados como relevantes no processo regulatório, ressaltando-se o miR-221, por atuar sobre o PTEN e a cascata do PI3K/Akt. Estudos apontam o miR-221, e as vias que este regula, como possíveis novos alvos terapêuticos, contudo, devem ser aprofundados para o desenvolvimento de terapias eficientes com menor resistência tumoral.

Palavras-chave: Sarcoma ósseo; cromotripsia; miRNA; miR-221; quimiorresistência.

Genetics mechanisms of osteosarcoma to elucidate new therapeutic targets

Abstract

The osteosarcoma is a rare, metastatic cancer, which presents many different genetic alterations, often hits kids and teenagers, being the most diagnosed primary bone tumor. However, in the last 50 years, survival rates remained the same: 15 to 30% in metastatic cases. This research proposes to presents genetics mechanisms of this neoplasia, aiming to elucidate new therapeutics targets. This is a narrative review grounded on 2015 to 2021 period. The osteosarcoma genetic is complex, having a high number of chromosomal mutations, demonstrated by an important chromotripsy. The miRNAs were indicated as relevant in regulation process, highlighting miR-221, due to its function on PTEN and PI3K/Akt cascade. Studies point to miR-221, and the pathways that it regulates, as possible new therapeutic targets, although, they must be encouraged and sponsored to provide efficient therapies development with less tumor resistance.

Key words: Bone sarcoma; chromotripsy; miRNA; miR-221; chemiresistance.

¹Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – CEUB.

²Doutora em Patologia Molecular. Professora do Centro Universitário de Brasília – CEUB.

1. INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OS) é um tipo de neoplasia rara (afeta 3,4/1.000.000 pessoas por ano), apesar de ser o tumor primário ósseo mais comum no mundo, representando aproximadamente 56% desses cânceres. A patologia caracteriza-se pela presença de células mesenquimais malignas e pela produção de estroma ósseo anormal, gerando um tecido imaturo e osteóide, além de apresentar um conjunto de alterações genéticas, como aneuploidias e evidências de ruptura maciça da estrutura cromossômica, demonstrando uma cromotripsia importante, que promove a existência de um genoma desorganizado (BIAN et al., 2015; MORROW; KHANNA, 2015; VARSHNEY et al., 2016; CZARNECKA et al., 2020).

Este câncer tem uma origem metafisária, em sua maioria, afetando principalmente os ossos longos em humanos, como fêmur, tíbia e úmero, e é altamente metastático, no qual cerca de 25% de todos os pacientes têm um tumor secundário e esse está quase sempre localizado no pulmão. O osteossarcoma também pode metastizar para outros ossos, gânglios linfáticos e órgãos intra-abdominais e em qualquer uma dessas hipóteses, o prognóstico é pior (BIAN et al., 2015; MORROW; KHANNA, 2015; VARSHNEY et al., 2016; GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017; LIN et al., 2017; CZARNECKA et al., 2020).

A patologia afeta com maior frequência crianças e adolescentes (5 a 20 anos) e apresenta uma prevalência maior em homens do que mulheres na maioria dos países, logo, a idade e o sexo são fatores de risco da doença. Outros estudos demonstraram que peso ao nascer e altura, além de variantes genéticas germinativas, hormônios da puberdade e outros mecanismos relacionados ao crescimento ósseo são fatores de risco importantes para a etiologia do osteossarcoma (GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017; LIN et al., 2017; HARRISON et al., 2018; CZARNECKA, 2020).

Não se sabe ao certo os fatores etiológicos e mecanismos patogênicos do OS. Mutsaers e Walkley (2014) sugeriram que a célula-alvo originária desta neoplasia pode ser uma célula-tronco mesenquimal (MSC) ou uma célula comprometida com a linhagem osteoblástica. E através de evidências encontradas em murinos, qualquer um dos estágios celulares poderia dar início ao desenvolvimento de osteossarcoma (VARSHNEY et al., 2016; RICKEL; FANG; TAO, 2017)

Em razão da característica genética heterogênea, o osteossarcoma é constituído de múltiplas populações de células malignas. Além das alterações estruturais cromossômicas, essa neoplasia possui uma influência de genes polimórficos e da epigenética, como metilação de DNA, modificação de histonas e noncoding RNAs, nos quais pode-se enfatizar os microRNAs

(miRNAs). Portanto, esses fatores implementam maior complexidade a esse tumor e nenhum padrão genético consistente é identificado entre os pacientes (BIAN et al., 2015; BROWN; TELLEZ-GABRIEL; HEYMANN, 2017; GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017).

Em relação à epigenética, os fatores que têm demonstrado maior relevância na osteossarcomagênese são os noncoding RNAs (ncRNA), mais especificamente os microRNAs. Esses ncRNAs representam cerca de 80% das transcrições que ocorrem no genoma de acordo com a ENCODE (2021), porém são elementos transcritos que não codificam proteínas (ALDAITURRIAGA, 2015; MORROW; KHANNA, 2015).

Os miRNAs (<200pb) são reguladores epigenéticos que atuam no silenciamento pós-transcricional de um grande número de genes. Dentre os genes alvo desse tipo de RNA expressos no OS, estão membros de vias de sinalização essenciais para a patogênese da doença e, dessa forma, diversos estudos demonstraram que a expressão desregulada deles resulta na expressão aberrante de genes que desempenham papéis críticos na tumorigênese e progressão do osteossarcoma (ALDAITURRIAGA, 2015; MORROW; KHANNA, 2015).

Normalmente, o tratamento realizado é uma ação combinada quimioterapêutica com remoção cirúrgica, porém mesmo com os avanços cirúrgicos e quimioterápicos, a falta de compreensão dos mecanismos moleculares do OS impediu uma melhora significativa na sobrevivência dos pacientes nos últimos 50 anos e isso acaba tornando essa neoplasia uma das principais causas de mortalidade entre crianças e adolescentes por câncer. Ademais, esse sarcoma normalmente se torna resistente à essas terapias padrão, o que enfatiza a necessidade de identificação de novos alvos terapêuticos e melhores esquemas de tratamento (BROWN; TELLEZ-GABRIEL; HEYMANN, 2017; LIN et al., 2017).

Isto posto, este trabalho visa apresentar as alterações genéticas que influenciam nos mecanismos regulatórios e metabólicos da célula, de forma que possam contribuir para a elucidação de novos alvos terapêuticos para o osteossarcoma.

2. METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão bibliográfica no formato narrativo, que segundo Rother (2007) é uma publicação ampla, apropriada para descrever um tema e discutir o desenvolvimento de um determinado assunto, sob o ponto de vista teórico ou contextual. Constitui uma análise da literatura publicada em livros, artigos de revistas impressas e ou eletrônicas.

A busca foi realizada em portais bibliográficos como Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Google Acadêmico e EBSCOhost, livros disponibilizados pela biblioteca virtual do

CEUB e sites institucionais. As palavras-chave utilizadas foram: osteossarcoma, genética, miRNA e microRNA, sendo pesquisadas em português, inglês e espanhol, separadamente e aos pares com o auxílio do conector “AND/E”.

Foram selecionados 26 artigos científicos, 3 livros, 3 sites institucionais, publicados entre 2015 e 2021 nos idiomas inglês, espanhol e português e analisados na íntegra. Alguns artigos científicos (15) com data de publicação que antecedem esse período também foram incluídos no trabalho por serem considerados clássicos e relevantes para o tema.

Como critério para a seleção de dados da literatura e composição do presente trabalho, adotou-se o enfoque no osteossarcoma humano. Desta forma, artigos e informações sobre o osteossarcoma canino foram excluídos e não compõem o trabalho.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Retrospectiva Histórica

Em 1805, o termo “osteossarcoma” foi utilizado pela primeira vez por Boyer e descreveu tal patologia como uma entidade distinta de outras lesões ósseas mais frequentes. Mais de um século depois, em 1921, foi criado o Registro de Sarcoma Ósseo nos Estados Unidos da América (EUA), importante para a organização das informações e estudo da doença (BISPO JÚNIOR, 2009).

Até o início de 1970, o único tratamento disponível era a amputação do membro no qual se localizava a neoplasia e, mesmo assim, o prognóstico era totalmente desfavorável, de forma que apenas 10 a 25% dos pacientes não metastáticos sobreviviam. Nessa mesma década, teve-se a primeira evolução do tratamento de osteossarcoma primário, havendo a introdução e produção de uma terapia adjuvante que aumentou a sobrevida para 50%. Após esse momento significativo para a sobrevivência dos pacientes, as pesquisas foram ampliadas e os quimioterápicos doxorrubicina e metotrexato passaram a ser utilizados, em associação a outros, melhorando as taxas para aproximadamente 70% em pacientes com o câncer não metastático (CAMPANACCI et al., 1981; BISPO JÚNIOR, 2009; FRIEBELE et al., 2015).

Concomitantemente, vários estudos clínicos foram publicados visando identificar fatores prognósticos e a melhora da sobrevida global dos pacientes. Todavia, diversas metodologias foram utilizadas nestes estudos e os resultados se apresentaram inconsistentes, trazendo um viés sobre as variáveis analisadas (DAVIS; BELL; GOODWIN, 1994).

Na segunda metade da década de 70, Rosen e colaboradores (1976) induziram a quimioterapia neoadjuvante (pré-cirúrgica), para diminuir as taxas de metástase e facilitar a

cirurgia. Já em 1977, Huvos e colaboradores, idealizaram uma forma de avaliação do grau de necrose tumoral, por meio da porcentagem, através do estudo anatomopatológico da peça biológica. Com o desenvolvimento da ressonância magnética, em 1980, foi-se obtendo imagens mais detalhadas, que definiam melhor a extensão do tumor e suas bordas, facilitando o estadiamento regional da doença (SUNDARAM, 1993).

Com o objetivo de determinar a eficácia da quimioterapia sob o OS, surge em 1982, o *The Multi-Institucional Osteosarcoma Study* (MIOS), um estudo randomizado e controlado, que concluiu, por meio de análises preliminares, que houve uma diferença significativa na sobrevida dos pacientes: 61%, aos que receberam quimioterapia; 11%, aos que só realizaram cirurgia (LINK et al., 1991).

Em relação ao prognóstico, uma revisão sistemática de 8 artigos foi publicada por Davis, Bell e Goodwin em 1994, na qual concluiu que a necrose tumoral era a variável prognóstica mais importante para os pacientes com o câncer e fatores como gênero, idade, tamanho e localização do tumor não apresentaram significância. Entretanto, outros estudos da mesma década demonstraram que do fator prognóstico mais desfavorável da doença era a presença de metástases sistêmicas no diagnóstico inicial, obtendo uma sobrevida menor que 10% (BACCI et al., 1997; MEYERS; GORLICK, 1997; HARRIS et al., 1998).

Atualmente, a taxa de sobrevivência global de 5 anos, em casos metastáticos, é de 15 a 30%, enquanto na doença não metastática é de aproximadamente 70%. Logo, observa-se que não houve uma mudança expressiva ao longo de 50 anos, e por isso se torna tão necessário compreender os mecanismos genéticos, imunológicos e bioquímicos envolvidos na patogênese da doença e no microambiente tumoral. Essa necessidade se torna mais evidente ao saber que o OS é altamente metastático - cerca de 25% de todos os pacientes têm um tumor secundário e esse está quase sempre localizado no pulmão, podendo metastizar também para outros ossos, gânglios linfáticos e órgãos intra-abdominais e em qualquer uma dessas hipóteses, o prognóstico é pior (VARSHNEY et al., 2016; GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017; LIN et al., 2017; CZARNECKA et al., 2020).

3.2 Aspectos Epidemiológicos

De forma generalista, abrangendo os aspectos de idade e raça, o OS afeta 3,4 a cada 1.000.000 pessoas por ano no mundo. Entretanto, a taxa de incidência desta patologia varia de acordo com diversos de fatores, como sexo, raça, população, país e, principalmente, faixa etária. Logo, tem-se estabelecido que esse câncer atinge com maior frequência crianças e adolescentes (5 a 20 anos), com uma incidência de 3 a 4,5/1.000.000, possuindo um segundo pico em

pacientes idosos (maiores que 60 anos), variando de 1,5 a 4,5/1.000.000 por ano. Porém, essa bimodalidade apresenta certa discrepância na literatura, na qual alguns autores dizem que o segundo pico de incidência ocorre na meia-idade (40 a 55 anos). A presença de OS em pacientes mais velhos pode estar relacionada ao aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos e ao maior risco de doença óssea de Paget (PDB) (BIAN et al., 2015; VARSHNEY et al., 2016; CZARNECKA et al., 2020; SADYKOVA et al., 2020).

Em relação ao sexo, o OS apresenta uma prevalência maior em homens do que mulheres na maioria dos países, com a razão entre homem e mulher de 1,43:1, em menores de 24 anos, e de 1,28:1 na faixa etária de 25 a 59 anos. Não se sabe ao certo o motivo dessa maior prevalência no sexo masculino, mas sugere-se que esteja associada a alterações hormonais na puberdade e a um metabolismo celular maior para a formação óssea - osteogênese - nos homens, que normalmente têm uma estatura mais alta e um período mais longo de crescimento do esqueleto, o que aumenta a probabilidade de se ter erros na replicação dos osteoblastos e do futuro surgimento da neoplasia (GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017; CZARNECKA et al., 2020; SADYKOVA et al., 2020).

Ainda associado aos fatores de crescimento e ao prolongamento ósseo rápido, outros estudos demonstraram que o alto peso ao nascer e a altura maior que da média de um indivíduo estão correlacionados a uma maior predisposição ao OS, sugerindo que tanto na puberdade quanto no útero, o crescimento ósseo pode estar associado a patogênese deste câncer (GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017; SADYKOVA et al., 2020).

Como dito, a proporção da incidência entre homens e mulheres varia de acordo com diferentes populações: na Europa Ocidental, as mulheres com 60 anos ou mais apresentam uma maior incidência de osteossarcoma do que homens com a mesma idade, enquanto no Canadá e na Austrália, a ocorrência é aumentada em homens maiores de 75 anos. Dessa forma, a patologia apresenta uma frequência geográfica irregular, demonstrando que as taxas de incidência são variáveis, de acordo com o país e com a população (CZARNECKA et al., 2020; SADYKOVA et al., 2020).

Nos Estados Unidos, cerca de 900 novos casos são relatados por ano, de acordo com Czarnecka et al. (2020). Lá a ocorrência da patologia também foi descrita, por Mirabello, Troisi e Savage (2009a), com maior frequência em pacientes Asiáticos, das Ilhas do Pacífico e em negros, nos quais os dois primeiros grupos apresentaram taxas médias de 5,3 e os negros, de 5,1 por milhão, na faixa etária de 0 a 24 anos, em comparação a jovens brancos, hispânicos e índios estadunidenses (nativos do Alasca) que apresentaram taxas de 3 a 4,9/1.000.000. Dados semelhantes, sobre o grupo infanto-juvenil, foram apresentados na Itália, onde foi constatado

que há ainda mais casos entre os povos latinos: taxas de 7,0 - 7,6 para homens e de 3,5 - 4,9/1.000.000 para mulheres.

Este trabalho de Mirabello, Troisi e Savage (2009a) também demonstrou que as taxas são altas, em todas as idades, nas Filipinas e no Equador. Contudo, uma baixa prevalência da doença é vista em populações da América Latina e Asiáticas, como indianas, japonesas e chinesas. Uma alta incidência de osteossarcoma foi observada em dois países do continente africano, Uganda e Sudão, em comparação com populações europeias, o que foi corroborado por outra pesquisa de Mirabello, Troisi e Savage em 2009 (b), já que indivíduos afrodescendentes dos EUA apresentaram maiores incidências em relação à brancos.

Predisposições semelhantes, no segundo pico de faixa etária da doença, foram observadas, nas quais pessoas negras apresentaram 4,6/1.000.000 casos em paralelo a 3,7 casos em brancos não hispânicos, 3 em hispânicos, 2,9 em nativos do Alasca e 1,9 para povos asiáticos e das ilhas do Pacífico (MIRABELLO; TROISI; SAVAGE, 2009b).

Um estudo bem mais antigo, porém, mais abrangente, de Parkin e colaboradores (1988) demonstrou que casos de OS na Nigéria e Uganda foram elevados, além de altas taxas deste câncer ósseo terem sido relatadas entre afro-americanos, sugerindo a presença de uma predisposição ligada à raça do paciente.

Assim, parece que o osteossarcoma infanto-juvenil obtém mais diagnósticos no Sul europeu, África, Ásia, América do Sul e Ilhas do Pacífico, enquanto em maiores de 60 anos se torna mais prevalente no norte europeu, EUA e Austrália. Foi verificado inclusive que a Doença de Paget, anteriormente citada como um possível fator de risco para OS em idosos, é documentada com maior frequência nesses países, corroborando ainda mais para essa ser considerada predisponente da neoplasia (MIRABELLO; TROISI; SAVAGE, 2009a).

Isto posto, é vista uma maior incidência do câncer em jovens do sexo masculino de etnia africana, sustentado pelos resultados da pesquisa realizada na Nigéria, Uganda e Sudão, além das altas taxas detectadas em afrodescendentes, sugerindo predisposições genéticas e raciais à patologia. Entretanto, os estudos epidemiológicos populacionais sobre o osteossarcoma se encontram bem desatualizados e com poucas informações. Desse modo, os resultados se tornam menos precisos e enviesados (PARKIN et al., 1988; SADYKOVA et al., 2020).

Fatores socioeconômicos também foram apontados como influenciadores da incidência do OS, assim, pessoas de menor baixa renda têm essas taxas maiores, o que pode explicar a maior frequência em países africanos, além das de mortalidade. A educação tem grande impacto na sobrevivência do paciente, pois os cuidadores ou indivíduos com baixa escolaridade podem ter

dificuldade de compreender a gravidade da doença, podendo ocasionar demora na busca, ou até mesmo recusa, por atendimento médico (SADYKOVA et al., 2020).

Condições ambientais também foram apontadas como fatores predisponentes ao osteossarcoma. Alguns estudos demonstraram que a exposição à radiação está associada diretamente ao desenvolvimento deste câncer, de forma que dados foram apresentados mostrando que moradores de áreas com radiação variando de 1200 rads em poucas semanas a 24000 rads em 2 anos tinham maior probabilidade de desenvolver OS. Assim, o risco é uma função linear das doses locais de radiação (MIRABELLO; TROISI; SAVAGE, 2009a SADYKOVA et al., 2020).

Demais autores sugeriram que a exposição à água fluoretada era um fator de risco, dizendo que o estresse oxidativo e inflamatório induzido pelo elemento flúor poderiam contribuir com a patogênese da doença. Alguns outros componentes químicos foram também apontados como fator de risco para este câncer, como do metilcolantreno, sais de cromo, óxido de berílio (BeO), silicato de zinco berílio, amianto e corantes de anilina (SADYKOVA et al., 2020).

Em pacientes jovens, foi visto que as síndromes hereditárias de predisposição ao câncer podem estar associadas ao surgimento desse tumor, se tornando assim marcadores genéticos de risco. Assim, crianças e adolescentes que possuem retinoblastoma hereditário (Rb), Síndromes de Rothmund-Thomson, de Bloom, de Werner e, principalmente, de Li Fraumeni, estão mais suscetíveis à doença. Nessas síndromes ocorrem alterações em alguma das vias de sinalização: TP53, Rb, RecQ Like helicase 4 (CZARNECKA et al., 2020; SADYKOVA et al., 2020).

As mutações no gene Rb, levam à uma grande predisposição a esse câncer, e as alterações no loci p53, foram relatadas em 10-39% dos casos de osteossarcoma. Logo, quando essas duas mutações (Rb e p53) estão presentes, apresentam propriedades tumorigênicas sinérgicas. Apesar da patologia do OS não estar bem definida, essas modificações demonstraram uma associação importante, que pode ser caminho para a descoberta dos mecanismos moleculares desta neoplasia (CZARNECKA et al., 2020; SADYKOVA et al., 2020).

3.3 Histologia, Osteogênese e Osteossarcomagênese

O tecido ósseo serve de suporte para tecidos moles e músculos esqueléticos e protege os órgãos e a medula óssea, alojando-a. Além disso, funciona como depósito de cálcio, fosfato e outros íons. Esse tecido é do tipo conjuntivo especializado, formado por células de linhagem

osteoblástica (osteoblastos e osteócitos) e osteoclástica (osteoclastos) e por uma matriz óssea - composta por um material extracelular calcificado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A linhagem osteoblástica contém células derivadas de osteoprogenitoras de origem mesenquimal, enquanto os osteoclastos, formadores da segunda linhagem citada, são advindos de monócitos formados na medula hematopoiética. Os osteócitos são responsáveis por manter a matriz extracelular óssea, enquanto os osteoblastos a sintetizam (parte orgânica) e os osteoclastos a reabsorvem, remodelando o tecido. Ademais, todos os ossos são formados por duas membranas: o perióstio, na porção externa, e o endóstio, no interior, nos quais fornecem nutrição ao tecido e novos osteoblastos para o crescimento, a remodelação e a recuperação óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Assim, a osteogênese ocorre a partir da diferenciação das células mesenquimais - que são multipotentes e possuem capacidade de se diferenciar em células do tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso - em células precursoras dos osteoblastos. Essas, por sua vez, se diferenciam em células pré-osteoblásticas e posteriormente em osteoblastos. Esse último possui glicoproteínas, a osteonectina, que facilita a deposição de cálcio, e a osteocalcina (OCN), que auxilia na mineralização do osso e estimula a atividade osteoblástica. Após esse tipo celular sintetizar a matriz, é aprisionado e passa a ser chamado de osteócito e a expressar a osteopontina (OPN), uma sialoproteína que contribui na modelação óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; LIN et al., 2017).

Na síntese da matriz, há a incorporação das glicoproteínas OCN e osteonectina, da OPN e de colágeno, principalmente, formando a sua porção orgânica e de minerais, que representam a parte inorgânica. Essa, quando recém-formada, se deposita ao redor da célula osteoblástica e de seus prolongamentos, formando lacunas e canalículos. Quando a matriz ainda não está calcificada e está adjacente aos osteoblastos ativos, é denominada de osteóide. Essa diferenciação osteogênica é fortemente regulada, por várias vias de transdução de sinal, reguladores transcricionais, como o p53, e controladores do ciclo celular, por exemplo, o RB1 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; LIN et al., 2017).

O osteossarcoma é um câncer de alta complexidade e que apresenta uma grande heterogeneidade, sendo considerado uma das neoplasias mais complicadas em relação às alterações moleculares, o que dificulta a elucidação do mecanismos genéticos e bioquímicos responsáveis pela sua origem. Além disso, nenhum padrão genético consistente é encontrado nos tecidos ósseos afetados de pacientes. Dessa forma, existem duas hipóteses principais para explicar o seu desenvolvimento: por meio de osteoblastos ou de células tronco mesenquimais

(*mesenchymal stem cell* - MSC) (BROWN; TELLEZ-GABRIEL; HEYMANN, 2017; GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017; LIN et al., 2017).

A primeira hipótese propõe que o câncer se inicia pela diferenciação defeituosa das células comprometidas com os osteoblastos (pré-osteoblásticas), de forma somática. Entretanto, a hipótese MSC preconiza que uma célula tronco mesenquimal portadora de uma mutação, dará origem ao osteossarcoma, tendo assim uma origem germinativa. Esse evento, produziria então, uma complexidade cariotípica que é tolerada pelas células mesenquimais e que seria disseminada para as linhagens de diferenciação óssea (MORROW; KHANNA, 2015; LIN et al., 2017).

Essa segunda hipótese é sustentada por uma pesquisa de WANG e colaboradores (2017), na qual células mesenquimais humanas foram modificadas para esgotar RB1, um gene supressor tumoral que frequentemente apresenta variantes no OS, e superexpressar o oncogene c-MYC, que também tem sido encontrado com variações na patologia. Essa associação da baixa expressão do RB1 e, grande, do c-MYC, tem sido observada em pacientes com baixa sobrevida na doença e, assim, as MSC adquirem propriedades semelhantes ao osteossarcoma. Essas células mesenquimais também passaram a expressar marcadores CD99, *alkaline phosphatase* (ALP), osteonectina e osteocalcina, normalmente presentes no câncer *in natura*, e formaram metástases pulmonares e hepáticas em modelos murinos imunocomprometidos, sugerindo que de fato essas células estão associadas a origem celular do OS (LIN et al., 2017).

Já a hipótese dos osteoblastos decorre de estudos de MSCs derivadas de camundongos mutantes para Trp53 (equivalente do gene TP53 em humanos), mostrando que essa mutação pode gerar uma osteogênese precoce e impede a ocorrência da maturação final dos precursores osteoblásticos, que apresentam osteopontina, em osteoblastos maduros, em que seu marcador é a osteocalcina. Para mais, a depleção de Trp53 ou dele em conjunto com o RB1 em MSCs derivadas da medula óssea de murinos (BM-MSCs), levou a formação de tumores de osteossarcoma. Todavia, em células onde não houve a diferenciação das BM-MSCs e das derivadas de células adiposas em murinos (BM-ASCs), tumores semelhantes ao de leiomiossarcoma foram desenvolvidos e não de osteossarcoma. Assim, tem-se a corroboração de que a diferenciação das MSCs é essencial para o desenvolvimento da patologia (LIN et al., 2017).

Em outra hipótese sugerida, considerando a variabilidade presente em amostras de OS de pacientes, tanto os osteoblastos como as MSCs podem associar-se a osteossarcomagênese. Foi relatado por Quist e colaboradores (2015) que a fisiopatologia do câncer cursou com a perda da função dos genes supressores de tumor (Trp53 e RB1), mesmo após alguns osteoblastos

estarem totalmente maduros e minimamente proliferativos. Logo, nesse caso, o OS poderia surgir de osteoblastos maduros e, sendo assim, tem-se a união das duas hipóteses (LIN et al., 2017).

Assim, apesar de ainda haver um debate sobre as células de origem do osteossarcoma, é comumente aceito que a expressão gênica e do fenótipo celular do câncer estão relacionados à osteogênese. Outro fator é que alterações genéticas específicas possam ser determinantes na desenvoltura desta neoplasia (MORROW; KHANNA, 2015; LIN et al., 2017).

3.4 Aspectos Genéticos

Devido a raridade do osteossarcoma, o estudo estatístico sobre alterações genéticas é limitado, tornando as análises genotípicas e genômicas mais difíceis. Dessa forma, o N amostral limitado interfere na avaliação da frequência e das consequências funcionais das anormalidades genéticas com segurança. A complexidade deste câncer, que será descrita adiante, é outro fator que dificulta determinar seus mecanismos genéticos, que incluem desde síndromes genéticas (mutações germinativas), associadas ao seu desenvolvimento, até mutações somáticas ou fenômenos epigenéticos (MORROW; KHANNA, 2015).

3.4.1 Síndromes Genéticas

As síndromes hereditárias predisponentes ao OS se encontram bem definidas na literatura, como a Síndrome de Li-Fraumeni (gene TP53) e o Retinoblastoma Hereditário (gene RB1), sendo demonstradas na tabela 1. Todavia, muitos desses genes e vias são comumente modificados por mutações somáticas no osteossarcoma, sendo diferenciados apenas pelo mecanismo de mutação (MORROW; KHANNA, 2015; CZARNECKA et al., 2020).

Tabela 1. Síndromes hereditárias predisponentes ao osteossarcoma e porcentagem de indivíduos síndrômicos diagnosticados com o tumor.

Síndrome	Genes mutados	Indivíduos com osteossarcoma (%)
Síndrome de Li-Fraumeni	TP53	12
Retinoblastoma hereditário	RB	7
Síndrome de Rothmund-Thomson tipo II (RTS II)	RECQL4	32
Síndrome de RAPALIDINO	RECQL4	13,3

Síndrome de Werner	WRN	_*
Síndrome de Bloom	BLM	_*
Síndrome de Diamond-Blackfan	RPS19, RPL5, RPL11, RPL35A, RPS24, RPS17, RPS7, RPS10, RPS26	5,4% 0,9%

*Dados não encontrados.

Fonte: Adaptado de CZARNECKA et al., 2020.

Assim, a comunidade científica evidenciou que os genes TP53, RB1 e os genes relacionados às vias RecQ estão associados à patogênese do osteossarcoma, sendo assim, mais enfatizados, como já citado e melhor descrito adiante. Na tabela, pode-se observar outros genes – BLM, WRN e a família do RPS, *Ribosomal Protein* - que originam síndromes genéticas e podem estar associados com o desenvolvimento da neoplasia maligna (CZARNECKA et al., 2020; SADYKOVA et al., 2020).

3.4.2 Mutações Somáticas e Anormalidades Genéticas

Este cenário mutacional do osteossarcoma varia significativamente entre tumores de pacientes, sendo designado como altamente complexo, o que gera a chamada heterogeneidade intertumoral, na qual dificulta a elucidação da patogênese molecular e, conseqüentemente, na identificação de novos alvos terapêuticos. Assim, diferenciando-se de outros sarcomas, o OS não possui translocações canônicas, isto é, que seguem um padrão ou certa regularidade, e nem uma única mutação patognomônica (MORROW; KHANNA, 2015).

Dentre as alterações, são vistas anormalidades dos cromossomos, nas quais a instabilidade cromossômica (CIN) é muito frequente, normalmente caracterizada por um alto grau de perdas e ganhos de cromossomos ou de apenas seus segmentos, gerando diversos rearranjos cromossômicos. Esse desequilíbrio resulta de uma perda de função no ponto de verificação celular e nas vias de resposta a danos no DNA. A manutenção errônea dos telômeros por meio do alongamento alternativo (ALT), no qual ocorre a permuta intercromossomial da região telomérica, também já foi verificada como um fator que decorre na CIN (MORROW; KHANNA, 2015).

Em relação às alterações numéricas, euploidias são identificadas no tecido tumoral, podendo variar de uma haploidia (n) até uma hexaploidia (6n). No meio de todas essas alterações, foram identificadas aneuploidias também, nas quais o cromossomo 1 é o que mais tem ganho, enquanto os cromossomos 9, 10, 13 e 17, frequentemente, são mais perdidos. Já

associado às alterações estruturais, exclusões de porções específicas dos cromossomos 3, 6, 9, 10, 13, 17 e 18 são mais comuns, em contrapartida que as ampliações de partes do 1, 6, 8 e 17 são mais vistas. Essas regiões codificam, respectivamente, uma série de supressores tumorais e oncogenes (MORROW; KHANNA, 2015).

A extensa heterogeneidade do osteossarcoma é demonstrada no estudo de Kovac e colaboradores (2015), no qual foi realizado o sequenciamento do exoma, em que 14 *driver genes* foram descritos, presentes em 87% dos casos de OS, entre eles: TP53, RB1, RECQL4, BRCA2, PTEN e WRN. Esses genes, também denominados de genes condutores, possuem mutações *drivers* que estão diretamente envolvidas com a oncogênese, ativando cascatas de sinalização intracelulares. Todavia, esses genes também podem possuir mutações passageiras, do inglês *passenger*, que não estão vinculadas à oncogênese. Porém, os autores sugeriram que nenhum desses genes condutores identificados são a causa do tumor e que diversas vias oncogênicas causariam instabilidade genética e acarretariam no desenvolvimento do OS.

Essa anormalidade cromossômica influencia na expressão de oncogenes, como o c-Myc (que se encontra superexpresso em pelo menos 34% dos OS e, amplificado de 7 a 67% desses tumores), das vias do p53 e do RB1, e silenciamento de genes supressores tumorais (TSGs), das mesmas vias. Os genes TP53, RB1, c-Myc e RECQL4 são frequentemente descritos na literatura, por se associarem ao OS tanto em mutações somáticas quanto germinativas (MORROW; KHANNA, 2015).

O gene TP53 está localizado no 17p13.1 e codifica a p53, uma proteína supressora de tumor, que é expressa quando há sinais de lesão celular, como, por exemplo, hipóxia, expressão de oncogenes, estresse oxidativo e danos ao DNA. Em resposta a esses estresses celulares, essa proteína regula a expressão de seus genes-alvo, induzindo a parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo de DNA ou alterações no metabolismo. No OS, são encontradas mutações indel, missense, nonsense, SNPs e SVs nesse gene (CZARNECKA et al., 2020; THOENEN; CURL; IWAKUMA, 2020; GENE CARDS, 2021e).

Mutações no TP53 podem ocorrer em até três quartos dos pacientes com câncer, sendo assim, bem relevante para a doença. Não é à toa que a síndrome de Li-Fraumeni (LFS), na qual 70% dos casos são ocasionados pela herança de uma mutação germinativa nesse gene, é considerada predisponente do osteossarcoma e, este câncer, por sua vez, ocorre em 5 a 12% dos pacientes com LFS. Nas mutações *missense* do TP53 há a substituição de um aminoácido, alterando a p53, que passa a ser expressa de forma estável em células tumorais, tornando o TP53 um oncogene, fato que mostrou promover a proliferação, sobrevivência, migração,

metástase e quimiorresistência das células cancerígenas (MORROW; KHANNA, 2015; TANG et al., 2019; CZARNECKA et al., 2020).

Já o gene RB1, é um regulador negativo do ciclo celular, sendo crítico na transição da fase G1 para S e encontra-se situado no 13q14.2, codificando uma proteína supressora tumoral. Alterações no RB1 são frequentemente encontradas em pacientes pediátricos de OS (30 a 75% dos casos) e sua grande maioria é composta por SVs ao invés de mutações de ponto, sendo a perda da heterozigose (LOH) em 13q a modificação mais comum, compondo de 60 a 70% de todos os casos de mutação no gene. Rearranjos estruturais são observados em 30% das alterações, enquanto apenas 10% são representadas por mutações de ponto. No osteossarcoma, a LOH para RB1 normalmente é indicativo de mau prognóstico (CZARNECKA et al., 2020; WU; LIVINGSTON, 2020; GENE CARDS, 2021c).

A mutação do RB1 é uma das principais causas da Síndrome de Retinoblastoma (herança autossômica dominante) e a incidência do sarcoma ósseo em pacientes que a possuem é cerca de 400 vezes maior do que em pessoas normais. Diante disso, entende-se porque essa síndrome hereditária é um fator de risco para o osteossarcoma (CZARNECKA et al., 2020).

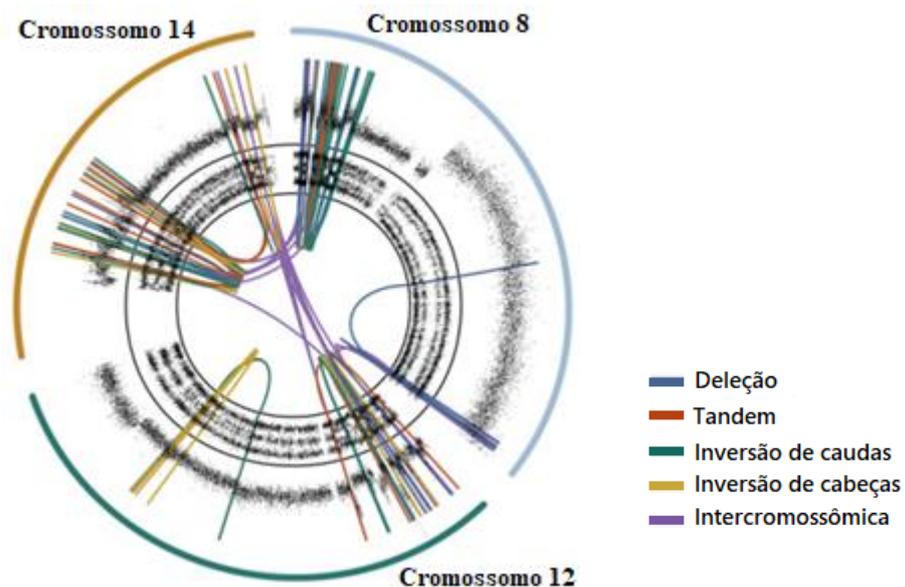
Ademais, tem-se o c-Myc (MYC), um proto-oncogene localizado no 8q24.21 e que codifica uma fosfoproteína nuclear que atua na progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular, sendo superexpresso em 34% dos tumores. No osteossarcoma, esse gene se encontra amplificado em 7-67% dos casos e é significativamente mais regulado positivamente em amostras metastáticas. Logo, desempenha um papel na metástase e tem uma associação com o prognóstico da doença (MORROW; KHANNA, 2015; CZARNECKA et al., 2020; GENE CARDS, 2021b).

Por fim, dentre os genes citados anteriormente, tem o RECQL4, outro supressor tumoral, situado no 8q24.3 e que codifica uma DNA helicase, pertencente à família das RecQ helicases. Essa proteína apresenta função de anelamento ao DNA dupla fita e o desenrola em fita simples para realizar reparos no DNA. Duas síndromes estão associadas a disfunções nesse gene: a Rothmund-Thomson tipo II (RTS II) e a de Rapalidino. Um estudo de análise de 33 casos de RTS evidenciou uma associação entre mutações de truncamento do gene e do desenvolvimento de OS. Em outra pesquisa, foi visto que 61 cânceres foram relatados em pacientes com RTS, sendo que 62% desses (38 casos) eram osteossarcoma. Com relação à síndrome de RAPALIDINO, extremamente rara, foi demonstrado que 2 a cada 15 pacientes desenvolvem o câncer em questão (CZARNECKA et al., 2020; GENE CARDS, 2021d).

Logo, a característica genética mais presente e marcante nos tumores de OS é esta amplitude de mudanças genotípicas em relação ao tecido ósseo normal. Recentemente, foi

verificado um novo mecanismo de mutação, denominado de cromotripsia (figura 1), que ocorre em cerca 25% dos osteossarcomas (intervalo de confiança do estudo foi de 95%, assim pode variar de 10 a 49%), um número bem elevado quando comparado aos 2-3% de frequência em todos os outros cânceres, segundo Stephens e colaboradores (2011). Todavia, um estudo publicado na Nature Genetics em 2020, de Cortés-Ciriano e colaboradores, demonstrou ser ainda mais frequente esse evento, ocorrendo em 77% dos osteossarcomas (MORROW; KHANNA, 2015; LIN et al., 2017).

Figura 1. Paciente com osteossarcoma com 88 rearranjos cromossômicos envolvendo os cromossomos 8, 12 e 14, demonstrando uma cromotripsia.



Fonte: Adaptado de STEPHENS et al., 2011.

A cromotripsia é um processo caracterizado por massivos rearranjos cromossômicos adquiridos em um único evento catastrófico, em um único cromossomo ou em mais de um. Essa cromotripsia normalmente está acompanhada da kataegis, um fenômeno no qual ocorre uma hipermutação regional, ou seja, há múltiplas mutações de bases ocorrendo em um ou vários loci no genoma. No OS, essa se encontra com uma prevalência que varia de 50 a 85%, de acordo com pequenas coortes de amostras. Ambos os eventos estão representados de forma simplificada a seguir, na figura 2 (RICKEL; FANG; TAO, 2017; CZARNECKA et al., 2020):

O esperado para células normais que sofressem esse evento, de dezenas de quebras do DNA simultaneamente, seria a morte celular, entretanto qualquer célula que sobreviva a isso,

provavelmente terá uma vantagem de crescimento seletivo, promovendo a progressão ao câncer (RICKEL; FANG; TAO, 2017).

Figura 2. Representação esquemática dos eventos de cromotripsia (A) e kataegis (B).



Fonte: Adaptado de CZARNECKA et al., 2020.

Durante a cromotripsia, *driver genes* podem surgir simultaneamente por diversos mecanismos: diminuição do número de cópias (exclusão de TSGs), aumento do número de cópias (amplificação dos oncogenes), união de um gene intacto com um promotor de outro gene (resultando na desregulação da expressão gênica) e justaposição da porção de codificação de dois genes (gerando oncoproteínas de fusão) (BROWN; TELLEZ-GABRIEL; HEYMANN, 2017; RICKEL; FANG; TAO, 2017).

A cromotripsia pode ser advinda da “telômero crises” durante a tumorigênese, na qual há a redução e perda dos telômeros, promovendo fusões cromossômicas e cromossomos dicêntricos, que são quebrados durante a mitose celular, passando por ciclos de quebra de ponte de fusão (BFB), que resultam em centenas de fragmentos de DNA mediados por TREX1 (um gene que codifica uma enzima de reparo, a exonuclease 1) (RICKEL; FANG; TAO, 2017).

3.4.3 *Single Nucleotide Polymorphism - SNPs*

Resultados do sequenciamento do genoma pelo *Genome Wide Association Study* (GWAS) de tumores de osteossarcoma foram comparados com DNA de linha germinativa correspondente de pacientes afetados e, assim, obteve-se a identificação de altas taxas de variações estruturais (SVs) - alteração do DNA em uma região maior que 1kb, decorrente de mutações - e de alterações no número de cópias (CNAs), que são os genes duplicados ou deletados em uma área repetida. Em contrapartida, foram encontradas baixas taxas de polimorfismos de nucleotídeos únicos, os SNPs (LIN et al., 2017).

Esse achado se mostra consistente com a cromotripsia, pois indicou que lesões cromossômicas por SVs e CNAs são o principal mecanismo genético envolvido na patogênese do câncer. Apesar dos SNPs não serem muito comuns no OS, alguns estão sendo associados ao risco de desenvolvimento da doença, como nos genes de CTLA-4, RECQL, TNF- α , TP53 e

VEGF. Tanto SVs quanto SNPs podem resultar em mutações inativadoras da via p53, presente em aproximadamente 95% dos casos do tumor (MORROW; KHANA, 2015; LIN et al., 2017; WANG; LIU, 2018).

3.4.4 Epigenética

Apesar do osteossarcoma ser classicamente definido como uma patologia decorrente de mutações genéticas, a literatura tem demonstrado que mecanismos epigenéticos, que alteram a expressão de genes sem modificar a sequência de suas bases, estão associados ao desenvolvimento e progressão deste câncer. Entre esses mecanismos, pode-se evidenciar a metilação do DNA, modificação de histonas e os non-coding RNA (ncRNA) (MORROW; KHANNA, 2015).

A metilação do DNA ocorre no carbono 5 da citosina que está associada a uma base nitrogenada guanina e, normalmente, é inversamente proporcional à expressão do gene. Outros membros das vias de sinalização dos genes RB1 e TP53 foram demonstrados como silenciados no osteossarcoma, entretanto não há evidências fortes que o silenciamento direto desses genes apresente correlação com o OS. Ademais, foram encontrados numerosos TSGs regulados negativamente por meio desse mecanismo no câncer. Todavia, a modificação de histonas pode seguir dois caminhos: a metilação, fazendo com que seja menos transcrito, como visto, ou a acetilação, que por outro lado, favorece a transcrição (MORROW; KHANNA, 2015; MENCK; SLUYS, 2017).

Adiante, tem-se outro mecanismo associado ao osteossarcoma: os ncRNAs, também chamados de RNAs não codificantes, intitulados assim por fazerem parte da porção de todo o DNA que é apenas transcrita (75%), sem ser traduzida e poder codificar uma proteína - foi verificado que apenas 1 a 2% do genoma possuem genes que codificam proteínas. Esses podem ser classificados de acordo com o seu tamanho em longos (lncRNAs), com mais de 200pb de comprimento, ou pequenos (sRNAs, com <200pb), que são representados em sua grande maioria pelos microRNAs (miRNAs), que apresentam de 20 a 24pb (MORROW; KHANNA, 2015; MENCK; SLUYS, 2017).

Os ncRNAs são determinantes da expressão gênica durante o desenvolvimento celular normal e como outras formas de controle, por isso, aberrações na regulação do gene por esses RNAs pode levar ao desenvolvimento de tumor. Diversos estudos publicados têm demonstrado o papel de alterados RNAs não codificantes na osteossarcomagênese, progressão e prognóstico tumoral do câncer, com maior ênfase nos miRNAs desregulados, já que se sabe que mais de 600 miRNAs participam da regulação da osteogênese. Assim, pressupõe-se que alterações

nesses microRNAs são predisponentes a doenças ósseas (ALDAITURRIAGA, 2015; MORROW; KHANNA, 2015).

Os miRNAs silenciam genes pós-transcricionalmente, se ligando a transcritos de RNA mensageiro (RNAm) e formando o complexo miR-RISC, o qual inibe a tradução desse RNA ou induz à sua degradação, por meio da clivagem. Esses genes podem estar envolvidos em diversos processos biológicos, como desenvolvimento, diferenciação e proliferação celular. Alguns genes-alvo de miRNAs expressos no OS são constituintes de vias de sinalização para a patogênese do tumor, incluindo NOTCH, RAS, WNT e proteína cinase ativada por mitógeno (MORROW; KHANNA, 2015).

Os miRNAs podem apresentar um aumento da sua expressão, sendo regulados positivamente, ou uma diminuição, caracterizando a regulação negativa. Toda essa regulação, mediada pelos microRNAs, pode ser alterada tanto por modificações ao nível dessas (genes de processamento, por exemplo) ou na sequência de ligação ao alvo. No primeiro caso, qualquer alteração nesses genes pode afetar as miRNAs que, conseqüentemente, afetarão os genes-alvo. Dessa forma, SNPs nos genes de processamento, pri-, pré-miRNA e miRNA maduro podem desencadear a desregulação. A tabela a seguir (tabela 2) apresenta um pequeno número de miRNAs já associados ao osteossarcoma, por meio de uma regulação negativa ou positiva (ALDAITURRIAGA, 2015; MORROW; KHANNA, 2015).

Tabela 2. Alguns dos miRNAs regulados positivamente e negativamente em pacientes com osteossarcoma.

miRNAs regulados negativamente	miRNAs regulados positivamente
miR-16, miR-31, miR-34, miR-133a, miR-137, miR-143, miR-150, miR-183, miR-199a-3p, miR-218, miR-335, miR-340, miR-449c, miR-539, miR-539-3p, miR-3928	miR-20a, miR-21, miR-27, miR-29a, miR-106, miR-126, miR-148a, miR-195, mirR-221, mi-R-218, miR-574-3p

Fonte: Adaptado de MORROW; KHANNA, 2015; CZARNECKA et al., 2020.

MicroRNAs circulantes têm sido promissores biomarcadores por sua alta estabilidade (estão ligados a proteínas ou envoltos por vesículas), facilidade de isolamento e detecção, além de descomplicada detecção nos fluidos corporais, com composição química simples, altamente conservados entre as espécies e expressos de maneira específica para cada tecido. No OS, metástases e recidiva da doença são as principais causas de mortalidade, por isso a identificação

de biomarcadores se tornariam úteis para o monitoramento da carga tumoral ou a detecção precoce da doença, para assim, adiantar o tratamento e o seu sucesso (NAKKA et al., 2017).

Um estudo em coorte, sobre o perfil de miRNA de todo o genoma em amostras de tumor em pacientes e do plasma em controles, foi realizado por Nakka e colaboradores (2017), no qual foram avaliados 752 miRNAs. Nessa pesquisa, foi visto que 220 miRNAs de plasma eram expressos diferentemente entre os pacientes e o grupo controle. Assim, concluiu-se que 164 miRNAs eram regulados negativamente e 56 miRNAs, positivamente, em amostras de OS em comparação com ao plasma do grupo controle. Dentre esses miRNAs, estavam o miR-221, miR-21 e miR-106a, sendo expressos de forma significativamente maior na circulação dos pacientes oncológicos, o que foi corroborado por outros estudos (NAKKA et al., 2017).

No sistema operacional, níveis elevados de miR-21 circulante foram correlacionados com metástases iniciais, pior resposta do tumor à quimioterapia neoadjuvante e reduzida taxa de sobrevivência global. Já o miR-221, demonstrou ser um biomarcador de diagnóstico e prognóstico para a sobrevida livre global e de recorrência. Ambos estão regulados positivamente, no sangue periférico de pacientes de OS. Ademais, foi evidenciado que o miR-21, também se encontra regulado de forma positiva nos tecidos tumorais do OS, em relação aos controles ósseos (MORROW; KHANNA, 2015; NAKKA et al., 2017, CZARNECKA et al., 2020).

Já Gong e Gong (2018) evidenciaram a regulação positiva do miR-221 em tecidos de osteossarcoma e nos tecidos saudáveis adjacentes, algo que não pôde ser concluído na pesquisa de Nakka e colaboradores (2017), devido ao baixo N amostral nesse parâmetro. Logo, esses últimos observaram essa expressão no tecido apenas no miR-21. Entretanto, os achados de Gong e Gong são consistentes com outros estudos (YANG et al., 2015; ZHU et al., 2015).

Assim, o miR-221 se tornou relevante no OS. Esse é codificado a partir de agrupamentos de genes localizados no cromossomo Xp11.3 e apresenta papéis biológicos importantes na regulação da tumorigênese, progressão do tumor e proliferação das células tumorais, fenótipo das células tronco, quimiorresistência e radioresistência. Alguns alvos conhecidos do miR-221 são: PTEN e as proteínas supressoras de tumor p27 e p57. A superexpressão desse micro-RNA é diretamente proporcional ao tamanho e estágio do tumor. Todavia, associações significativas não foram encontradas entre os níveis de miR-221 e idade, sexo, localização tumoral e tipo patológico (YANG et al., 2015; NAKKA et al., 2017; GONG; GONG, 2018; GENE CARDS, 2021a).

Também foi estabelecida uma relação entre a alta expressão do miR-221 com o prognóstico da doença por Gong e Gong (2018), uma vez que, ao fim da pesquisa, foi

demonstrado que a sobrevida global ($P < 0,01$) de pacientes com uma maior expressão do miR-221, foi menor do que àqueles com uma baixa expressão. Desta forma, a superexpressão deste microRNA foi relacionada a uma tendência a invasão, metástase precoce e menor tempo para recorrência de recidiva.

Os mecanismos moleculares entre o miR-221 e o seu papel na tumorigênese do OS não são esclarecidos, entretanto estudos recentes demonstraram que essa superexpressão do miR-221 promoveria a proliferação de células cancerígenas através da supressão dos supressores tumorais p27 e p57 e suas vias CDKN1B e CDKN1C. O efeito do miR-221 também induziria a sobrevivência celular e a resistência à cisplatina por meio da via PI3K/Akt no osteossarcoma, sugerindo um alvo em potencial para o tratamento da doença (GONG; GONG, 2018).

A via PI3K/Akt é regulada negativamente pelo gene PTEN (fosfatase homóloga à tensina), um supressor tumoral, que estimula a apoptose e a parada da proliferação e do crescimento celular ao atuar na via de sinalização. Zhu e colaboradores (2015) demonstraram que o PTEN foi regulado para baixo no osteossarcoma e linhagens celulares osteoblásticas. Assim, tem-se uma relação inversamente proporcional entre a expressão do miR-221 e do PTEN, na qual o PTEN tem uma regulação para baixo no grupo de pacientes que apresentam o miR-221 superexpresso, enquanto no grupo com bloqueio do miR-221 há uma melhora na expressão deste gene (MATSUO, 2015; NELSON; COX, 2019).

Primeiramente, a ativação dessa via ocorre com a ligação de fatores de crescimento e citocinas a receptores de tirosina cinases (RKTs) na membrana. Assim, a PI3K é ativada e intermedia a fosforilação da PIP2 (fosfatidilinositol-3,4-bifosfato) em PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) na porção interna da membrana plasmática, pela transferência de um grupo fosforila do ATP celular (MATSUO, 2015; NELSON; COX, 2019).

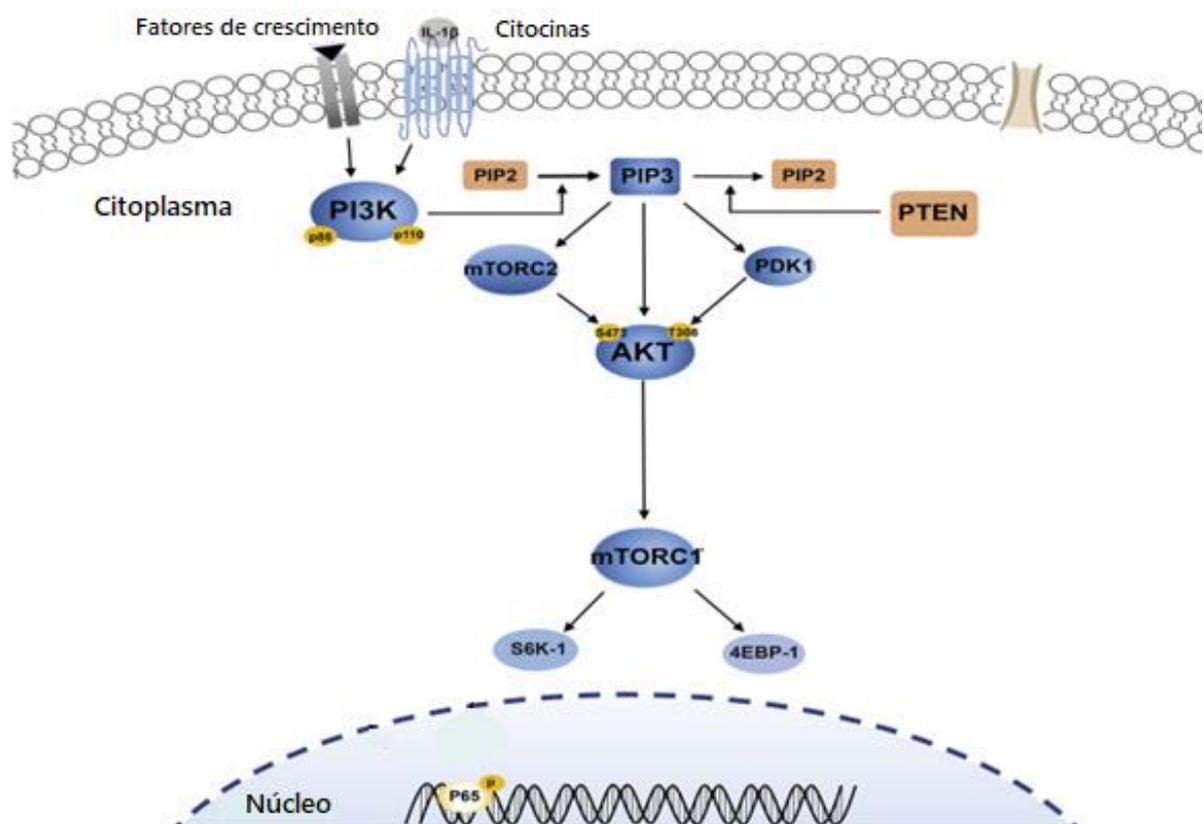
Tal fosforilação desencadeia no recrutamento de proteínas como a Akt e o fosfoinosítídeo Pdk 1. Dessa forma, a Akt interage com a PIP3, alterando conformacionalmente essa proteína, de modo em que há a exposição dos resíduos dos aminoácidos treonina 308 (Thr308) e serina 473 (Ser473), permitindo a fosforilação desses sítios pelo Pdk 1 e pelo complexo mTORC2. Assim, a Akt fica ativa e capaz de fosforilar diversos substratos (MATSUO, 2015; NELSON; COX, 2019).

Essa via desencadeia uma cascata que culmina em diversos eventos, como o crescimento celular, a sobrevivência celular e a angiogênese, através do S6K-1 e 4EBP-1. Tais ocorrências são inibidas pela PTEN, que atua convertendo a PIP3 em PIP2, de forma contrária à via. Entretanto, como já sinalizado, o silenciamento da PTEN pelo miR-221 no

osteossarcoma, leva à retomada dessa via de ativação e ao aparecimento de tumores (figura 3) (MATSUO, 2015; NELSON; COX, 2019; SUN et al., 2020).

Desta forma, o miR-221 contribui para a proliferação das células tumorigênicas, invasão e migração por meio da regulação negativa ou supressão do PTEN. Enfatiza-se que muitos dos processos epigenéticos podem ser afetados por modificações na sequência do DNA e vice-versa, mostrando que a regulação genética e epigenética é inextricável no comportamento celular do osteossarcoma (MORROW; KHANNA, 2015; ZHU et al., 2015).

Figura 3. Via de sinalização da PI3K/Akt e regulação mediada pelo PTEN.



Fonte: Adaptado de SUN et al., 2020.

3.5 Aspectos Clínicos e Diagnósticos

O osteossarcoma normalmente ocorre em ossos longos do esqueleto apendicular e, raramente, na pelve e na porção esquelética axial, desenvolvendo-se em locais de rápido crescimento ósseo e predisposto à metáfise óssea, principalmente na porção proximal da tíbia e do úmero e no fêmur distal em pacientes com menos de 40 anos. Logo, a tendência para se ter esse câncer em ossos não longos aumenta conforme a idade (MUTSAERS; WALKLEY, 2014;

ALDAITURRIAGA, 2015; BROWN; TELLEZ-GABRIEL; HEYMANN, 2017; GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017).

Esse tumor tem uma clínica agressiva, na qual tem-se a destruição óssea e dos tecidos moles adjacentes, sendo também muito frequente a ocorrência de metástases, principalmente nos pulmões, como mencionado anteriormente. Geralmente a investigação é iniciada devido ao inchaço e à dor locais - cerca de 90% dos pacientes infanto-juvenis relataram dor antes do diagnóstico e essa, por sua vez, pode ser constante ou associada a algum esforço. Dificuldade de locomoção, caso esteja localizado na perna, de movimento ou imobilidade da articulação da extremidade afetada podem ser vistos. Os sintomas podem estar presentes por um tempo duradouro antes de se haver a suspeita e o diagnóstico (MUTSAERS; WALKLEY, 2014; VARSHNEY et al., 2016; GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017).

O diagnóstico é dado definitivamente por meio de uma biópsia, que determina o subtipo histológico específico da doença, mas antes alguns exames menos invasivos são realizados para direcionar a investigação: raio-x, tomografia computadorizada, ressonância magnética, cintilografia óssea e tomografia por emissão de pósitrons. Nas radiografias, é frequentemente encontrada uma reação periosteal em “raios de sol” ou em triângulo de Codman no osso afetado. A diagnose deve ser diferencial para osteomielite, outros tumores ósseos primários, como por exemplo o sarcoma de Ewing e o condrossarcoma, metástase de outros cânceres (neuroblastoma, linfoma e rabdomiossarcoma) e neoplasias benignas ósseas (VARSHNEY et al., 2016; GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017; ACS, 2021).

A patologia é o tumor ósseo primário maligno mais comum no mundo, apesar de ser raro em comparação a outras neoplasias, e é caracterizado pela presença de um tecido osteóide e presença de células mesenquimais malignas. Na biópsia, há essa observação para determinação de qual subtipo histológico aquele osteossarcoma está inserido (MUTSAERS; WALKLEY, 2014; MORROW; KHANNA, 2015; GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017).

Essas subclassificações dependem das características tumorais (de grau e de localização) e da diferenciação estromal preponderante - osteoblástica, fibroblástica, condroblástica, de células pequenas, superfície telangiectásica e extra esquelética. Assim, histologicamente, essa neoplasia se difere em três: de alto grau, na qual apresenta a maioria das características citadas; de grau intermediário, normalmente periosteal, com sua origem na camada interna do periósteo; e de baixo grau de malignidade, como o parosteal, que atinge a parte externa do periósteo (BIAN et al., 2015; MORROW; KHANNA, 2015; GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017; CZARNECKA et al., 2020).

Dessa forma, tem-se estabelecido que o osteossarcoma convencional ou clássico refere-se a neoplasia de alto grau (osteoblástica, fibroblástica e condroblástica) com crescimento intramedular, que é responsável por 70-85% dos casos de OS infanto-juvenis. Outros subtipos são o gnático, que atinge a mandíbula, e o secundário, ambos mais raros (GIANFERANTE; MIRABELLO; SAVAGE, 2017; CZARNECKA et al., 2020).

3.6 Tratamento

No tratamento do OS, normalmente existe uma associação entre quimioterapia e remoção cirúrgica, de preservação do membro ou de amputação. A quimioterapia é realizada frequentemente antes e após a retirada do tumor, visando suprimir também o desenvolvimento de metástases. Em pacientes não metastáticos no momento do diagnóstico, essa terapia combinada com quimioterapia multimodal (associação de diversos quimioterápicos em altas doses) resultou em um aumento da sobrevivência para aproximadamente 70%, pois antes o tratamento era apenas cirúrgico e com uma sobrevida de 10-20%. Não obstante, pacientes com sucesso neste tratamento para OS podem vir a desenvolver segundos tumores, incluindo um osteossarcoma adicional (MUTSAERS; WALKLEY, 2014; BIAN et al., 2015; VARSHNEY et al., 2016; CZARNECKA et al., 2020).

Dentre a quimioterapia multimodal, o esquema de tratamento mais utilizado baseia-se no uso de metotrexato de alta dose (HDMTX), doxorubicina (Adriamicina) e cisplatina (Platina), chamado de MAP, sendo a quimioterapia neoadjuvante e adjuvante mais utilizada nos EUA, Europa e aqui no Brasil (LILIENTHAL; HAROLD, 2020).

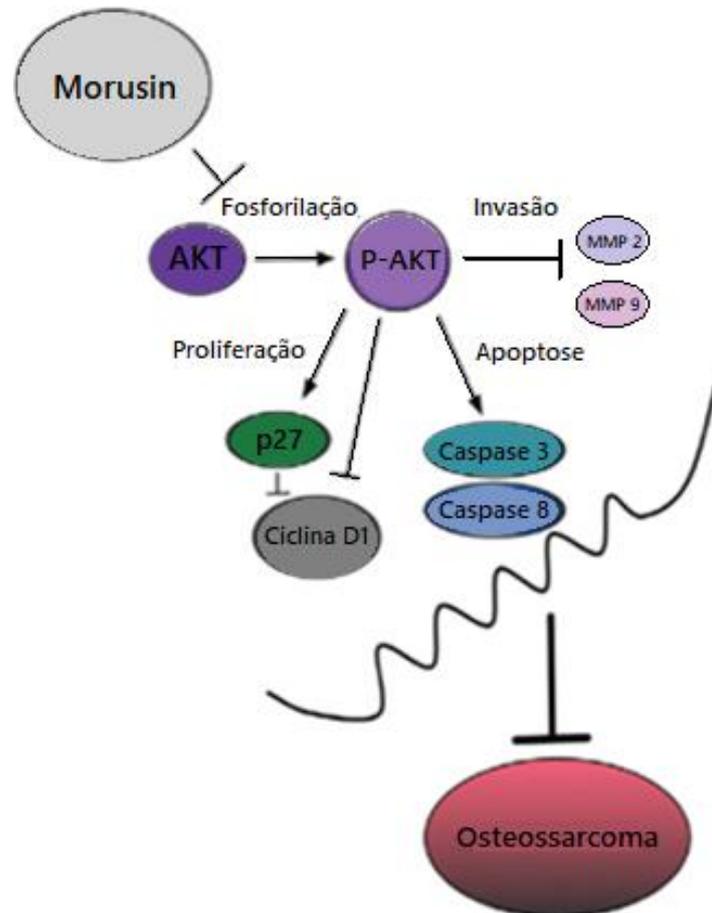
Como evidenciado nesta revisão, o miR-221 atua sobre a via de sinalização PI3K/Akt, na qual já é um alvo da cisplatina, que, apesar de ser muito utilizada, o tumor possui grande quimiorresistência a esse. Assim, tal droga é vastamente estudada em relação à sua resistência, principalmente por existirem evidências que a resistência à esse fármaco frequentemente geram resistências cruzadas a outros agentes ligados ao reparo de dano do DNA, utilizados nos protocolos de tratamento do osteossarcoma (LILIENTHAL; HAROLD, 2020).

Estudo recente de Zhang e colaboradores (2020), demonstrou que o flavonoide morusin suprime de forma significativa e promove a apoptose em células do OS, além de reduzir a migração e invasão das células por meio da PI3K/Akt (figura 4), demonstrando-o como um possível quimioterápico a ser utilizado no tratamento de pacientes com osteossarcoma.

Em alguns casos de tumores não ressecáveis, a radioterapia é utilizada. Todavia, os avanços farmacológicos e a sobrevida dos pacientes permanecem inalterados há aproximadamente 50 anos, nenhuma terapia direcionada obteve sucesso até agora e o tumor

normalmente é resistente às terapias padrão, apesar de se ter uma melhora na detecção e monitoramento da patologia. Isso torna do prognóstico da doença ruim, principalmente se for metastática (VARSHNEY et al., 2016; CZARNECKA et al., 2020).

Figura 4. Ação do morusin na via PI3K/Akt, demonstrando poder ser um novo agente terapêutico.



Fonte: Adaptado de Zhang et al., 2020.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O osteossarcoma é um câncer altamente complexo, com alterações genéticas em massa e com uma grande capacidade metastática. A falta de compreensão sobre esses seus mecanismos regulatórios, impediu que houvesse uma melhora significativa na sobrevivência dos pacientes em um período de 50 anos. Além disso, o tumor é particularmente resistente à quimioterapia, adquirindo essa resistência rapidamente e respondendo apenas a altas doses de quimioterápicos, o que implica no sucesso terapêutico e na sobrevivência global.

Por isso, faz-se necessário ampliar as pesquisas sobre esse câncer, que apesar de raro, é uma das principais causas de mortalidade em pacientes infanto-juvenis. A descoberta sobre o papel do miR-221 no osteossarcoma – associado a proliferação das células tumorais, invasão e migração, e até mesmo sobrevivência celular e resistência a cisplatina - contribui de forma relevante, podendo servir como um alvo terapêutico a ser silenciado ou inibido, de forma que o gene PTEN possa agir e impedir a continuidade da cascata de sinalização do PI3K/Akt, e que a quimiorresistência à cisplatina e casos de recidiva diminuam.

Assim, acredita-se que a terapia proporcionará maior sucesso quando os polimorfismos germinativos, vulnerabilidades genéticas, propriedades do microambiente tumoral, regulação imunológica, mecanismos de resistência e outros determinantes de sinergia forem elucidados, permitindo a obtenção de novos fármacos e melhor escolha de tratamento multimodal.

REFERÊNCIAS

- ALDAITURRIAGA, Nerea. **Variantes genéticas implicadas en la susceptibilidad del osteosarcoma pediátrico**. 2015. 180f. Tese de Doutorado do Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal da Facultad de Medicina y Odontología, Leioa, España, 2015.
- ACS. American Cancer Society. **Tests for Bone Cancer**. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/bone-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html>. Acesso em: 25 abr 2021.
- BACCI, Gaetano et al. Osteogenic sarcoma of the extremity with detectable lung metastases at presentation. **Cancer**, v. 79, p. 245 - 254, 1997.
- BIAN, Zhenyu et al. Association of genetic polymorphisms with osteosarcoma risk: a meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 6, p. 8317, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26309484/>. Acesso em: 27 set 2020.
- BISPO JÚNIOR, Rosalvo. **Fatores prognósticos da sobrevida no osteossarcoma primário: grau I versus II de Huvos**. 2009. 35f. Tese de Doutorado da Faculdade de Medicina, na Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2009.
- BROWN, Hannah; TELLEZ-GABRIEL, Marta; HEYMANN, Dominique. Cancer stem cells in Osteosarcoma. **Cancer Letters**, v. 386, p. 189-195, 2017. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.11.019.
- CAMPANACCI, Mario et al. The Treatment of Osteosarcoma of the Extremities: Twenty Year's Experience at the Istituto Ortopedico Rizzoli. **Cancer**, v. 48, p. 1569 - 1581, 1981. DOI: 10.1002/1097-0142(19811001)48:7<1569:aid-cnrcr2820480717>3.0.co;2-x.

CORTÉS-CIRIANO, Isidro et al. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. **Nature Genetics**, v. 52, n. 3, p. 331-341, 2020. DOI: 10.1038/s41588-019-0576-7.

CZARNECKA, Anna et al. Molecular Biology of Osteosarcoma. **Cancers**, v. 12, n. 8, p. 2130, 2020. DOI: 10.3390/cancers12082130.

DAVIS, Aileen; BELL, Robert; GOODWIN, Pamela. Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. **Journal of Clinical Oncology**, v. 12, n. 2, p. 423 - 431, 1994. DOI: 10.1200/JCO.1994.12.2.423.

ENCODE. Encyclopedia of DNA Elements. **ENCODE Encyclopedia Version 5: Genomic and Transcriptomic Annotations**. 2021. Disponível em: <https://www.encodeproject.org/data/annotations/>. Acesso em: 24 abr 2021.

FRIEBELE, Jill et al. Osteosarcoma: A Meta-Analysis and Review of the Literature. **The American Journal of Orthopedics**, v. 44, n. 12, p 547 – 553, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26665241/>. Acesso em: 12 abr 2021.

GENE CARDS. **MiR221 Gene**. 2021a. Disponível em: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MIR221&keywords=mir,221>. Acesso em: 23 jun 2021.

GENE CARDS. **MYC Gene**. 2021b. Disponível em: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYC&keywords=C%5C-MYC>. Acesso em: 16 mai 2021.

GENE CARDS. **RB1 Gene**. 2021c. Disponível em: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RB1>. Acesso em: 16 mai 2021.

GENE CARDS. **RECQL4 Gene**. 2021d. Disponível em: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RECQL4&keywords=recql4>. Acesso em: 16 mai 2021.

GENE CARDS. **TP53 Gene**. 2021e. Disponível em: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53&keywords=TP53>. Acesso em: 16 mai 2021.

GIANFERANTE, Matthew; MIRABELLO, Lisa; SAVAGE, Sharon. Germline and somatic genetics of osteosarcoma — connecting aetiology, biology and therapy. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 8, p. 480, 2017. DOI: 10.1038/nrendo.2017.16.

GONG, Ningji; GONG, Mingzhi. MiRNA-221 from tissue may predict the prognosis of patients with osteosarcoma. **Medicine**, v. 97, n. 29, 2018. DOI: 10.1097/MD.00000000000011100.

HARRIS, Michael. Treatment of Metastatic Osteosarcoma at Diagnosis: A Pediatric Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n 11, p. 3641 - 3648, 1998. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.11.3641.

HARRISON, Douglas et al. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 18, n. 1, p. 39-50, 2018. DOI: 10.1080/14737140.2018.1413939.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 133 - 149.

KOVAC, Michal et al. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2015. DOI: 10.1038/ncomms9940.

LILIENTHAL, Ingrid; HEROLD, Nikolas. Targeting Molecular Mechanisms Underlying Treatment Efficacy and Resistance in Osteosarcoma: A Review of Current and Future Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, 2020. DOI: 10.3390/ijms21186885.

LINK, Michael et al. Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 270, p. 8-14, 1991. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1884563/>. Acesso: 19 abr. 2021.

LIN, Yu-Hsuan et al. Osteosarcoma: Molecular Pathogenesis and iPSC Modeling. **Trends in molecular medicine**, v. 23, n. 8, p. 737-755, 2017. DOI: 10.1016/j.molmed.2017.06.004.

MATSUO, Flávia. **Estudo da via de sinalização PI3K-Akt e GSK3b em carcinomas epidermóides metastáticos e não metastáticos da cavidade bucal**. 2015. 41f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

MENCK, Carlos; SLUYS, Marie-Anne. **Genética Molecular Básica: dos genes aos genomas**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2017.

MEYERS, Paul. GORLICK, Richard. Osteosarcoma. **Pediatric Oncology**, v. 44, n. 4, p. 973 - 989, 1997. DOI: 10.1016/s0031-3955(05)70540-x.

MIRABELLO, Lisa; TROISI, Rebecca; SAVAGE, Sharon. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages, and elderly persons. **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 1, p. 229–234, 2009a. DOI:10.1002/ijc.24320.

MIRABELLO, Lisa; TROISI, Rebecca; SAVAGE, Sharon. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **Cancer**, v. 115, n. 7, p. 1532 - 1543, 2009b. DOI: 10.1002/cncr.24121.

MORROW, James; KHANNA, Chand. Osteosarcoma Genetics and Epigenetics: Emerging Biology and Candidate Therapies. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 20, n. 3-4, 2015. DOI: 10.1615/critrevoncog.2015013713.

MUTSAERS, Anthony; WALKLEY, Carl. Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells. **Bone**, v. 62, p. 56-63, 2014. DOI: 10.1016/j.bone.2014.02.003.

NAKKA, Manjula et al. Biomarker significance of plasma and tumor miR-21, miR-221, and miR-106a in osteosarcoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 57, p. 96738-96752, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.18236.

NELSON, David; COX, Michael. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

PARKIN, Max et al. The International Incidence of Childhood-Cancer. **International Journal of Cancer**, v. 42, n. 4, p. 511-520, 1988. DOI: 10.1002/ijc.2910420408.

QUIST, Tyler et al. The impact of osteoblastic differentiation on osteosarcomagenesis in the mouse. **Oncogene**, v. 34, n. 32, p. 4278–4284, 2015. DOI: 10.1038/onc.2014.354.

RICKEL, Kirby; FANG, Fang; TAO, Jianning. Molecular genetics of osteosarcoma. **Bone**, v. 102, p. 69-79, 2017. DOI: 10.1016/j.bone.2016.10.017.

ROSEN, Gerald et al. Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. **Cancer**, v. 37, n. 1, p. 1 - 11, 1976. DOI: 10.1002/1097-0142(197601)37:1<1::Aid-cncr2820370102>3.0.Co;2-3.

ROTHER, Edna. Revisão Sistemática x Revisão Narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 2, 2007. DOI: 10.1590/S0103-21002007000200001.

SADYKOVA, Leissan et al. Epidemiology and risk factors of osteosarcoma. **Cancer Investigation**, v. 38, n. 5, p. 259-269, 2020. DOI: 10.1080/07357907.2020.1768401.

STEPHENS, PJ et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during câncer development. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 27 - 40, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.055>.

SUNDARAM, Murali. Imaging of Bone Tumors. **Radiology**, v. 189, n. 2, p. 362, 1993. DOI: 10.1148/radiology.189.2.362.

SUN, K. et al. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 28, n. 4, p. 400 – 409, 2020. DOI: 10.1016/j.joca.2020.02.027.

TANG, Fan et al. Targeting Mutant TP53 as a Potential Therapeutic Strategy for the Treatment of Osteosarcoma. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 37, n. 3, p. 789- 798, 2019. DOI: 10.1002/jor.24227.

THOENEN, Elizabeth; CURL, Amanda; IWAKUMA, Tomoo. TP53 in bone and soft tissue sarcomas. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 202, p. 149 - 164, 2020. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.06.010.

VARSHNEY, Jyotika et al. Understanding the Osteosarcoma Pathobiology: A Comparative Oncology Approach. **Veterinary Sciences**, v. 3, n. 1, p. 3, 2016. DOI: 10.3390/vetsci3010003.

WU, Chia-Chin; LIVINGSTON, Andrew. Genomics and the Immune Landscape of Osteosarcoma. In: KLEINERMAN, Eugenie; GORLICK, Richard. **Current Advances in the Science of Osteosarcoma**. Online: Springer Nature Switzerland AG, 2020. p. 21 - 36. DOI: 10.1007/978-3-030-43085-6_2.

YANG, Zhen et al. Serum microRNA-221 functions as a potential diagnostic and prognostic marker for patients with osteosarcoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 75, p. 153 – 158, 2015. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.07.018.

ZHANG, Yong et al. Morusin Inhibits Human Osteosarcoma via the PI3K-AKT Signaling Pathway. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 13, 2020. DOI: 10.2174/1389201021666200416093457.

ZHU, Jianwei et al. miR-221 increases osteosarcoma cell proliferation, invasion and migration partly through the downregulation of PTEN. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 36, p. 1377-1383, 2015. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2352.