

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**IMPLEMENTAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA
DIAGNÓSTICA EM NEUROBLASTOMAS DA INFÂNCIA**

GISLAINE FURLANETTO

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**IMPLEMENTAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA
DIAGNÓSTICA EM NEUROBLASTOMAS DA INFÂNCIA**

GISLAINE FURLANETTO

Orientadora: Prof^a Dra Maria Lúcia Scroferneker

Coorientadora: Prof^a Dra. Mariana Bohns Michalowski

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre
2020

CIP - Catalogação na Publicação

Furlanetto, Gislaine
IMPLEMENTAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO COMO
FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM NEUROBLASTOMAS DA INFÂNCIA /
Gislaine Furlanetto. -- 2020.
73 f.
Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker.

Coorientadora: Mariana Bohns Michalowski.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2020.

1. Oncologia Pediátrica. 2. Análises Clínicas. 3.
Neuroblastoma. 4. Citometria de fluxo. I.
Scroferneker, Maria Lúcia, orient. II. Michalowski,
Mariana Bohns, coorient. III. Título.

“As criaturas que habitam esta terra em que vivemos, sejam elas seres humanos ou animais, estão aqui para contribuir, cada uma com sua maneira peculiar, para a beleza e a prosperidade do mundo.”

(Dalai Lama)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em especial ao meu noivo Gustavo e a nossa princesa Ailla. Obrigada pelo apoio, parceria, amor, incentivo e compreensão durante esta trajetória. Vocês foram e são a minha inspiração diária.

Aos meus pais, Cladir e Nésio pelo amor e por sempre acreditarem em mim, devo o que sou hoje à vocês.

À minha segunda mãe, Benures por toda ajuda e carinho em todos momentos.

Ao meu irmão Pablo, minhas cunhadas Vanessa e Fernanda, meu cunhado Gilmar e ao meu sobrinho Pedro pelo incentivo e por sempre estarem torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Maria Lúcia Scroferneker pela orientação, gentileza, colaboração e presteza no desenvolvimento desta dissertação.

À Dr^a Mariana Bohns Michalowski pela coorientação, apoio, paciência, compreensão, incentivo, colaboração e confiança.

À Fabiane Spagnol pela dedicação, ajuda, apoio, paciência, incentivo, amizade e confiança.

Ao Victor Jablonski Soares pela ajuda, comprometimento e dedicação neste projeto.

À equipe da Citometria de Fluxo da Unidade de Diagnóstico Especializado - Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que me apoiaram em todas as etapas para a realização desta dissertação. Sou grata imensamente à vocês, Mariela, Ana Paula, Josefina, Juliana e Graciele.

Às Dr^a Jiseh Fagundes Loss, Dr^a Daniela Elaine Roth Benincasa e Dr^a Liane Esteves Daudt pelo comprometimento, prestatividade e auxílio na execução deste trabalho.

À toda equipe do Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela ajuda, em especial a Ângela Motta.

À equipe do laboratório de Análises Clínicas do Hospital Ernesto Dornelles, em especial aos meus colegas analistas pela compreensão e cooperação durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade e incentivo ao aperfeiçoamento.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela honra e orgulho de ter participado desta instituição.

RESUMO

Introdução: Neuroblastoma (NB) é o tumor sólido extracraniano mais comum da infância, sendo responsável por 8-10% das neoplasias nesta faixa etária. Nos últimos anos houve uma expansão no uso da imunofenotipagem por Citometria de Fluxo (CF) no diagnóstico e acompanhamento de neoplasias sólidas da infância. No caso do NB, o uso da CF pode diminuir o tempo até o diagnóstico, além de permitir uma melhor estratificação de risco.

Objetivos: No presente estudo comparamos a CF e o exame anatomopatológico (AP) de crianças com NB quanto à sensibilidade e especificidade, e tempo até obtenção de resultado.

Métodos: Foram analisadas 48 amostras (27 medulas ósseas (MO), 10 sangues periféricos (SP), 8 tumores primários (TP) e 2 nódulos hepáticos (NH) e 1 fragmento de costela (FC) de 21 pacientes com suspeita/diagnóstico de NB no período de maio de 2019 a agosto de 2020. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos CD9 Pacific Blue, CD45 Pacific Orange, CD73 PE, GD2 PerCP-Cy5.5, CD56 PE-Cy7, CD90 APC e CD81 APC-H7 com posterior aquisição no citômetro FACSCanto II e análise no *software* Infinicyt™. Os resultados dos exames anatomopatológicos foram extraídos dos prontuários.

Resultados: Os pacientes apresentaram uma mediana de 59 meses de idade (mínimo 0; máximo 325 meses), destes 12 eram do sexo masculino (57.1%, 12/21). O tempo de liberação dos resultados entre as duas metodologias, a mediana na CF foi de 30 horas e 19 minutos e no AP foi de 94 horas e 49 minutos ($P < 0.05$). Das 48 amostras analisadas por CF 13 amostras (7 MO, 5 TP e 1 NH) apresentaram-se positivas para NB e 8 (3 MO e 5 TP) amostras foram positivas para NB no anatomopatológico. As duas técnicas foram concordantes em 88.9% dos casos. Considerando o AP como padrão-ouro a CF obteve uma sensibilidade de 100%, especificidade de 86%, valor preditivo positivo de 67% e o valor preditivo negativo de 100%.

Conclusão: este estudo demonstra que a CF pode ser usada como metodologia diagnóstica e de avaliação de comprometimento por NB; além de demonstrar vantagem na sensibilidade quando comparada ao anatomopatológico. Esta metodologia permite, assim, diagnóstico rápido e classificação precisa da doença, e pode auxiliar no monitoramento do tratamento.

Palavras-chave: Neuroblastoma; Oncologia; Pediatria; Citometria de Fluxo; Imuno-histoquímica; Diagnóstico.

ABSTRACT

Background: Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in childhood, being responsible for 8-10% of neoplasms in this age group. In recent years, there has been an expansion in the use of Flow Cytometry (FC) immunophenotyping in the diagnosis and monitoring of childhood solid neoplasms. In the case of NB, the use of FC can decrease the time until diagnosis, in addition to allowing better risk stratification.

Objectives: In the present study, we compared the FC and the anatomopathological examination (PA) of children with NB regarding sensitivity and specificity, and the time to obtain a result.

Methods: forty - eight samples were analyzed (27 bone marrow (BM), 10 peripheral blood (PB), 8 primary tumors (PT) and 2 hepatic nodule (HN) and 1 rib fragment (RF) from 21 patients with suspected/diagnosed NB in the period from May 2019 to August 2020. The cells were stained with monoclonal antibodies conjugated with fluorochromes CD9 Pacific Blue, CD45 Pacific Orange, CD73 PE, GD2 PerCP-Cy5.5, CD56 PE-Cy7, CD90 APC and CD81 APC-H7 with subsequent acquisition on the FACSCanto II cytometer and analysis on the Infinicyt™ software. The results of the anatomopathological exams were extracted from the medical records.

Results: The patients had a median of 59 months of age (minimum 0; maximum 325 months), of these 12 were male (57.1%, 12/21). The results release time between the two methodologies, the median in FC was 30 hours and 19 minutes and in the PA it was 94 hours and 49 minutes ($P < 0.05$). Of the 48 samples analyzed by CF 13 samples (7 BM, 5 PT and 1 HN) were positive for NB and 8 (3 BM and 5 PT) samples were positive for NB in the anatomopathological. The two techniques were in agreement in 88.9% of the cases. Considering the PA as the gold standard, the FC obtained a sensitivity of 100%, a specificity of 86%, a positive predictive value of 67% and a negative predictive value of 100%.

Conclusion: This study demonstrates that FC can be used as a diagnostic and assessment methodology for impairment by NB; in addition to demonstrating an advantage in sensitivity when compared to anatomopathological. This methodology thus allows for rapid diagnosis and accurate classification of the disease, and can assist in monitoring the treatment.

Keywords: Neuroblastoma; Oncology; Pediatrics; Flow Cytometry; Immunohistochemistry; Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Diagramas de *dot plot* ilustrando a população de neuroblastoma, cujo fenótipo é representado por: CD45⁻/CD56^{forte}/CD90⁺/CD81⁺/CD9⁺/GD2⁺

Figura 2. Histogramas de DNA mensurados por citometria de fluxo

Figura 3. Padrão de expressão dos marcadores imunofenotípicos de alguns tumores sólidos pediátricos

Figura 4. Estratégia de busca de referências bibliográficas

Figura 5. Marco conceitual do neuroblastoma

Figura 6. Dot plot diagrams illustrating the neuroblastoma population (Figura 1 no artigo: Flow cytometry as a diagnostic tool in neuroblastoma)

Tabela 1. Sample characteristics

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ALK	Quinase do Linfoma Anaplásico
AP	Anatomopatológico
BD	Becton Dickinson
BM	Bone marrow
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD	Cluster de diferenciação
CF	Citometria de fluxo
cyNSE	Enzima enolase neuro-específica intracitoplasmática
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRM	Doença residual mensurável
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
FC	Flow cytometry
FC	Fragmento de costela
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
GD2	Disialogangliosídeo
HN	Hepatic nodule
ICF	Informed consent
IHC	Immunohistochemistry
IHQ	Imuno-histoquímica
IMF	Intensidade média de fluorescência
INPC	International Neuroblastoma Pathology Committee
INSS	International Neuroblastoma Staging System
LDH	Lactato desidrogenase
MO	Medula óssea
MRD	Measurable residual disease
MYCN	Proto-oncogene protein N-myc
NA	Not applicable
NB	Neuroblastoma
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NH	Nódulo hepático
N-MYC	Proto-oncogene protein N-myc

PA	Anatomopathological
PB	Peripheral blood
PNET	Tumor Neuroectodérmico Primitivo
RF	Rib fragment
RMS	Rabdomiossarcoma / Rhabdomyosarcoma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SciELO	Biblioteca Eletrônica Científica Online
SE	Sarcoma de Ewing
SP	Sangue periférico
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TP	Tumor primário
TW	Tumor de Wilms / Wilms' tumor
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Neuroblastoma	13
2.1.1 Perfil imunofenotípico do neuroblastoma por Citometria de Fluxo	14
2.1.2 Avaliação do Índice de Ploidia de neuroblastoma por Citometria de Fluxo	16
2.1.3 Diagnóstico anatomopatológico e imuno-histoquímico de neuroblastoma comparado a citometria de fluxo	17
2.2 Sarcoma de Ewing e Tumor Neuroectodérmico Primitivo	18
2.2.1 Perfil imunofenotípico do Sarcoma de Ewing e Tumor Neuroectodérmico Primitivo por Citometria de Fluxo	18
2.3 Tumor de Wilms	19
2.3.1 Perfil imunofenotípico do Tumor de Wilms por Citometria de Fluxo	19
2.4 Rbdomiossarcoma	20
2.4.1 Perfil imunofenotípico do Rbdomiossarcoma por Citometria de Fluxo	21
2.5 Estratégias para localizar e selecionar as informações	23
3. MARCO CONCEITUAL	24
4. JUSTIFICATIVA	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo Primário	26
5.2 Objetivos Secundários	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
7. ARTIGO	33
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	49
10. ANEXOS E/OU APÊNDICES	49

1. INTRODUÇÃO

Os tumores sólidos da infância são doenças que se caracterizam pelo crescimento anormal de células de um determinado tecido.^{1,2} Estas neoplasias representam cerca de 30% de todos os cânceres pediátricos, sendo os tipos mais comuns os tumores cerebrais, neuroblastoma (NB), rhabdomyosarcoma (RMS), tumor de Wilms (TW) e osteossarcoma.³

As manifestações clínicas variam de acordo com o tipo histológico do tumor, localização primária e idade do paciente.⁴ O diagnóstico é realizado pela correlação entre os dados clínicos e os resultados dos exames laboratoriais principalmente o anatomopatológico (AP) e imuno-histoquímico (IHQ).

Entre os tumores sólidos existe um subgrupo denominado neoplasias de pequenas células azuis que compreendem o NB, RMS, TW, sarcoma de Ewing (SE) e tumor neuroectodérmico primitivo (PNET). Elas recebem essa definição por serem compostas de células primitivas: células que ainda não se diferenciaram e que adquirem uma cor azulada ao serem analisadas pelo patologista. Por apresentarem aspecto semelhante, são neoplasias difíceis de distinguir necessitando de uma análise mais aprofundada de marcadores para um diagnóstico correto. Neste caso, um estudo imuno-histoquímico cuidadoso faz com que haja, muitas vezes, um tempo longo entre a biópsia tecidual e o diagnóstico definitivo, retardando, assim, o início do tratamento destas crianças.⁵⁻⁸ Novos métodos que permitam agilidade no diagnóstico sem perder a sensibilidade e especificidade das técnicas atuais disponíveis, vem de encontro às necessidades e demandas clínicas do momento.

Dentro deste contexto, a citometria de fluxo (CF) mostra-se como uma ferramenta importante no auxílio a um diagnóstico mais rápido e preciso na identificação e distinção deste grupo de tumores sólidos da infância.

Abordaremos neste trabalho uma revisão bibliográfica das cinco principais neoplasias de pequenas células azuis da infância: NB, SE, PNET, TW e RMS com os imunofenótipos distintos identificados pela CF e uma análise imunofenotípica de diferentes espécimes como medula óssea (MO), sangue periférico (SP), tumor primário (TP), nódulo hepático (NH) e fragmento da costela (FC) de pacientes com suspeita/diagnóstico de NB frente a uma análise comparativa com o exame anatomopatológico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Baseada no artigo de revisão aceito para publicação no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.

Data de submissão: 22/04/2020

Data de aceite: 05/05/2020

Artigo de Revisão PATOLOGIA CLÍNICA (MEDICINA LABORATORIAL)

CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM TUMORES SÓLIDOS DA INFÂNCIA

FLOW CYTOMETRY AS A DIAGNOSTIC INSTRUMENT IN NEUROBLASTOMA

Gislaine Furlanetto 

 gislainefurlanetto@gmail.com

Contribuição do autor: Coleta de Dados, Metodologia, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição

Afiliação(ões):  Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas - Porto Alegre - RS - Brasil

2.1 Neuroblastoma

O neuroblastoma é o tumor sólido extracraniano mais comum na infância (0 a 11 anos), sendo responsável por 8-10% de todas as neoplasias nesta faixa etária e corresponde a 25-50 casos por milhão de indivíduos.⁸⁻¹¹ Sua etiologia é pouco conhecida porém, devido à sua incidência maior em lactentes, alguns autores sugerem que fatores pré-concepcionais ou eventos gestacionais (ex: diabetes gestacional, deficiência de ácido fólico, exposição a drogas, hormônios, toxinas ou vírus) possam ter relevância no seu desenvolvimento.¹²⁻¹⁵ Apesar de várias alterações genéticas terem sido observadas nestas neoplasias, incluindo alterações cromossômicas, polimorfismo e ampliações genéticas, não há, até hoje, uma alteração patognomônica de diagnóstico.¹¹

A origem do NB ocorre nas células da crista neural e geralmente se desenvolve a partir da medula adrenal, podendo também ocorrer em gânglios simpáticos.¹⁶ Em 70% dos casos, o tumor está localizado no abdômen (25% no gânglio simpático e 40% na medula adrenal,⁹ 15% no tórax, 5% na região cervical e 5% no gânglio simpático pélvico).^{17,18} Aproximadamente metade destes tumores apresentam doença localizada ou regional,¹⁹ enquanto os outros 50% já apresentam metástases distantes por meio de disseminação linfática ou hematogênica no momento do diagnóstico.^{20,21}

O tratamento a ser realizado é variável e dependente de vários fatores que contribuem para a classificação do grupo de risco do paciente. A maior parte dos protocolos internacionais usa os seguintes critérios na definição de risco: idade ao

diagnóstico, status da amplificação do gene N-MYC (*Proto-oncogene protein N-myc*), ploidia do DNA, histologia e INSS (*International Neuroblastoma Staging System*), anormalidades genéticas, permitindo classificar o paciente em baixo, intermediário e alto risco.^{22,23} Também é importante avaliar a elevação do ácido vanilmandélico e do ácido homovanílico (que podem ser detectados em 90% de todos os pacientes com NB),¹¹ ferritina sérica e do lactato desidrogenase (LDH), os quais podem indicar pior prognóstico.²⁴

Do ponto de vista molecular, o sequenciamento de genes candidatos identificou mutações no ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) em mais de 50% dos casos familiares e em 5% a 15% dos casos esporádicos de NB.²⁵ O ALK é um expansor oncogênico que causa uma proliferação descontrolada e propriedades de sobrevivência nas células do NB.²⁴

Com os dados disponíveis atualmente na literatura, sabe-se que a amplificação do gene N-MYC e a ploidia de DNA têm as implicações prognósticas mais importantes para a patologia.²⁴ Nos pacientes que apresentam riscos baixo e intermediário e tumores localizados, tanto a taxa de cura quanto a taxa de sobrevida são superiores a 90%²⁶, já nos casos de alto risco, essas taxas caem para 40-50%.^{27,28}

2.1.1 Perfil imunofenotípico do neuroblastoma por Citometria de Fluxo

A imunofenotipagem por CF pode ser utilizada no diagnóstico de NB pela análise do TP, na avaliação da disseminação da doença no SP e MO, bem como no acompanhamento do tratamento através da pesquisa de Doença Residual Mensurável (DRM).^{29,30}

Nas últimas décadas, diversos pesquisadores testaram diferentes combinações de anticorpos monoclonais com o objetivo de obter uma maior especificidade nas células tumorais. No ano de 1998, Komada *et al.* utilizaram uma combinação de CD9/CD56/CD45 para detecção de células residuais de NB na MO e SP. Neste estudo, fizeram análises simultâneas com diferentes fluorocromos e evidenciaram uma população celular distinta com o fenótipo CD9⁺/CD56⁺/CD45⁻, sugerindo a presença de células de NB metastáticas. Já no ano 2000, Nagai *et al.* concluiu que a combinação de CD81⁺/CD56⁺/CD45⁻ era

mais sensível e específica para detecção de DRM para NB. Foi comparado a reatividade do CD81 com o CD9, sendo observado uma maior sensibilidade do CD81 possivelmente devido à interferência do CD9 na marcação de plaquetas.³¹

Em 2002, Warzynski *et al.* utilizaram os marcadores já anteriormente descritos para identificar as células de NB e estudaram dois novos marcadores: a proteína de membrana disialogangliosídeo (GD2) e a enzima enolase neuro-específica intracitoplasmática (cyNSE). Com esta pesquisa concluíram que as células de neuroblastoma são CD45-/CD56+forte/GD2+/cyNSE+.³²

Baseado no trabalho de Facio *et al.* de 2013 a positividade para os marcadores CD56 forte, CD81, CD9, CD90, GD2 e a negatividade para o CD45 é característico de NB, conforme **Figura 1**.³³

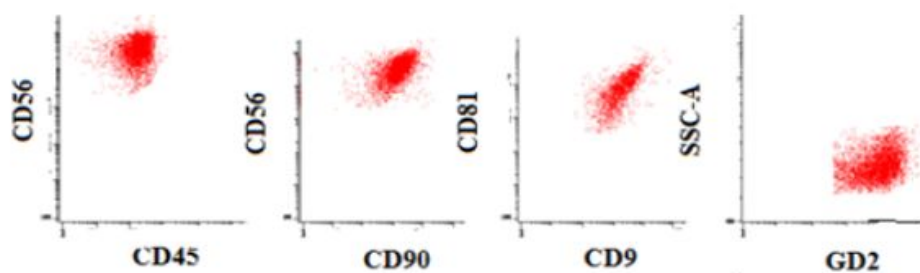


Figura 1. Diagramas de *dot plot* ilustrando a população de neuroblastoma, cujo fenótipo é representado por: CD45-/CD56+forte/CD90+/CD81+/CD9+/GD2+.

Adaptado de: Facio, C.S.F *et al.* Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. Plos One, 2013.

2.1.2 Avaliação do Índice de Ploidia de neuroblastoma por Citometria de Fluxo

A ploidia é um fator importante e útil para a classificação de risco e prognóstico do paciente com NB. Esta análise pode ser estabelecida através da CF e métodos citogenéticos (FISH - *Fluorescent In Situ Hybridization*).^{34,35}

As alterações na ploidia da célula tumoral são resultado de uma alteração na função mitótica, relacionada à taxa de proliferação celular. É um indicador de prognóstico em vários tipos de tumores.^{36,37}

Em 1984, *Look et al.* relatou que índices mais elevados de DNA estavam associados a uma melhor resposta terapêutica em bebês com tumores irressecáveis. É claramente observado em inúmeros casos de NB em crianças menores de 12 meses de idade, apresentam um melhor prognóstico comparado a pacientes mais velhos. Entretanto, até NB de lactentes, quando hipodiploides, apresentam maior chance de falha terapêutica precoce.^{36,38} Já um resultado favorável para o prognóstico está associado à aneuploidia na linhagem de células-tronco e baixa porcentagem de células tumorais nas fases S, G2 e M do ciclo celular.³⁹ A influência da ploidia em relação ao prognóstico parece ser perdida após os 2 anos de idade.⁴⁰

Já em 1987, *Kaneko et al.* mostraram a associação entre tumores triploides e o prognóstico favorável, enquanto que os tumores diplóides e tetraploides foram associados a estadios mais avançados, casos semelhantes foram descritos por outros autores.⁴¹⁻⁴⁴

A análise do conteúdo de DNA por CF é utilizada para revelar a ploidia e estimar a proliferação através da distribuição dos ciclos celulares em populações de células normais e tumorais.⁴⁵

Para a identificação da ploidia do neuroblastoma, por CF, é utilizado um anticorpo monoclonal conjugado com um fluorocromo, geralmente CD56, que permite a identificação das células neoplásicas presentes na amostra e um corante de ligação de DNA chamado iodeto de propídio (IP), o qual permite realizar uma análise de conteúdo do DNA das células neoplásicas em contrapartida com o conteúdo do DNA das células normais diplóides.⁴⁶

A comparação do conteúdo relativo de DNA no pico das fases G0/G1 das células tumorais com o das células normais permite a detecção de aneuploidias. O índice de DNA é calculado dividindo o valor da intensidade média de fluorescência (IMF) do IP da população tumoral pela IMF do IP da população de referência (células normais)⁴⁷, **Figura 2**.

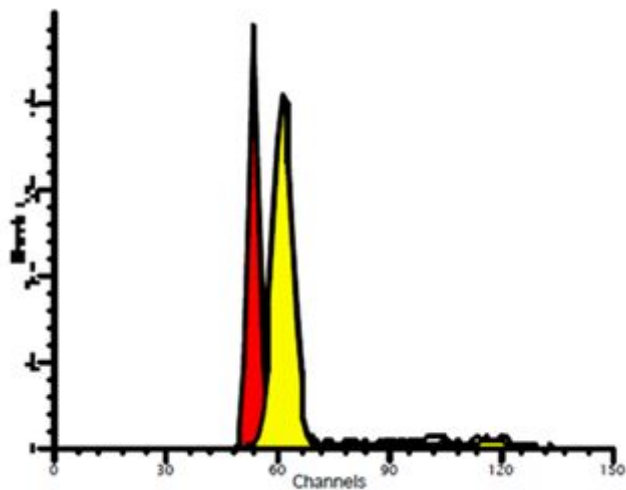


Figura 2. Histogramas de DNA mensurados por citometria de fluxo.
Adaptado de: CYCLOSCOPE-REAGENT KIT

2.1.3 Diagnóstico anatomopatológico e imuno-histoquímico de neuroblastoma comparado a citometria de fluxo

No diagnóstico histopatológico, a maioria destes tumores pertence ao grupo de “tumores de células pequenas redondas e azuis”, caracterizados por células indiferenciadas, pequenas e redondas, usualmente de difícil diagnóstico morfológico.^{48,49}

No ano de 1999, o INPC (*International Neuroblastoma Pathology Classification*), baseado na primeira classificação de Shimada 1984, acrescentou algumas informações relacionadas a histologia do tumor. O NB é dividido em 3 subtipos: indiferenciado, pouco diferenciado e diferenciado.⁵⁰ O exame histopatológico convencional, associado a técnica de imuno-histoquímica, é o padrão-ouro para o diagnóstico de neuroblastoma.³³

Em 2018, Szánthó *et al.* fizeram um estudo onde tinham como objetivo comparar a eficácia diagnóstica entre a CF e a morfologia / imuno-histoquímica na detecção de células tumorais disseminadas na MO e fluidos corporais de pacientes com tumores sólidos. Foram analisadas 36 amostras de 16 pacientes com suspeita/diagnóstico de NB que apresentaram uma concordância entre as duas metodologias de 65% para a presença de doença. Foi visto que a detecção de células tumorais disseminadas é mais eficaz na CF do que na IHQ (100% versus 86%, respectivamente). A vantagem da CF foi ainda maior quando avaliaram DRM, onde a eficácia foi de 92% versus 68%. Além disso, outra vantagem da CF é poder analisar mais células de um material mesmo em amostras hipoplásicas.⁵¹

Assim sendo, a CF permite agilidade diagnóstica e sensibilidade de estadiamento do NB com início de tratamento mais adequado e precoce.

2.2 Sarcoma de Ewing e Tumor Neuroectodérmico Primitivo

Denomina-se sarcoma de Ewing o tumor cujas células são indiferenciadas, e como tumor neuroectodérmico primitivo aquele com células que apresentam diferenciação neural.^{49,52,53}

O SE normalmente é localizado em ossos longos e na pelve, raramente origina-se em tecidos extra-ósseos e excepcionalmente no espaço epidural raquiano.⁵⁴ Estima-se que a incidência de SE responde por cerca de 6% a 10% dos tumores ósseos malignos primários, sendo, portanto, o quarto mais frequente deste grupo de lesões,⁵⁵ enquanto, PNET representa 4% dos tumores de partes moles.⁵⁶

O diagnóstico diferencial entre o SE e os demais PNET é baseado na história do paciente, exame físico, exames de imagem, além da análise AP e IHQ.^{53,57,58}

2.2.1 Perfil imunofenotípico do Sarcoma de Ewing e Tumor Neuroectodérmico Primitivo por Citometria de Fluxo

Em 2003, Chang *et al.* relataram um caso de SE positivo para CD56, CD99, CD90 e CD117 por CF.⁵⁹ Já o estudo de Dubois *et al.* (2010), identificou células CD99⁺/CD45⁻ em amostras de SP e MO de pacientes com SE e publicaram a utilização de CD99, CD45, CD14 e CD34, sendo o CD14 para a exclusão de monócitos e o CD34 de progenitores hematopoiéticos, tornando essa a estratégia para detecção de DRM de SE.⁶⁰

Os anticorpos GD2 e CD271 publicados no trabalho de Facio *et al.* e foram os marcadores mais úteis para diferenciar NB (GD2^{forte} e CD271^{negativo/fraco}) dos demais PNET (GD2^{negativo/fraco} e CD271^{forte}). Estes resultados sustentam a hipótese que a expressão forte de CD271 observada nos PNET pode estar associada à origem das células-tronco mesenquimais desses tumores.³³

Estes estudos mostram o potencial do uso destes marcadores na CF no diagnóstico e diferenciação destas neoplasias.⁶¹

2.3 Tumor de Wilms

O tumor de Wilms, também conhecido como nefroblastoma, é o tumor primário renal mais comum da infância, correspondendo a 6% dos diagnósticos de câncer pediátrico. A média de idade ao diagnóstico é de 3-5 anos.⁶² Estima-se

que na Europa a cada ano, 1000 novos casos são diagnosticados com essa patologia.⁶³

O diagnóstico é realizado associando-se métodos de imagem, achados cirúrgicos e histológicos.⁶⁴ O prognóstico dos pacientes com tumores com histologia favorável tem melhorado nas últimas décadas, alcançando taxas de sobrevida de 90% em quatro anos.

2.3.1 Perfil imunofenotípico do Tumor de Wilms por Citometria de Fluxo

Na análise de células do TW, Pode-Shakked *et al.* em 2009, descreveram expressão variada de alguns marcadores de células hematopoiéticas (CD34, CD117, CD133), marcadores de células mesenquimais (CD105, CD90, CD44), marcadores relacionados a câncer (CD133, MDR1) em associação com a positividade para NCAM (*Neural cell adhesion molecule*), também chamado de CD56, e a fração de “células tronco tumorais”. Estes autores ainda sugerem que o NCAM é também um marcador de células progenitoras renais malignas de TW.⁶⁵

Em 2010, Royer-Pokora *et al.* caracterizaram e estabeleceram cinco células de linhagem oriundas do TW com mutação WT1 quanto à expressão de genes e proteínas que já haviam sido descritos nas células-tronco mesenquimais e no mesoderma paraxial (CD73, CD90 e CD105). Os resultados deste estudo evidencia a capacidade limitada de diferenciar Wilms das linhagens mesenquimais, pois o perfil de expressão gênica demonstram que as linhagens celulares do TW são muito semelhantes às das células-tronco mesenquimais humanas, por possuírem as mesmas expressões de proteínas de superfície. Também neste estudo, concluíram que TW com mutações no gene WT1 têm características específicas do mesoderma paraxial, que é a fonte de células estromais renais.⁶⁶

No estudo de Facio *et al.* (2013) foram caracterizados dois pacientes com tumor de Wilms. Ambos mostraram populações de células tumorais (coexistentes), porém claramente distintas fenotipicamente, sendo positivo para: CD56 e CD58, e negativo para CD45, CD99, GD2, nuMYOD1, nuMiogenina, CD10 e NG2, mas com reatividade distinta (expressão negativa versus positiva) para CD90, EpCAM e CD57.³³ Essas observações de marcadores estão

alinhas com a coexistência relatada de epitélio (por exemplo, EpCAM⁺, CD90⁻) e componentes celulares mesenquimais (EpCAM⁻, CD90⁺) em TW por histopatologia.^{65,67,68} Estes dados mostram outro uso potencial da CF: compreender melhor a heterogeneidade tumoral.

2.4 Rbdomiossarcoma

O rbdomiossarcoma, por sua vez, é um raro sarcoma de tecidos moles de origem mesenquimal, com evidência de diferenciação de células musculares estriadas. Corresponde a 2,9% de todos os cânceres pediátricos dos Estados Unidos e sua incidência é de 4,5 casos/milhão de crianças e adolescentes por ano. É o terceiro tumor extracraniano mais comum em crianças depois do NB e TW e tem aproximadamente 50% de todos os casos de diagnósticos em crianças menores de 10 anos de idade.^{69,70}

O sítio primário mais comum de RMS é a região da cabeça e pescoço, seguida pelo trato gênito-urinário, extremidades, tórax e retroperitônio. Os subsítios tumorais na região da cabeça e pescoço incluem a órbita, os sítios parameningeos (nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, osso temporal, fossa pterigopalatina e fossa infratemporal) e os sítios não parameningeos. Os tumores que invadem apenas a órbita têm melhor prognóstico.⁷¹

O diagnóstico é baseado na história clínica, exame físico, exames laboratoriais (hemograma, perfil bioquímico e enzimas hepáticas), nasofibrosopia, tomografia computadorizada, ressonância magnética e biópsia com AP.⁷¹

2.4.1 Perfil imunofenotípico do Rbdomiossarcoma por Citometria de Fluxo

Nos últimos anos, houve uma evolução no uso da CF para o diagnóstico de metástases em MO de pacientes com RMS.

Shen *et al.* (2014), avaliaram onze pacientes com suspeita de metástase, comparando análise morfológica (padrão-ouro) à CF de aspirado de MO. Neste estudo pode-se observar a positividade para células malignas em três pacientes através do exame AP e em quatro pacientes através da CF. Todos os três casos

positivos no AP foram também positivos na CF, sendo que esta última detectou positividade em um paciente a mais. A porcentagem de células detectadas nos quatro casos positivos pela CF foi de 29,3%, 12,3%, 6,8% e 0,35% sobre o total de células nucleadas, mostrando uma boa sensibilidade. O caso morfológicamente negativo, mas com nível de detecção celular de 0,35% por CF, levou os pesquisadores a fazerem uma reanálise morfológica concluindo que o resultado era positivo para células neoplásicas.⁷²

Hoje utiliza-se o fenótipo CD45⁻/CD56⁺/CD90⁺/miogenina⁺ para diagnóstico de RMS, sendo que pode haver uma expressão variável de CD57. Este perfil é semelhante ao perfil imunofenotípico de NB, porém a utilização de GD2 auxilia na diferenciação destas duas neoplasias, já que é somente positivo no NB.⁷²

Diante dos trabalhos referenciados, a CF é apontada como uma ferramenta sensível na detecção e na extensão tumoral destas patologias. Novas possibilidades de identificação de células tumorais circulantes por meio da CF, sugerem aumentar a precisão destes achados.

Contemplando as patologias descritas nesta revisão, a **Figura 3** ilustra os diferentes fenótipos dos tumores sólidos da infância com um perfil característico de cada entidade.

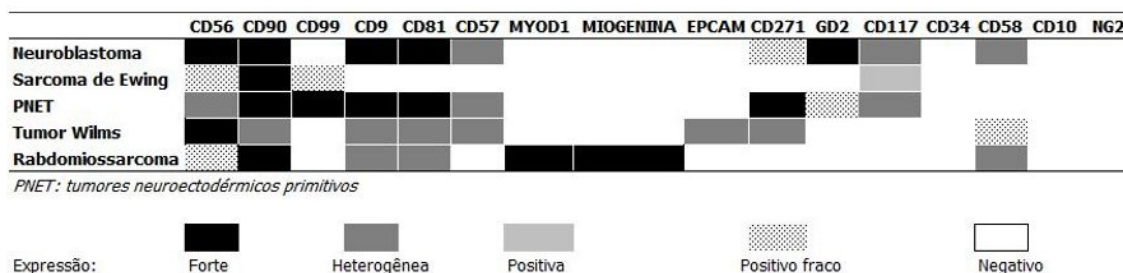


Figura 3. Padrão de expressão dos marcadores imunofenotípicos de alguns tumores sólidos pediátricos.

Adaptado de: Facio, C.S.F *et al.* Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. Plos One, 2013.

2.5 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada na análise dos principais tumores sólidos da infância e na quantificação do índice de ploidia de pacientes com neuroblastoma por citometria de fluxo. A estratégia de busca envolveu as

seguintes bases de dados: PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), SciELO (<http://www.scielo.org>) e CAPES (<http://www.periodicos.capes.gov.br>) no período de 1984 a 2019.

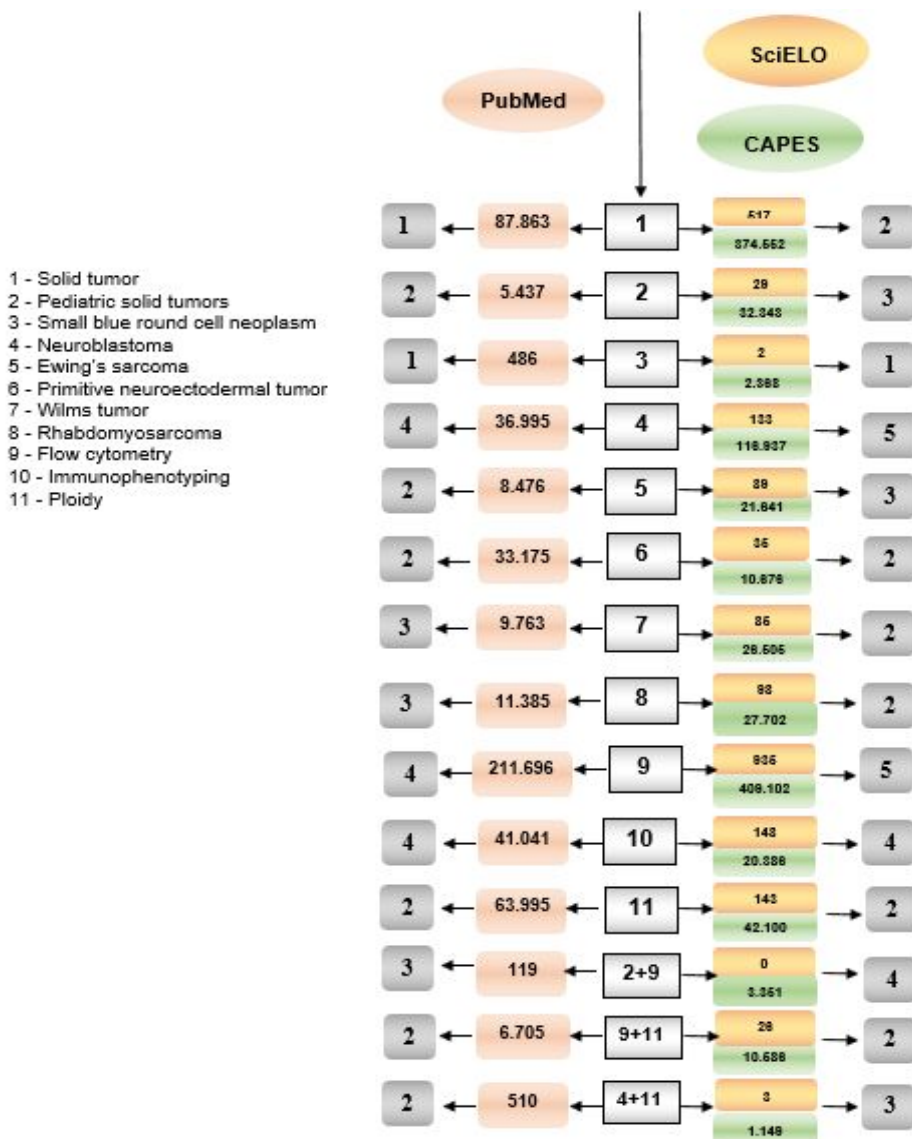


Figura 4. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Este é o resultado da busca da combinação das palavras-chave. Elaborado pela Autora (2020).

3. MARCO CONCEITUAL

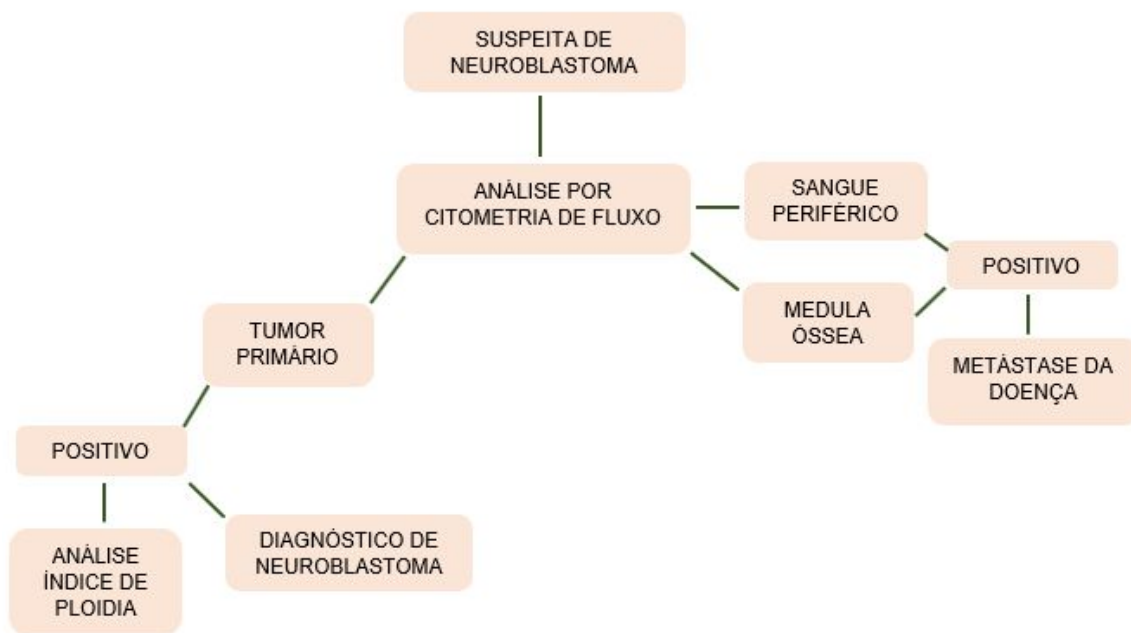


Figura 5. Marco conceitual do neuroblastoma. Elaborado pela autora (2020)

4. JUSTIFICATIVA

O Neuroblastoma é uma neoplasia de pequenas células azuis que necessita de confirmação diagnóstica através de metodologias trabalhosas que exigem vários dias para a execução e análise.

Ao mesmo tempo, por serem doenças de alto índice mitótico, o diagnóstico e tratamento precoces são importantes. A implementação das técnicas para caracterização da doença e análise do Índice de DNA por Citometria de Fluxo são um avanço laboratorial por serem exames de rápida liberação e extrema sensibilidade.

Este trabalho permitirá a incorporação da análise imunofenotípica, contribuindo para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento de tratamento dos pacientes com suspeita ou diagnóstico de Neuroblastoma.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Primário

Implementar na Unidade de Diagnóstico Especializado do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a técnica de identificação das células fenotipicamente caracterizadas como neuroblastoma tanto no sítio primário quanto em sangue periférico e medula óssea por Citometria de Fluxo.

5.2 Objetivos Secundários

- Analisar a correlação da disseminação da doença através da análise do sangue periférico e medula óssea por citometria de fluxo e a presença de metástases identificadas através do exame imuno-histoquímico;
- Determinar o índice de DNA por CF;
- Descrever as características clínicas dos pacientes com neuroblastoma: idade do paciente, estadio conforme classificação do Sistema de Estadiamento Internacional para Neuroblastoma (INSS), histopatologia, amplificação do gene N-MYC;
- Avaliar o impacto da CF na mudança de estratificação de risco em pacientes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gavhane Y, Shete A, Bhagat A, Shinde V, Bhong K, Khairnar G, et al. Solid tumors: facts, challenges and solutions. *Int J Pharma Sci Res.* 2011;2(1):1–12.
2. Jain A, Jain A, Gulbake A, Hurkat P, Jain SK. Solid tumors: a review. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3(SUPPL. 5):45–51.
3. Kline NE, Sevier N. Solid Tumors in Children. *J Pediatr Nurs.* 2003;18(2):96–102.
4. Lima ER, Fonseca KC, Cavacami E, Rodrigues KE de S. Apresentação clínica dos tumores sólidos mais comuns na infância e adolescência. *Rev Med Minas Gerais.* 2008;18(4):27–33.
5. Bouzas, L. F.; Calazans M. Tumores sólidos e hematológicos na infância e na adolescência – Parte I. *Adolescência & Saúde.* 2007;4(1):40–4.
6. Arendonk KJ Van, Chung DH. Neuroblastoma: Tumor biology and its implications for staging and treatment. *Children.* 2019;6(1):12.
7. Dos Santos Torres U, De Andrade Ribeiro MC, Souza AS, Borim LNB. Tumor desmoplásico de pequenas células redondas abdominal da infância: Relato de caso. *J Bras Patol e Med Lab.* 2010;46(1):55–9.
8. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 933–970.
9. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet.* 2007;369(9579):2106–20.
10. Davis S, Rogers MA, Pendergrass TW. The incidence and epidemiologic characteristics of neuroblastoma in the United States. *Am J Epidemiol.* 1987; 126:1063–1074.
11. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2:16078.
12. Chow EJ, Friedman DL, Mueller BA. Maternal and perinatal characteristics in relation to neuroblastoma. *Cancer.* 2007;109(5):983–92.
13. Cook MN, Olshan AF, Guess HA, Savitz DA, Poole C, Blatt J, et al. Maternal medication use and neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiol.* 2004;159(8):721–31.
14. Harder T, Plagemann A, Harder A. Birth weight and risk of neuroblastoma: A meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2010;39(3):746–56.

15. Kramer S, Ward E, Meadows AT, Malone KE. Medical and drug risk factors associated with neuroblastoma: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1987;78(5):797-804.
16. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet.* 2013;45(3):279–84.
17. Alexander F. Neuroblastoma. *Urol Clin North Am.* 2000;27(3):383–92.
18. Schulte JH, Eggert A. Neuroblastoma. *Crit Rev Oncog.* 2015;20(3–4):245–70.
19. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010;24(1):65–86.
20. Gesundheit B, Smith CR, Gerstle JT, Weitzman SS, Chan HSL. Ataxia and secretory diarrhea: Two unusual paraneoplastic syndromes occurring concurrently in the same patient with ganglioneuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004;26(9):549–52.
21. Morandi F, Corrias MV, Pistoia V. Evaluation of bone marrow as a metastatic site of human neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1335(1):23–31.
22. Brodeur GM, Castleberry RP. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 2. ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1993. p. 739–68.
23. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 895–937.
24. Newman EA, Abdessalam S, Aldrink JH, Austin M, Heaton TE, Bruny J, et al. Update on neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 2019;54(3):383–9.
25. Devoto M, Specchia C, Laudenslager M, Longo L, Hakonarson H, Maris J, et al. Genome-wide linkage analysis to identify genetic modifiers of ALK mutation penetrance in familial neuroblastoma. *Hum Hered.* 2011;71(2):135–9.
26. Smith MA, Seibel NL, Altekruze SF, Ries LAG, Melbert DL, O’Leary M, et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: Challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):2625–34.
27. Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia M, Kramer K, Gollamudi S, Heller G, et al. N7: A novel multi-modality therapy of high-risk neuroblastoma (neuroblastoma) in children diagnosed over 1 year of age. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 36:227–230.

28. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *N Engl J Med*. 1999;341(16):1165–73.
29. Komada Y, Zhang XL, Zhou YW, Inaba H, Deguchi T, Azuma E, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and bone marrow for tumor cells in patients with neuroblastoma. *Cancer*. 1998;82(3):591–9.
30. Manrique B, Marti JL, Cacciavillano W, Rossi J. Neuroblastoma y citometría de flujo multiparamétrica , una nueva y posible herramienta diagnóstica. Caso clínico. *Arch Argent Pediatr*. 2016;114(2):100–3.
31. Nagai J, Ishida Y, Koga N, Tanaka Y, Ohnuma K, Toyoda Y. A new sensitive and specific combination of CD81/CD56/CD45 monoclonal antibodies for detecting circulating neuroblastoma Cells in Peripheral Blood Using Flow Cytometry. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000;22(1):20–6.
32. Warzynski MJ, Graham DM, Axtell RA, Higgins J V., Hammers YA. Flow cytometric immunophenotyping test for staging/monitoring neuroblastoma patients. *Clin Cytom*. 2002;50(6):298–304.
33. Ferreira-facio CS, Milito C, Botafogo V, Fontana M, Thiago LS, Oliveira E, et al. Contribution of multiparameter flow cytometry immunophenotyping to the diagnostic screening and classification of pediatric cancer. *PLoS One*. 2013;8(3):e55534.
34. Mora J, Cheung NKV, Gerald WL. Genetic heterogeneity and clonal evolution in neuroblastoma. *Br J Cancer*. 2001;85(2):182–9.
35. Ahmed AA, Zhang L, Reddivalla N, Hetherington M. Neuroblastoma in children: update on clinicopathologic and genetic prognostic factors. *Pediatr Hematol Oncol*. 2017;34(3):165–85.
36. Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1984;311:231–235.
37. Oppedal BR, Storm-Mathisen I, Lie SO, Brandtzaeg P. Prognostic factors in neuroblastoma. Clinical, histopathologic, and immunohistochemical features and DNA ploidy in relation to prognosis. *Cancer*. 1988;62:772–780.
38. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in

childhood neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1991;9(4):581-91.

39. Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology.* 4. ed. Elsevier; 2005.

40. George RE, London WB, Cohn SL, Maris JM, Kretschmar C, Diller L, et al. Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2005;23(27):6466–73.

41. Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, Sakurai M, Tsuchida Y, Takcdu T, et al. Different Karyotypic Patterns in Early and Advanced Stage Neuroblastomas. *Cancer Res.* 1987;47(1):311–8.

42. Katzenstein HM, Bowman LC, Brodeur GM, Thorner PS, Joshi VV, Smith EI, et al. Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: the pediatric oncology group experience – a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol.* 1998;16:2007.

43. Sokol E, Desai A. The Evolution of Risk Classification for Neuroblastoma. *Children.* 2019;6(2):27.

44. Kaneco Y, Cohn SL. Ploidy and cytogenetics of neuroblastoma. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voûte PA. *Neuroblastoma.* Amsterdam: Elsevier Science BV; 2000. p. 41-56.

45. Darzynkiewicz Z, Crissman H, Jacobberger JW. Cytometry of the cell cycle: Cycling through history. *Cytometry.* 2004;58A(1):21–32.

46. Krishan A. Rapid DNA content analysis by the propidium iodide-hypotonic citrate method. *Met Cell Biol.* 1990;30:121–5.

47. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Cox C, Duque RE, et al. Guidelines for the implementation of clinical DNA cytometry. *Breast Cancer Res Treat.* 1993;28(1):61–8.

48. Pizzo PA, Poplack DG. *Ewing Sarcoma Family of Tumors Principles and practice of pediatric oncology.* 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

49. Antonangelo L, Rosa AG, Corá AP, Acencio MMP, Moreira LC, Suso FV. Uncommon pleural effusion: pleuropulmonary metastasis from primitive neuroectodermal tumor. *J Bras Pneumol.* 2009;35(6):606–9.

50. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*. 1999;86(2):349-63.
51. Szánthó E, Kárai B, Ivády G, Bedekovics J, Szegedi I, Petrás M, et al. Comparative Analysis of Multicolor Flow Cytometry and Immunohistochemistry for the Detection of Disseminated Tumor Cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(5):305–15.
52. Takigami A, Yamasawa H, Kurosaki A, Sakamoto N, Onuki T, Mato N, et al. Pazopanib confers a progression-free survival in a patient with ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the lung. *Intern Med*. 2019;58(9):1335–9.
53. Cabral-Júnior FDC, Pinna FDR, Voegels RL. Tumor neuroectodérmico de seios paranasais: diagnóstico e tratamento. *Rev Med*. 2012;91(3):219.
54. Kadri PA do S, Mello PMP de, Olivera JG de, Braga FM. Sarcoma de Ewing Epidural Lombar Primário: relato de caso. *Arq Neuropsiquiatr*. 2002;60(1):145–9.
55. Catalan J, Fonte AC da, Lusa JRB, Oliveira AD De, Melo ES De, Gonçalves CM. Sarcoma de Ewing: aspectos clínicos e radiográficos de 226 casos. *Radiol Bras*. 2005;38(5):333–6.
56. Tan Y, Zhang H, Ma GL, Xiao EH, Wang XC. Peripheral primitive neuroectodermal tumor: Dynamic CT, MRI and clinicopathological characteristics - analysis of 36 cases and review of the literature. *Oncotarget*. 2014;5(24):12968–77.
57. Kaspers GJ, Kamphorst W, van de Graaff M, van Alphen HA, Veerman AJ. Primary spinal epidural extraosseous Ewing's sarcoma. *Cancer*. 1991;68(3):648-54.
58. Gardner LJ, Polski JM, Fallon R, Dunphy CH. Identification of CD56 and CD57 by flow cytometry in Ewing's sarcoma or primitive neuroactodermal tumor. *Virchows Arch*. 1998;433(1):35–40.
59. Chang A, Benda PM, Wood BL, Kussick SJ. Lineage-specific identification of nonhematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. 2003;119(5):643–55.
60. DuBois SG, Epling CL, Teague J, Matthay KK, Sinclair E. Flow cytometric detection of ewing sarcoma cells in peripheral blood and bone marrow. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(1):13–8.

61. Lin PP, Wang Y, Lozano G. Mesenchymal stem cells and the origin of Ewing's sarcoma. Vol. 2011. Sarcoma. 2011.
62. Pearson HA. History of Pediatric Hematology Oncology. *Pediatr Res*. 2002;52(6):979–92.
63. Brok J, Lopez-Yurda M, Tinteren H V, Treger TD, Furtwängler R, Graf N, et al. Relapse of Wilms' tumour and detection methods: a retrospective analysis of the 2001 Renal Tumour Study Group–International Society of Paediatric Oncology Wilms' tumour protocol database. *Lancet Oncol*. 2018;19(8):1072–81.
64. Dabus GDC, Pereira IMR. Tumor de Wilms extra-renal: relato de caso. *Radiol Bras*. 2004;37(4):299–301.
65. Pode-Shakked N, Metsuyanım S, Harari-Steinberg O, Buzhor E, Omer D, Ben-Hur H, et al. Expression of stem cell markers in the human fetal kidney. *PLoS One*. 2009;4(8).
66. Royer-Pokora B, Busch M, Beier M, Duhme C, de Torres C, Mora J, et al. Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm. *Hum Mol Genet*. 2010;19(9):1651–68.
67. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: Connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):699–712.
68. Metsuyanım S, Harari-Steinberg O, Buzhor E, Omer D, Pode-Shakked N, Ben-Hur H, et al. Expression of stem cell markers in the human fetal kidney. *PLoS One*. 2009;4(8).
69. Choi PJ, Iwanaga J, Tubbs RS, Yilmaz E. Surgical Interventions for Advanced Parameningeal Rhabdomyosarcoma of Children and Adolescents. *Cureus*. 2018;10(1):8-11.
70. Siddiqui SH, Siddiqui E, Bavier RD, Patel NM, Kiliç S, Baredes S, et al. Clinicopathologic traits and prognostic factors associated with pediatric sinonasal rhabdomyosarcoma. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(4):363–9.
71. Moretti G, Guimarães R, Oliveira KM de, Sanjar F, Voegels RL. Rbdomiossarcoma de cabeça e pescoço: 24 casos e revisão da literatura. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(4):533–7.
72. Shen H, Tang Y, Dong AO, Li H, Shen D, Yang S, et al. Staging and monitoring of childhood rhabdomyosarcoma with flow cytometry. *Oncol Lett*. 2014;970–6.

7. ARTIGO

Será submetido à revista “Brazilian Journal of Medical and Biological Research.”

Title: Flow cytometry as a diagnostic tool in neuroblastoma

Authors: Gislaïne Furlanetto, Fabiane Spagnol, Ana Paula Alegretti, Mariela Granero Farias, Victor Jablonski Soares, Liane Esteves Daudt, Jiseh Fagundes Loss, Maria Lúcia Scroferneker and Mariana Bohns Michalowski.

Abstract

In recent years, there has been an expansion in the use of flow cytometry (FC) immunophenotyping in the diagnosis and monitoring of childhood solid neoplasms. Neuroblastoma (NB), in turn, is the most common extracranial solid tumor in childhood. In the present study, we sought to compare FC and anatomopathological examination (PA) of children diagnosed or suspected with NB. The median age was 59 months (minimum 0; maximum 325 months), of these 12 were male (57.1%, 12/21). Forty-eight samples (27 bone marrow (BM), 10 peripheral blood (PB), 8 primary tumors (PT) and 2 liver nodules (HN) and 1 rib fragment (RF) from 21 patients were evaluated. Twenty-nine samples were patients with suspected and 19 samples already had a previously confirmed diagnosis. Thirteen samples (7 BM, 5 PT and 1 HN) presented NB when analyzed in FC while 8 (3 BM and 5 PT) samples were positive for NB in the anatomopathological. They were concordant in 88.9% of the cases. No NB cells were identified in any PB. Considering the PA as the gold standard, the FC obtained a sensitivity of 100%, a specificity of 86%, a positive predictive value of 67% and a negative predictive value of 100%. This study demonstrates that FC can be used as a diagnostic and assessment methodology for NB impairment. In addition, FC has the advantage of allowing a quick diagnosis and accurate classification of the disease, and can also assist in monitoring the treatment.

Keywords: Neuroblastoma; Oncology; Pediatrics; Flow Cytometry; Immunohistochemistry; Diagnosis.

Introduction

Childhood solid tumors are diseases that are characterized by the abnormal growth of cells in a given tissue, except for hematopoietic tissue (1,2). These neoplasms represent about 30% of all pediatric cancers. The most common types are brain tumors, neuroblastoma (NB), rhabdomyosarcoma (RMS), Wilms' tumor (TW) and osteosarcoma (3).

NB is the most common extracranial solid tumor in childhood, accounting for 8-10% of all neoplasms in this age group, corresponding to 25 to 50 cases per million individuals (4-7). Its etiology is unknown, however, due to its higher incidence in infants, some authors suggest that preconceptional factors or gestational events may be relevant to their development (8-11). Although several genetic alterations have been observed in these neoplasms, including chromosomal alterations, polymorphism and genetic amplifications, there is, until today, no pathognomonic alteration for diagnosis (7).

The origin of NB occurs in the cells of the neural crest and usually develops from the adrenal medulla, and can also occur in sympathetic ganglia (12). In 70% of cases, the tumor is located in the abdomen (25% in the sympathetic ganglion and 40% in the adrenal medulla (5), 15% in the chest, 5% in the cervical region and 5% in the pelvic sympathetic ganglion) (13,14). Approximately half of them have localized or regional disease (15), while the other 50% already have distant metastases through lymphatic or hematogenous dissemination at the time of diagnosis (16,17).

With the data currently available in the literature, it is known that amplification of the MYCN gene and DNA ploidy have important prognostic implications in this pathology (18). Both the cure rate and the survival rate are greater than 90% (19) in patients with low and intermediate risks and localized tumors, while in high-risk cases, these rates drop to less than 50% (20,21).

Another factor that influences the prognosis is ploidy. Neuroblastomas with hyperdiploid cells tend to be associated with the early stages of the disease, respond better to chemotherapy and usually have a more favorable prognosis than diploid cells (21).

Within this context, the use of laboratory methods such as Flow Cytometry (FC), can be useful both in the diagnosis and in the risk stratification of NB, through the phenotypic detection of tumor cells, in the analysis of the DNA index,

in the evaluation of the dissemination of the disease in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM), as well as in the monitoring of treatment through the study of Measurable Residual Disease (MRD) (22,23). In addition to the applications already mentioned for FC, we can consider as its main advantages, the diagnostic agility and sensitivity provided by the multiparametric method.

The aim of this study was to use CF as a tool in the evaluation of different specimens of patients with suspected/diagnosed NB and to compare the results found with immunohistochemistry (IHC), a laboratory method considered the gold standard for the diagnosis of this pathology.

Materials and methods

Patients and samples

Twenty-one pediatric patients with suspected/diagnosed NB from 3 reference hospitals in Porto Alegre, Brazil, from May 2019 to August 2020 were studied. Forty-eight samples were evaluated, 27 of which were bone marrow, 10 of peripheral blood, 8 of primary tumors (PT), 2 of hepatic nodules (HN) and 1 of rib fragment (RF). Twenty-nine samples were patients with suspected and 19 samples were patients already had a previously confirmed diagnosis.

Ethical aspects

The study was approved by the ethics committee of the proposing institution, with secondary approvals from the ethics committees of all participating centers (CAAE: 89566018.8.0000.5327; 89566018.8.3001.5330; 89566018.8.3003.5530). All those responsible for the patients signed the Informed consent form (ICF).

The medical records of patients were reviewed for demographic data (sex, date of birth), presentation at diagnosis (date of diagnosis, amplification status of the MYCN gene, DNA ploidy, histological and staging according to INSS (International Neuroblastoma Staging System)).

Flow cytometry

Collection of samples of tissues and body fluids

The BM and PB samples were collected in tubes with EDTA anticoagulant, while PT, HN and RF were stored in a sterile flask with RPMI (Roswell Park Memorial Institute) to maintain the integrity of the material cells. The samples were transported under refrigeration at 2 to 8°C and immediately processed when they arrived at the laboratory.

Sample preparation

The preparation and marking of the samples followed the protocols of the EuroFlow consortium (<https://euroflow.org/protocols>) (24).

The antibodies used in the immunophenotypic panel for the characterization of NB were adapted from the works by Facio *et al.* 2013 and Theodorakos *et al.* 2019. This panel consists of: CD9 Pacific Blue (clone MEM-61, EXBIO), CD45 Pacific Orange (clone HI30, Invitrogen), CD73 PE (clone AD-2, BD - Becton Dickinson), GD2 PerCP-CY5.5 (clone 14.G2a, BD), CD56 PE-CY7 (clone N901, Beckman Coulter), CD90 APC (clone 5E.10, BD) and CD81 APC-H7 (clone JS-81, BD) (25,31).

DNA Ploidy

For the analysis of the DNA index, the CYCLOSCOPE-REAGENT KIT (Cytognos SL, Salamanca, Spain) and the monoclonal antibody CD56 FITC (clone N-CAM, BD) were used.

Acquisition of samples

Immediately at the end of sample preparation, all materials were cell count at low speed using the FACSCanto II Cytometer (BD, San Jose, California, USA).

Analyses of samples

Data analysis was performed using Infinicyt™ software (Cytognos SL, Salamanca, Spain) and the NB cells were identified by the immunophenotype: CD56⁺/CD81⁺/CD9⁺/CD90⁺/GD2⁺/CD73⁻/CD45⁻ (25,31), the minimum sensitivity considered was 50 events.

Statistical analysis

The number of individuals was obtained through samples of convenience. The statistical analyzes were performed using the Statistical Package for the Social Science software version 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Central tendency, dispersion and distribution measures were used, depending on the distribution and normality. P values < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The 21 patients evaluated had a median age of 59 months (minimum 0; maximum 325 months), with 57.1% being male (12/21).

Only 2 patients had amplification of the MYCN gene. Regarding the INSS staging, 5 patients were clinically classified in stage 3 and 6 patients in stage 4. Of these, none underwent changes regarding staging due to the result of FC.

Of the 48 samples analyzed, 13 samples were positive for NB by FC (**Figure 1**) (7 in BM, 5 in PT and 1 in HN) and 8 were positive for PA/IHC (3 in BM and 5 in PT).




One sample of BM that was positive in FC was not analyzed by IHC (**Table 1**). All FC samples for assessing the spread of NB in PB were negative. The methods were consistent in 88.9% of the cases. Considering the PA as the gold standard, FC obtained a sensitivity of 100%, a specificity of 86%, a positive predictive value of 67% and a negative predictive value of 100%.

As for the time to release the results between the two methodologies, the median in FC was 30 hours and 19 minutes and in the IHC it was 94 hours and 49 minutes ($P < 0.05$).

In 4 of the 5 PT samples positive for NB, the analysis of the DNA index was performed, which was 0.93, 0.94, 1.03 and 1.04, thus they fit in almost diploid samples (DNA index up to 1.18) (26).

Table 1. Sample characteristics

Sample	Age (months)	Staging INSS	Type sample	Result FC (%) for NB	Result IHC for NB
MPD	52	4	PB	Negative	NA
MPD	52	4	BM	8.7	Present
MPD	52	4	BM	Negative	Absent
MPD	53	4	BM	Negative	Absent
MPD	63	4	BM	0.02	Absent
MPD	63	4	PB	Negative	NA
ADRM	16	Investigation	PB	Negative	NA
ADRM	16	Investigation	BM	Negative	Absent
LMS	15	Investigation	BM	0.044	Not done
TGT	124	Investigation	BM	Negative	Absent
TGT	124	Investigation	BM	Negative	Absent
TGT	124	Investigation	HN	Negative	Absent
ACFK	95	Investigation	BM	Negative	Absent
ACFK	95	Investigation	BM	Negative	Absent
RCB	44	4	PT	52.7	Present
RCB	44	4	PB	Negative	NA
RCB	50	4	BM	Negative	Absent
RCB	50	4	PT	99.0	Present
RCB	50	4	PB	Negative	NA
PCD	325	Investigation	BM	Negative	Absent
THV	3	Investigation	BM	0.16	Present
THV	3	3	PB	Negative	NA
THV	6	3	PT	75.0	Present
MCRS	53	Investigation	BM	Negative	Absent
MCRS	53	Investigation	TP	Negative	Absent
JCSB	9	3	SP	Negative	NA
JCSB	9	3	BM	Negative	Absent
JCSB	9	3	BM	Negative	Absent
EFA	209	Investigation	HN	4.0	Absent
ATK	1	3	RF	Negative	Absent
SRB	65	Investigation	PT	Negative	Absent
SRB	65	Investigation	PB	Negative	NA
SRB	65	Investigation	BM	Negative	Absent
AJN	18	4	PT	16.2	Present
AJN	18	4	PB	Negative	NA
AJN	18	4	BM	Negative	Absent
AJN	18	4	BM	Negative	Absent
ACMH	165	Investigation	PT	Negative	Absent
ACMH	165	Investigation	BM	Negative	Absent
ACMH	165	Investigation	BM	Negative	Absent
JVSO	89	4	BM	0.01	Absent
AASM	51	4	BM	0.0026	Present
HOR	6	3	BM	Negative	Absent
RN LERP	0	Investigation	PB	Negative	NA
RN LERP	0	Investigation	BM	Negative	Absent
JARC	66	4	BM	0.27	Absent
SSS	17	3	PT	62.7	Present
SSS	17	3	BM	Negative	Absent

N/A: Not applicable
 Discordant result between methodologies
 IHC not done in BM
 Concordant result between methodologies

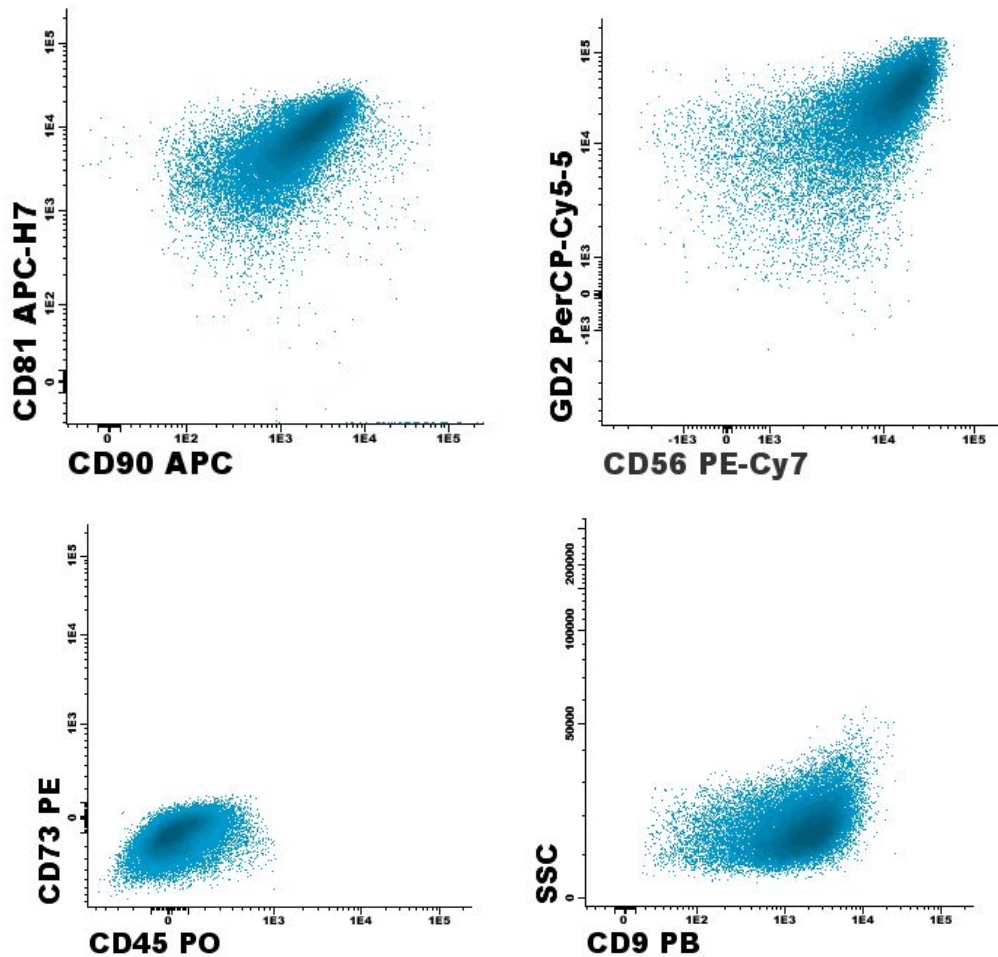


Figure 1. Dot plot diagrams illustrating the neuroblastoma population in a bone marrow sample by flow cytometry.

Discussion

Pediatric cancers have similar morphological and histopathological characteristics because they are mainly derived from early lymphoid precursors and embryonic mesenchymal and neuroectodermal precursors. Thus, the diagnosis of most of these tumors often requires additional characterization of the neoplastic cells. For these reasons, IHC, FC, molecular biology tests, among other methodologies are extremely relevant (25,27-29).

The need for a quick result is crucial in the diagnosis because it influences the patient's treatment protocol for an early start of treatment, with the possibility of a better therapeutic response (25,28,30). In this context, the availability of fast and sensitive techniques to accurately track the tumor cell line and establish the relevant differential diagnoses are essential.

In the NB, the investigation of the spread of the disease is part of the initial staging, allocation of treatment therapy and reassessment of the disease (31,32).

The panel of antibodies used for our work included immunophenotypic markers characteristic of NB based on published studies (25,31). We add CD73, because mesenchymal cells are immunophenotypically similar to those of NB. The CD73 and CD13 antibodies are the most discriminative because they are highly positive for mesenchymal cells. The proper classification of populations is very important for an accurate classification of NB, especially in MRD (31).

Although the sample number of our study is small, the data agree with the most frequent presentations described in the literature, where the disease affects infants and children mainly up to 10 years of age, most of them diagnosed before 5 years of age, as well as a prevalence in males (32-34).

In relation to one of the genetic alterations related to NB and mentioned in our research, the MYCN gene, two patients evaluated presented this amplification, both classified in stage 4 of the INSS, that is, of high risk. It is known that the amplification of this gene is related to the degree of aggressiveness of this disease (35,36)

Regarding the sensitivity of the method, Brahmi *et al.* in 2001, they reported that FC is more sensitive, objective and a quantitative methodology when compared to IHC (37). In 2019, Popov *et al.* also described a higher sensitivity in FC compared to IHC (38), such data are similar to those found in our research. Szántho *et al.* in 2018, reported that even in hypoplastic/aplastic environments, FC is more effective when compared to IHC, since considerably more cells can be analyzed (39). These data are corroborated in our study, since in 4 samples, 3 BM (0.01, 0.02, 0.27%) and 1 HN (4%), populations of NB by FC were identified and were not found in the IHC.

Another factor analyzed in our study was the tumor DNA index. The 4 samples analyzed were almost diploid, two of them from a 4-stage INSS patient. In 1991, Bourhis *et al.* evaluated the DNA ploidy index of a group of 59 patients with NB. Of these, 26 cases were diploid (DNA index =1) and 33 were aneuploid (DNA index >1). Most aneuploid tumors (84,8%) were almost triploid (DNA index between 1.25 and 1.68), 12,1% were almost diploid (DNA index up to 1.18) and 3,0% were hypotetraploid (index of DNA up to 1.85) (26). In 2002, Brodeur *et al.*

reported that almost diploid patients with INSS 3-4 staging are at intermediate to high risk in NB, while hyperdiploid patients demonstrate low risk, this is due to hyperdiploid neoplasms showing a propensity to have more apoptosis during treatment antineoplastic (40). There are data in the literature that the influence of the ploidy index on the prognosis seems to be lost after 2 years of age (41).

Through this study, we can confirm that FC is an applicable, fast and safe methodology in the diagnosis and monitoring of children with neuroblastoma, and can be used in addition to traditional methods such as IHC to increase sensitivity and diagnostic accuracy.

References

1. Gavhane Y, Shete A, Bhagat A, Shinde V, Bhong K, Khairnar G, et al. Solid tumors: facts, challenges and solutions. *Int J Pharma Sci Res.* 2011;2(1):1–12.
2. Jain A, Jain A, Gulbake A, Hurkat DP, Jain S. Solid tumors: A review. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011 Sep 13;3.

3. Kline NE, Sevier N. Solid Tumors in Children. *J Pediatr Nurs.* 2003;18(2):96–102.
4. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG (Editors), *Principles and practice of pediatric oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 933–970.
5. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet.* 2007;369(9579):2106–20.
6. Davis S, Rogers MA, Pendergrass TW. The incidence and epidemiologic characteristics of neuroblastoma in the United States. *Am J Epidemiol.* 1987 Dec;126(6):1063–74.
7. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2(1):16078.
8. Chow EJ, Friedman DL, Mueller BA. Maternal and perinatal characteristics in relation to neuroblastoma. *Cancer.* 2007;109(5):983–92.
9. Cook MN, Olshan AF, Guess HA, Savitz DA, Poole C, Blatt J, et al. Maternal medication use and neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiol.* 2004;159(8):721–31. .
10. Harder T, Plagemann A, Harder A. Birth weight and risk of neuroblastoma: A meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2010;39(3):746–56.
11. Kramer S, Ward E, Meadows AT, Malone KE. Medical and drug risk factors associated with neuroblastoma: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1987 May;78(5):797-804.
12. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet.* 2013;45(3):279–84.
13. Alexander F. Neuroblastoma. *Urol Clin North Am.* 2000 Aug;27(3):383-92, vii.
14. Schulte JH, Eggert A. Neuroblastoma. *Crit Rev Oncog.* 2015;20(3–4):245–70. .
15. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010 Feb;24(1):65-86.
16. Gesundheit B, Smith CR, Gerstle JT, Weitzman SS, Chan HSL. Ataxia and secretory diarrhea: Two unusual paraneoplastic syndromes occurring concurrently in the same patient with ganglioneuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004;26(9):549–52.

17. Morandi F, Corrias MV, Pistoia V. Evaluation of bone marrow as a metastatic site of human neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1335(1):23–31.
18. Smith MA, Seibel NL, Altekruse SF, Ries LAG, Melbert DL, O’Leary M, et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: Challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):2625–34.
19. Newman EA, Abdessalam S, Aldrink JH, Austin M, Heaton TE, Bruny J, et al. Update on neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 2019;54(3):383–9.
20. Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia M, Kramer K, Gollamudi S, Heller G, et al. N7: a novel multi-modality therapy of high risk neuroblastoma (NB) in children diagnosed over 1 year of age. *Med Pediatr Oncol.* 2001 Jan;36(1):227-30.
21. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. *J Clin Oncol.* 2008; 27:289-297.
22. Komada Y, Zhang XL, Zhou YW, Inaba H, Deguchi T, Azuma E, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and bone marrow for tumor cells in patients with neuroblastoma. *Cancer.* 1998;82(3):591–9.
23. Manrique B, Marti JL, Cacciavillano W, Rossi J. Neuroblastoma y citometría de flujo multiparamétrica , una nueva y posible herramienta diagnóstica. Caso clínico. *Arch Argent Pediatr.* 2016;114(2):100–3.
24. EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Sample preparation and staining; Version 1.5. <https://euroflow.org/protocols>. Accessed October 25, 2020.
25. Ferreira-facio CS, Milito C, Botafogo V, Fontana M, Thiago LS, Oliveira E, et al. Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. *PLoS One.* 2013;8(3):e55534.
26. Bourhis J, Bénard J, DeVathaire F, Wilson GD, Hartmann O, Terrier-Lacombe MJ, et al. Combined analysis of DNA ploidy index and N-myc genomic content in neuroblastoma. *Prog Clin Biol Res.* 1991;366:107–13.
27. Rushton J, López-Terrada D. Molecular and genetic basis of childhood cancer. *Cancer Biomark.* 2010;9(1-6):211-34.
28. Triche TJ, Hicks J, Sorensen PHB. Diagnostic pathology of pediatric malignancies. In: Pizzo PA, Poplack DG (Editors), *Principles and practices of pediatric oncology.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 165–215.

29. Dehner LP. The evolution of the diagnosis and understanding of primitive and embryonic neoplasms in children: living through an epoch. *Mod Pathol*. 1998 Jul;11(7):669-85.
30. Dang-Tan T, Franco EL. Diagnosis delays in childhood cancer: A review. *Cancer*. 2007;110(4):703–13.
31. Theodorakos I, Paterakis G, Papadakis V, Vicha A, Topakas G, Jencova P, et al. Interference of bone marrow CD56+ mesenchymal stromal cells in minimal residual disease investigation of neuroblastoma and other CD45-/CD56+ pediatric malignancies using flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;66(8):3–10.
32. Lucena JN, Alves MTS, Abib SCV, Souza GO de, Neves RP de C, Caran EMM. Aspectos clínicos, epidemiológicos e sobrevivência de crianças com neuroblastoma: 21 anos de experiência do instituto de oncologia pediátrica, São Paulo. *Rev Paul Pediatr*. 2018 Jul 10;36(3):254–60.
33. Bom APKP, Deponte CS, Lima IC, Piasecki L, Pierin AJ, Bonatto JV. Neuroblastoma cervical - Um relato de caso. *Resid Pediatr*. 2014;4(1):17-21.
34. Cartum J. Variáveis de prognóstico em crianças maiores de um ano portadoras de neuroblastoma disseminado. [Doctoral thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.
35. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984 Jun 8;224(4653):1121-4.
36. Morandi F, Barco S, Stigliani S, Croce M, Persico L, Lagazio C, et al. Altered erythropoiesis and decreased number of erythrocytes in children with neuroblastoma. *Oncotarget*. 2017;8(32):53194–209.
37. Brahmi U, Rajwanshi A, Joshi K, Dey P, Vohra H, Ganguly NK, Gupta SK. Flow cytometric immunophenotyping and comparison with immunocytochemistry in small round cell tumors. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001 Dec;23(6):405-12.
38. Popov A, Druy A, Shorikov E, Verzhbitskaya T, Solodovnikov A, Saveliev L, et al. Prognostic value of initial bone marrow disease detection by multiparameter flow cytometry in children with neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019 Feb 2;145(2):535–42.
39. Szánthó E, Kárai B, Ivády G, Bedekovics J, Szegedi I, Petrás M, et al. Comparative Analysis of Multicolor Flow Cytometry and Immunohistochemistry for the Detection of Disseminated Tumor Cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26(5):305–15.

40. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG (Editors), *Principles and practice of pediatric oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 902.
41. George RE, London WB, Cohn SL, Maris JM, Kretschmar C, Diller L, et al. Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2005;23(27):6466–73.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diversos parâmetros que são levados em consideração para classificar o grupo de risco do paciente com NB tem impacto na intensidade do tratamento e no prognóstico. Ter um diagnóstico inicial rápido e um acompanhamento com ampla sensibilidade/especificidade da doença são de extrema valia para um resultado favorável.

O constante progresso de aplicações e sensibilidade da CF faz com que ela se torne uma metodologia essencial e de uma grande importância na área clínica e laboratorial.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos dados obtidos neste trabalho, foi possível implementar e disponibilizar para assistência dois novos testes no Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Sendo, um destes testes o painel imunofenotípico para caracterização de neuroblastoma e o outro, a análise do índice de ploidia, um exame importante para o prognóstico dos pacientes portadores de neuroblastoma.

Novos estudos poderão ser realizados com o intuito de analisar a viabilidade da amostra de tumor primário em diferentes condições de armazenamento; ampliação da metodologia em outros tumores de pequenas células azuis da infância; aumento do tamanho amostral; estabelecer correlação com a evolução clínica; e tornar a citometria de fluxo uma metodologia padrão-ouro para o diagnóstico/acompanhamento do neuroblastoma.

10. ANEXOS E/OU APÊNDICES

Anexo 1

Artigo de revisão aceito para publicação no Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.

Data de submissão: 22/04/2020

Data de aceite: 05/05/2020

CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA EM TUMORES SÓLIDOS DA INFÂNCIA

FLOW CYTOMETRY AS A DIAGNOSTIC INSTRUMENT IN NEUROBLASTOMA

Gislaine Furlanetto

(Autor de Correspondência)

E-mail: gislainefurlanetto@gmail.com

Contribuição do autor: Coleta de Dados, Metodologia, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição

Afiliação(ões): [1] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas - Porto Alegre - RS - Brasil

Fabiane Spagnol

E-mail: fpedrazzani@hcpa.edu.br

Contribuição do autor: Redação - Preparação do original

Afiliação(ões): [2] - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Diagnóstico Especializado - Serviço de Diagnóstico Laboratorial - Porto Alegre - RS - Brasil

Ana Paula Alegretti

E-mail: aalegretti@hcpa.edu.br

Contribuição do autor: Redação - Preparação do original

Afiliação(ões): [2] - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Diagnóstico Especializado - Serviço de Diagnóstico Laboratorial - Porto Alegre - RS - Brasil

Mariela Granero Farias

E-mail: mgfarias@hcpa.edu.br

Contribuição do autor: Redação - Preparação do original

Afiliação(ões): [2] - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Diagnóstico Especializado - Serviço de Diagnóstico Laboratorial - Porto Alegre - RS - Brasil

Victor Jablonski Soares

E-mail: victorjablonski@gmail.com

Contribuição do autor: Redação - Preparação do original

Afiliação(ões): [3] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina - Porto Alegre - RS - Brasil

Liane Esteves Daudt

E-mail: ldaudt@hcpa.edu.br

Contribuição do autor: Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição

Afiliação(ões): [4] - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Hematologia Clínica e Transplante de Medula Óssea - Porto Alegre - RS - Brasil

Jiseh Fagundes Loss

E-mail: jloss@hcpa.edu.br

Contribuição do autor: Redação - Preparação do original

Afiliação(ões): [5] - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Oncologia Pediátrica - Porto Alegre - RS - Brasil

Mariana Bohns Michalowski

E-mail: mmichalowski@hcpa.edu.br

Contribuição do autor: Gerenciamento do Projeto, Redação - Preparação do original, Redação - Revisão e Edição, Supervisão

Afiliação(ões): [5] - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Oncologia Pediátrica - Porto Alegre - RS - Brasil

Total: 8 Autores

RESUMO

Os tumores sólidos da infância representam cerca de 30% de todos os cânceres pediátricos. Nos últimos anos, houve uma expansão no uso da Citometria de Fluxo (CF) no diagnóstico e acompanhamento destas patologias, já que se trata de um método que permite a obtenção rápida e precisa de resultados, possibilitando uma conduta mais precoce. Realizamos esta revisão através da pesquisa dos termos neoplasia, oncologia, pediatria, imunofenotipagem e citometria de fluxo nas plataformas de dados LILACS, PUBMED e SCIELO. Assim, descrevemos os principais achados até o momento sobre o uso da CF no diagnóstico diferencial das cinco principais neoplasias de pequenas células azuis da infância: Neuroblastoma, Sarcoma de Ewing, Tumor Neuroectodérmico Primitivo, Tumor de Wilms e Rabdomiossarcoma. Além disso, discutimos as principais vantagens e inconvenientes do método e painéis que são propostos no diagnóstico diferencial destas patologias através da literatura internacional. Observa-se através desta revisão que a utilização da CF no diagnóstico de tumores sólidos pode ser útil para uma rápida e precisa identificação da patologia e início precoce do tratamento.

DESCRITORES: oncologia. pediatria. imunofenotipagem

ABSTRACT

Childhood solid tumors represent about 30% of all pediatric cancers. In recent years, there has been an expansion in the use of Flow Cytometry (FC) in the diagnosis and monitoring of these pathologies, since it is a method that allows for quick and accurate results, enabling earlier conduct. Through the search for terms: neoplasia, oncology, pediatrics, immunophenotyping and flow cytometry on the data platforms: LILACS, PUBMED and SCIELO. In this review of the literature we describe what is known so far about the use of FC in the differential diagnosis of the five main small blue cell neoplasms of childhood: Neuroblastoma, Ewings Sarcoma, Primitive Neuroectodermal Tumor, Wilms Tumor and Rhabdomyosarcoma. In addition, we describe the main advantages and disadvantages of the method and panels that are proposed in the differential diagnosis of these pathologies through international literature. It is observed through this review that the use of FC in the diagnosis of solid tumors can be useful for a quick identification of the pathology and early initiation of treatment.

HEADINGS: neoplasms. pediatrics. immunophenotyping

Fonte de financiamento: Não

Conflito de interesses: Não

É Ensaio Clínico? Não

Data de Submissão: Wednesday, April 22, 2020

Decisão final: Tuesday, May 5, 2020

Citometria de fluxo como ferramenta diagnóstica em tumores sólidos da infância

Introdução

Os tumores sólidos da infância são doenças que se caracterizam pelo crescimento anormal de células de um determinado tecido, exceto os derivados do tecido hematopoiético, ou seja, leucemias e linfomas.^{1,2} Estas neoplasias representam cerca de 30% de todos os cânceres pediátricos, sendo os tipos mais comuns os tumores cerebrais, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms e osteossarcoma.³

As manifestações clínicas variam de acordo com o tipo histológico do tumor, localização primária e idade do paciente.⁴ O diagnóstico é realizado pela correlação entre os dados clínicos e os resultados dos exames laboratoriais em especial anatomopatológico (análise histoquímica e citológica) que, devido à metodologia empregada, muitos dias podem se passar entre a suspeita e a definição do diagnóstico. Este tempo tem implicações pessoais para o paciente e sua família, além do impacto no custo devido ao eventual tempo de internação e de prognóstico, visto que posterga o início do tratamento.^{5,6}

Entre os tumores sólidos existe um subgrupo denominado neoplasias de pequenas células azuis. Elas recebem essa definição por serem compostas de células primitivas, portanto, células que ainda não se diferenciam e que adquirem uma cor azulada ao serem analisadas pelo patologista.⁷ Por apresentarem aspecto semelhante entre patologias, necessitam de uma análise aprofundada de marcadores para um diagnóstico correto. Neste caso, um estudo imunohistoquímico cuidadoso faz com que haja, muitas vezes, um tempo longo entre a biópsia tecidual e o diagnóstico definitivo, retardando, assim, o início do tratamento destas crianças. Novos métodos que permitam agilidade no diagnóstico sem perder a sensibilidade e especificidade das técnicas atuais disponíveis vem de encontro às necessidades e demandas clínicas do momento. Dentro deste contexto, a citometria de fluxo vem se mostrando como uma ferramenta importante no auxílio a um diagnóstico mais rápido e preciso, em especial em centros que não dispõem de estudos citogenéticos. Por este motivo, nesta revisão, abordaremos o uso da citometria de fluxo (CF), assim como o imunofenótipo no diagnóstico das cinco principais neoplasias de pequenas células azuis da infância: Neuroblastoma (NB), Sarcoma de Ewing (SE), Tumor Neuroectodérmico Primitivo (PNET), Tumor de Wilms (TW) e Rhabdomyosarcoma (RMS).

Neuroblastoma

Neuroblastoma é o tumor sólido extracraniano mais comum na infância, sendo responsável por 8-10% de todas as neoplasias nesta faixa etária.^{8,9,10} Esta patologia corresponde de 25 a 50 casos por milhão de indivíduos.¹¹ Sua etiologia é pouco conhecida porém, devido à sua incidência maior em lactentes, alguns autores sugerem que fatores pré-concepcionais ou eventos gestacionais (ex: diabetes gestacional, deficiência de ácido fólico, exposição a drogas, hormônios, toxinas ou vírus) possam ter relevância no seu desenvolvimento.^{12,13,14,15} Apesar de várias alterações genéticas terem sido observadas nestas neoplasias, incluindo alterações cromossômicas, polimorfismo e ampliações genéticas, não há hoje uma alteração patognomônica de diagnóstico.¹¹

O NB se origina das células da crista neural e geralmente se desenvolve a partir da medula da adrenal, podendo também ocorrer em gânglios simpáticos.¹⁶ Em 70% dos casos, o tumor está localizado no abdome (25% no gânglio simpático e 40% na medula da adrenal,⁹ 15% no tórax, 5% na região cervical e 5% no gânglio simpático pélvico).^{17,18} Aproximadamente metade deles apresentam doença localizada ou regional,¹⁹ enquanto os outros 50% já apresentam metástases distantes por meio de disseminação linfática ou hematogênica no momento do diagnóstico.^{20,21}

O tratamento a ser realizado é variável e dependente de vários fatores que contribuem para a classificação do grupo de risco do paciente. A maior parte dos protocolos internacionais usa os seguintes critérios na definição de risco: idade ao diagnóstico, status da amplificação do gene N-MYC, ploidia do DNA, histologia e INSS (do inglês, *International Neuroblastoma Staging System*), anormalidades genéticas, permitindo classificar o paciente em baixo, intermediário e alto risco.^{22,23} Também é importante avaliar a elevação do ácido vanilmandélico e do ácido homovanílico que podem ser detectados em 90% de todos os pacientes com NB,¹¹ ferritina sérica e do lactato desidrogenase (LDH), os quais podem indicar pior prognóstico.²⁴

Do ponto de vista molecular, o sequenciamento de genes candidatos identificou mutações no ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), em mais de 50% dos casos familiares e em 5% a 15% dos casos esporádicos de neuroblastoma.²⁵ ALK é um expansor oncogênico estabelecido de NB causando proliferação descontrolada de células e propriedades de sobrevivência das mesmas.²⁴

Com os dados disponíveis atualmente na literatura, sabe-se que a amplificação do gene N-MYC e a ploidia de DNA têm as implicações prognósticas mais importantes para a patologia.²⁴ Tanto a taxa de cura quanto a taxa de sobrevida são superiores a

90%²⁶ nos pacientes que apresentam riscos baixo e intermediário e tumores localizados, já nos casos de alto risco essas taxas caem para 40-50%.^{27,28}

Dentro deste contexto, a Citometria de Fluxo pode ser útil nesta patologia tanto ao diagnóstico, através da análise de marcadores de superfície celular, quanto na estratificação de risco, através da avaliação do índice de DNA.

Deteção de neuroblastoma por Citometria de Fluxo

Nos últimos anos, houve uma grande expansão no uso da CF por se tratar de um método que permite a obtenção rápida e precisa nos diagnósticos de neoplasias, possibilitando um início de tratamento precoce. A imunofenotipagem por CF pode ser utilizada no diagnóstico de NB e na avaliação da disseminação da doença no sangue periférico (SP) e medula óssea (MO), bem como no acompanhamento do tratamento através da pesquisa de Doença Residual Mínima (DRM).^{29,30}

Nas últimas décadas, diversos pesquisadores testaram diferentes combinações de anticorpos monoclonais com o objetivo de obter uma maior especificidade na células tumorais. No ano de 1998, Komada *et al.* utilizaram uma combinação de CD9/CD56/CD45 para deteção de células residuais de NB na MO e SP. Neste estudo, fizeram análises simultâneas com diferentes fluorocromos e evidenciaram uma população celular distinta com o fenótipo CD9⁺/CD56⁺/CD45⁻, sugerindo a presença de células de NB metastáticas. Já no ano 2000, Nagai *et al.* concluiu que a combinação de CD81⁺/CD56⁺/CD45⁻ era mais sensível e específica para deteção de DRM para NB. Foi comparado a reatividade do CD81 com o CD9, sendo observado uma maior sensibilidade do CD81 possivelmente devido à interferência do CD9 na marcação de plaquetas.

Em 2002, Warzynski *et al.* utilizaram os marcadores já anteriormente descritos para identificar as células de NB e estudaram dois novos marcadores: a proteína de membrana disialogangliosídeo (GD2) e a enzima enolase neuro-específica intracitoplasmática (cyNSE). Com esta pesquisa concluíram que as células de neuroblastoma são CD45⁻/CD56^{forte}/GD2⁺/cyNSE⁺.

Portanto, hoje podemos usar uma combinação imunofenotípica de marcadores com um painel de, no mínimo, 6 cores para a caracterização desta patologia. São utilizados anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos que permitem a identificação do perfil de expressão antigênica do NB. A população de células que apresenta positividade para os marcadores CD56 forte, CD81, CD9, CD90, GD2 e que são negativas para o CD45 é característico de NB, conforme **Figura 1**.^{31,33}

Avaliação do Índice de Ploidia de neuroblastoma por Citometria de Fluxo

A ploidia é um fator importante e útil para a classificação de risco e prognóstico do paciente com NB. Esta análise pode ser estabelecida através da citometria de fluxo e métodos citogenéticos (FISH - do inglês, *Fluorescent In Situ Hybridization* ou *microarray*).^{34,35}

As alterações na ploidia da célula tumoral são resultado de uma alteração na função mitótica, relacionada à taxa de proliferação celular. É um indicador de prognóstico em vários tipos de tumores.³⁶ Quando os tumores apresentam índice de DNA $\leq 1,00$ casos hipodiploides, os resultados são piores do que nos casos hiperdiploides em que o índice de DNA é $\geq 1,16$.^{36,37}

Em 1984, Look *et al.* relatou que índices mais elevados de DNA estavam associados a uma melhor resposta terapêutica em bebês com tumores irredutíveis. É claramente observado em inúmeras séries de pacientes que NB em crianças menores de 12 meses de idade apresentam um melhor prognóstico comparado a pacientes mais velhos. Entretanto, até NB de lactentes, quando hipodiploides, apresentam maior chance de falha terapêutica precoce.³⁸ Já um resultado favorável para o prognóstico está associado à aneuploidia na linhagem de células-tronco e baixa porcentagem de células tumorais nas fases S, G2 e M do ciclo celular.³⁹ A influência da ploidia em relação ao prognóstico parece ser perdida após os 2 anos de idade.⁴⁰

Já em 1987, Kaneko *et al.* mostraram a associação entre tumores triploides e o prognóstico favorável, enquanto que os tumores diploides e tetraploides foram associados a estadios mais avançados.

Portanto, pacientes com hiperdiploidia ou triploidia geralmente apresentam tumores de estadio baixo e melhor resposta terapêutica, principalmente se não há amplificação do gene N-MYC.^{38,40,42,43} Nos tumores com estadio mais avançado, é mais comum a diploidia (44-57 cromossomos) e a hipotetraploidia (81-103 cromossomos).⁴⁴ As neoplasias hiperdiploides apresentam uma propensão a ter mais apoptose durante o tratamento antineoplásico.⁴⁰

A análise do conteúdo de DNA por CF é amplamente utilizada para revelar a ploidia e estimar a proliferação através da distribuição dos ciclos celulares em populações de células normais e tumorais.⁴⁵

Para a identificação do neuroblastoma e análise do DNA é utilizado um anticorpo monoclonal conjugado com um fluorocromo que permite a identificação das células neoplásicas presentes na amostra e um corante de ligação de DNA chamado iodeto de propídio (IP), o qual permite realizar uma análise de conteúdo do DNA das células neoplásicas em contrapartida com o conteúdo do DNA das células normais diplóides.⁴⁶

A comparação do conteúdo relativo de DNA no pico das fases G0/G1 das células tumorais com o das células normais permite a detecção de aneuploidias. O índice de DNA é calculado dividindo o valor da intensidade média de fluorescência (IMF) do IP da população tumoral pela IMF do IP da população de referência (células normais).⁴⁷

Diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico de neuroblastoma comparado ao de Citometria de Fluxo

No diagnóstico histopatológico, a maioria destes tumores pertence ao grupo de “tumores de células pequenas redondas e azuis”, caracterizados por células indiferenciadas, pequenas e redondas, usualmente de difícil diagnóstico morfológico.^{48,49}

No ano de 1999, o Sistema Internacional de Classificação de Patologia do Neuroblastoma (INPC - do inglês, International Neuroblastoma Pathology Classification), baseado na primeira classificação de Shimada 1984, acrescentou algumas informações relacionadas a histologia do tumor. O NB é dividido em 3 subtipos: indiferenciado, pouco diferenciado e diferenciado.⁵⁰ O exame histopatológico convencional, associado a técnica de imuno-histoquímica, é o padrão ouro para o diagnóstico de neuroblastoma.³³

A utilização da CF está sendo um grande avanço para o diagnóstico de tumores sólidos. No trabalho de Facio et al 2013, às análises de neuroblastoma por CF e imuno-histoquímica foram concordantes em 100% dos diagnósticos.

Em 2018, Szánthó *et al.* fizeram um estudo onde tinham como objetivo comparar a eficácia diagnóstica entre a CF e a morfologia / imuno-histoquímica na detecção de células tumorais disseminadas na MO e fluidos corporais de pacientes com tumores sólidos. Foram analisadas 36 amostras de 16 pacientes com suspeita ou com diagnóstico de NB, realizadas no diagnóstico ou no acompanhamento do tratamento. A concordância entre as duas metodologias foi de 65% para a presença de doença. Foi visto que a

detecção de células tumorais disseminadas é mais eficaz na citometria do que na imunohistoquímica, sendo de 100% versus 86%, respectivamente. A vantagem da citometria foi ainda mais acentuada quando avaliaram DRM, onde a eficácia foi de 92% versus 68%. Além disso, outra vantagem da CF é poder analisar mais células de um material mesmo em amostras hipoplásicas.⁵¹

Assim sendo, a CF permite agilidade diagnóstica e sensibilidade de estadiamento do NB com início de tratamento mais adequado e precoce.

Sarcoma de Ewing e Tumor Neuroectodérmico Primitivo

Denomina-se sarcoma de Ewing o tumor cujas células são indiferenciadas, e como tumor neuroectodérmico primitivo aquele com células que apresentam diferenciação neural.^{49,52,53}

O SE normalmente é localizado em ossos longos e na pelve, raramente origina-se em tecidos não-ósseos e excepcionalmente no espaço epidural raquiano.⁵⁴ Estima-se que a incidência de SE responde por cerca de 6% a 10% dos tumores ósseos malignos primários, sendo, portanto, o quarto mais frequente deste grupo de lesões,⁵⁵ enquanto, PNET representa 4% dos tumores de partes moles.⁵⁶

O diagnóstico diferencial entre o SE e os demais PNET é baseado na história do paciente, no exame físico, resultados de exames de imagem, além da análise histopatológica.^{53,57} A CF vem sendo estudada mais recentemente como método diagnóstico devido às suas potenciais vantagens de rapidez e sensibilidade.

Perfil imunofenotípico de Sarcoma de Ewing e Tumor Neuroectodérmico Primitivo

Em 1998, Gardner *et al*, identificaram a expressão de CD56/CD57 em 2 casos de PNET sugerindo que, a expressão de CD56, juntamente com CD99, na ausência do CD45, poderia ser altamente sugestiva de PNET.

Em 2003, Chang *et al*, relataram um caso de SE positivo para CD56, CD99, CD90 e CD117 por CF. Em 2010, Dubois *et al*, descreveram o achado de células CD99⁺/CD45⁻ em amostras de SP e MO de pacientes com SE. Neste mesmo estudo eles publicaram a utilização de CD99, CD45, CD14 e CD34, sendo o CD14 para a exclusão de monócitos e

o CD34 de progenitores hematopoiéticos, tornando essa a estratégia para detecção de DRM de SE.

No ano de 2013 Facio *et al*, relataram que GD2 e CD271 foram os dois marcadores mais úteis para diferenciar neuroblastoma (GD2forte e CD271negativo/fraco) dos demais PNET (GD2negativo/fraco e CD271forte). Estes resultados sustentam a hipótese que a expressão forte de CD271 observada nos PNET pode estar associada à origem das células-tronco mesenquimais desses tumores.

Estes estudos mostram o potencial do uso destes marcadores na CF no diagnóstico e diferenciação destas neoplasias.⁶¹

Tumor de Wilms

O tumor de Wilms, também conhecido como nefroblastoma é o tumor primário renal mais comum da infância, correspondendo a 6% dos diagnósticos de câncer pediátrico. A média de idade ao diagnóstico é de 3-5 anos.⁶² Estima-se que na Europa a cada ano, 1000 novos pacientes são diagnosticados com essa patologia.⁶³

O diagnóstico é realizado associando-se métodos de imagem, achados cirúrgicos e histológicos.⁶⁴ O prognóstico dos pacientes com tumores com histologia favorável tem melhorado nas últimas décadas, alcançando taxas de sobrevida de 90% em quatro anos.

Imunofenótipo do Tumor de Wilms

Em 2009, foi descrito por Pode-Shakked *et al*. a expressão variada de alguns marcadores de células hematopoiéticas (CD34, CD117, CD133), mesenquimais (CD105, CD90, CD44), relacionados a câncer (CD133, MDR1), associação entre a positividade para NCAM (CD56) e a fração de "células tronco tumorais" na análise de células do Tumor de Wilms. Estes autores ainda sugerem que o NCAM é também um marcador de células progenitoras renais malignas de TW.

No ano de 2010, Royer-Pokora *et al*. descreveram a caracterização e o estabelecimento de cinco células de linhagem oriundas do TW com mutação WT1 quanto à expressão de genes e proteínas que já haviam sido descritos nas células-tronco mesenquimais e no mesoderma paraxial (CD73, CD90 e CD105). Os resultados deste estudo evidencia a capacidade limitada de diferenciar Wilms das linhagens mesenquimais, pois o perfil de expressão gênica demonstram que as linhagens celulares de WT são muito semelhantes às das células-tronco mesenquimais humanas, por

possuírem as mesmas expressões de proteínas de superfície. Também neste estudo, concluíram que WT com mutações WT1 têm características específicas do mesoderma paraxial, que é a fonte de células estromais renais.

No estudo de Facio *et al.* (2013) foram caracterizados dois pacientes com tumor de Wilms. Tais casos mostraram populações de células tumorais (coexistentes), porém claramente distintas fenotipicamente, sendo positivo para: CD56 e CD58, e negativo para CD45, CD99, GD2, nuMYOD1, nuMiogenina, CD10 e NG2, mas com reatividade distinta (expressão negativa versus positiva) para CD90, EpCAM e CD57. Essas observações de marcadores estão alinhadas com a coexistência relatada de epitélio (por exemplo, EpCAM⁺, CD90⁻) e componentes celulares mesenquimais (EpCAM⁻, CD90⁺) em TW por histopatologia.^{65,67,68} Tais dados mostram outro uso potencial da CF: compreender melhor a heterogeneidade tumoral.

Rabdomiossarcoma

O rabdomiossarcoma, por sua vez, é um raro sarcoma de tecidos moles de origem mesenquimal, com evidência de diferenciação de células musculares estriadas. Corresponde a 2,9% de todos os cânceres pediátricos dos Estados Unidos e sua incidência é de 4,5 casos/milhão de crianças e adolescentes por ano. É o terceiro tumor extracraniano mais comum em crianças, depois do NB e TW e tem aproximadamente 50% de todos os casos de diagnósticos em crianças menores de 10 anos de idade.^{69,70}

O sítio primário mais comum de RMS em crianças e adolescentes é a região da cabeça e pescoço, seguida pelo trato gênito-urinário, extremidades, tórax e retroperitônio. Os subsítios tumorais na região da cabeça e pescoço incluem a órbita, os sítios parameningeos (nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, osso temporal, fossa pterigopalatina e fossa infratemporal) e os sítios não-parameningeos. Os tumores que invadem apenas a órbita têm melhor prognóstico.⁷¹

O diagnóstico é baseado na história clínica, exame físico, exames laboratoriais, como hemograma, perfil bioquímico e enzimas hepáticas, nasofibroscopia, tomografia computadorizada, ressonância magnética e biópsia com anatomopatológico.⁷¹

A citometria de fluxo no Rbdomiossarcoma

Nos últimos anos, houve uma evolução no uso da CF para o diagnóstico de metástases em MO de pacientes com RMS.

Em 2014, Shen *et al.*, avaliaram onze pacientes com suspeita de metástase, comparando análise morfológica (padrão-ouro) à CF de aspirado de MO. Neste estudo pode-se observar a positividade para células malignas em três pacientes através do exame anatomopatológico e em quatro pacientes através da CF. Todos os três casos positivos no AP foram também positivos na CF, sendo que esta última detectou positividade em um paciente a mais. A porcentagem de células positivas obtidas na CF foi de 29,3%, 12,3%, 6,8% e 0,35% sobre o total de células nucleadas, mostrando uma boa sensibilidade. O caso morfológicamente negativo, mas com nível de detecção celular de 0,35% por CF, levou os pesquisadores a fazerem uma análise morfológica retrospectiva que obteve resultado positivo para o achado de células neoplásicas também neste caso. Esses estudos realizados com pequenos números de pacientes sugerem uma importância da CF como método sensível na detecção da extensão tumoral.^{72,73}

Novas possibilidades de detecção de células tumorais circulantes por meio da CF, sugerem aumentar a precisão destes achados. Um dos biomarcadores expressos em rbdmiossarcomas, PAX3 (gene da família BOX emparelhado 3), foi quantificado por CF em comparação à qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) obtendo sensibilidade similar ou até superior em diferentes linhagens celulares para esta neoplasia.⁷⁴

Hoje utiliza-se o fenótipo CD45⁺/CD56⁺/CD90⁺/miogenina⁺ para diagnóstico de rbdmiossarcoma, sendo que pode haver uma expressão variável de CD57.⁷⁵ Este perfil é semelhante ao perfil imunofenotípico de NB, porém a utilização de GD2 auxilia na diferenciação destas duas neoplasias, já que é somente positivo nos NB's.⁷²

Discussão

A citometria de fluxo é uma metodologia diagnóstica e de monitoramento muito difundida nas doenças hematológicas. Ela apresenta diversas vantagens em relação ao exame anatomopatológico tradicional (histopatológico e imuno-histoquímico), entre eles a sensibilidade e a rapidez do método. Para garantir a qualidade e uniformização do resultado, a utilização de painéis apropriados para as linhagens da patologia que está sendo investigada é crucial na etapa da execução/conclusão do diagnóstico laboratorial. Com isso, desenvolvemos um painel de tubos para a caracterização das doenças abordadas nesta revisão conforme descrito na **Tabela 1**.

Outro benefício da CF é a capacidade de identificação imunofenotípica individual das células, mesmo em condições com pouco material para análise devido à sensibilidade do teste. Na **Figura 2** descrevemos a expressão dos tumores sólidos pediátricos citados neste estudo.

Hoje entende-se que é fundamental a implementação de tecnologias que acelerem e qualifiquem o processo diagnóstico e terapêutico em Oncologia pediátrica. Tais medidas têm impacto no tempo de internação hospitalar, no contexto familiar além da tomada de decisão terapêutica.^{5,6} Nesse sentido, a imunofenotipagem por CF tem cada vez mais se mostrado como uma ferramenta útil como método diagnóstico para avaliação de disseminação de células tumorais na medula óssea e fluidos corporais e acompanhamento da avaliação de resposta ao tratamento através da pesquisa de DRM de diversos tumores pediátricos.^{29,51}

As evidências em torno da utilização de marcadores fenotípicos como CD56 e CD90 demonstram que, atualmente, a técnica de CF não está em desvantagem em termos de sensibilidade e especificidade em relação aos métodos padrão-ouro como imuno-histoquímica e exame histopatológico convencional. Inclusive, como demonstrado Almazán-Moga *et al.* em 2014, a CF parece ter sensibilidade maior na detecção de células tumorais circulantes.

Conclusão

De acordo com os dados apresentados, podemos afirmar que a citometria de fluxo é um método auxiliar no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de diversas malignidades, sendo essencial e de uma grande relevância para um diagnóstico rápido e classificação precisa da doença além do monitoramento cuidadoso da eficácia do tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Gavhane Y, Shete A, Bhagat A, Shinde V, Bhong K, Khairnar G, et al. Solid tumors: facts, challenges and solutions. *Int J Pharma Sci Res.* 2011;2(1):1–12.
2. Jain A, Jain A, Gulbake A, Hurkat P, Jain SK. Solid tumors: a review. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3(SUPPL. 5):45–51.
3. Kline NE, Sevier N. Solid Tumors in Children. *J Pediatr Nurs.* 2003;18(2):96–102.
4. Lima ER, Fonseca KC, Cavacami E, Rodrigues KE de S. Apresentação clínica dos tumores sólidos mais comuns na infância e adolescência. *Rev Med Minas Gerais.* 2008;18(4):27–33.
5. Bouzas, L. F.; Calazans M. Tumores sólidos e hematológicos na infância e na adolescência – Parte I. *Adolescência & Saúde.* 2007;4(1):40–4.
6. Arendonk KJ Van, Chung DH. Neuroblastoma: Tumor biology and its implications for staging and treatment. *Children.* 2019;6(1):12.
7. Dos Santos Torres U, De Andrade Ribeiro MC, Souza AS, Borim LNB. Tumor desmoplásico de pequenas células redondas abdominal da infância: Relato de caso. *J Bras Patol e Med Lab.* 2010;46(1):55–9.
8. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 933–970.
9. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet.* 2007;369(9579):2106–20.
10. Davis S, Rogers MA, Pendergrass TW. The incidence and epidemiologic characteristics of neuroblastoma in the United States. *Am J Epidemiol.* 1987; 126:1063–1074.
11. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2.
12. Chow EJ, Friedman DL, Mueller BA. Maternal and perinatal characteristics in relation to neuroblastoma. *Cancer.* 2007;109(5):983–92.
13. Cook MN, Olshan AF, Guess HA, Savitz DA, Poole C, Blatt J, et al. Maternal medication use and neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiol.* 2004;159(8):721–31.
14. Harder T, Plegemann A, Harder A. Birth weight and risk of neuroblastoma: A meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2010;39(3):746–56.
15. Kramer S, Ward E, Meadows AT, Malone KE. Medical and drug risk factors associated with neuroblastoma: a case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1987;78(5):797-804.
16. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet.* 2013;45(3):279–84.

17. Alexander F. Neuroblastoma. *Urol Clin North Am.* 2000;27(3):383–92.
18. Schulte JH, Eggert A. Neuroblastoma. *Crit Rev Oncog.* 2015;20(3–4):245–70.
19. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010;24(1):65–86.
20. Gesundheit B, Smith CR, Gerstle JT, Weitzman SS, Chan HSL. Ataxia and secretory diarrhea: Two unusual paraneoplastic syndromes occurring concurrently in the same patient with ganglioneuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004;26(9):549–52.
21. Morandi F, Corrias MV, Pistoia V. Evaluation of bone marrow as a metastatic site of human neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1335(1):23–31.
22. Brodeur GM, Castleberry RP. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 2. ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1993. p. 739–68.
23. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 895–937.
24. Newman EA, Abdessalam S, Aldrink JH, Austin M, Heaton TE, Bruny J, et al. Update on neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 2019;54(3):383–9.
25. Devoto M, Specchia C, Laudenslager M, Longo L, Hakonarson H, Maris J, et al. Genome-wide linkage analysis to identify genetic modifiers of ALK mutation penetrance in familial neuroblastoma. *Hum Hered.* 2011;71(2):135–9.
26. Smith MA, Seibel NL, Altekruse SF, Ries LAG, Melbert DL, O’Leary M, et al. Outcomes for children and adolescents with cancer: Challenges for the twenty-first century. *J Clin Oncol.* 2010;28(15):2625–34.
27. Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia M, Kramer K, Gollamudi S, Heller G, et al. N7: A novel multi-modality therapy of high-risk neuroblastoma (neuroblastoma) in children diagnosed over 1 year of age. *Med Pediatr Oncol.* 2001; 36:227–230.
28. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *N Engl J Med.* 1999;341(16):1165–73.
29. Komada Y, Zhang XL, Zhou YW, Inaba H, Deguchi T, Azuma E, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and bone marrow for tumor cells in patients with neuroblastoma. *Cancer.* 1998;82(3):591–9.
30. Manrique B, Marti JL, Cacciavillano W, Rossi J. Neuroblastoma y citometría de flujo multiparamétrica , una nueva y posible herramienta diagnóstica. Caso clínico. *Arch Argent Pediatr.* 2016;114(2):100–3.
31. Nagai J, Ishida Y, Koga N, Tanaka Y, Ohnuma K, Toyoda Y. A new sensitive and specific combination of CD81/CD56/CD45 monoclonal antibodies for detecting circulating neuroblastoma Cells in Peripheral Blood Using Flow Cytometry. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2000;22(1):20–6.

32. Warzynski MJ, Graham DM, Axtell RA, Higgins J V., Hammers YA. Flow cytometric immunophenotyping test for staging/monitoring neuroblastoma patients. *Clin Cytom.* 2002;50(6):298–304.
33. Ferreira-facio CS, Milito C, Botafogo V, Fontana M, Thiago LS, Oliveira E, et al. Contribution of multiparameter flow cytometry immunophenotyping to the diagnostic screening and classification of pediatric cancer. *PLoS One.* 2013;8(3):e55534.
34. Mora J, Cheung NKV, Gerald WL. Genetic heterogeneity and clonal evolution in neuroblastoma. *Br J Cancer.* 2001;85(2):182–9.
35. Ahmed AA, Zhang L, Reddivalla N, Hetherington M. Neuroblastoma in children: update on clinicopathologic and genetic prognostic factors. *Pediatr Hematol Oncol.* 2017;34(3):165–85.
36. Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1984;311:231–235.
37. Oppedal BR, Storm-Mathisen I, Lie SO, Brandtzaeg P. Prognostic factors in neuroblastoma. Clinical, histopathologic, and immunohistochemical features and DNA ploidy in relation to prognosis. *Cancer.* 1988;62:772–780.
38. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 1991;9(4):581-91.
39. Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology.* 4. ed. Elsevier; 2005.
40. George RE, London WB, Cohn SL, Maris JM, Kretschmar C, Diller L, et al. Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2005;23(27):6466–73.
41. Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, Sakurai M, Tsuchida Y, Takcdu T, et al. Different Karyotypic Patterns in Early and Advanced Stage Neuroblastomas. *Cancer Res.* 1987;47(1):311–8.
42. Katzenstein HM, Bowman LC, Brodeur GM, Thorner PS, Joshi VV, Smith EI, et al. Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: the pediatric oncology group experience – a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol.* 1998;16:2007.
43. Sokol E, Desai A. The Evolution of Risk Classification for Neuroblastoma. *Children.* 2019;6(2):27.
44. Kaneco Y, Cohn SL. Ploidy and cytogenetics of neuroblastoma. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voûte PA. *Neuroblastoma.* Amsterdam: Elsevier Science BV; 2000. p. 41-56.
45. Darzynkiewicz Z, Crissman H, Jacobberger JW. Cytometry of the cell cycle: Cycling through history. *Cytometry.* 2004;58A(1):21–32.

46. Krishan A. Rapid DNA content analysis by the propidium iodide-hypotonic citrate method. *Met Cell Biol.* 1990;30:121–5.
47. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Cox C, Duque RE, et al. Guidelines for the implementation of clinical DNA cytometry. *Breast Cancer Res Treat.* 1993;28(1):61–8.
48. Pizzo PA, Poplack DG. *Ewing Sarcoma Family of Tumors Principles and practice of pediatric oncology.* 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
49. Antonangelo L, Rosa AG, Corá AP, Acencio MMP, Moreira LC, Suso FV. Uncommon pleural effusion: pleuropulmonary metastasis from primitive neuroectodermal tumor. *J Bras Pneumol.* 2009;35(6):606–9.
50. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer.* 1999;86(2):349-63.
51. Szánthó E, Kárai B, Ivády G, Bedekovics J, Szegedi I, Petrás M, et al. Comparative Analysis of Multicolor Flow Cytometry and Immunohistochemistry for the Detection of Disseminated Tumor Cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018;26(5):305–15.
52. Takigami A, Yamasawa H, Kurosaki A, Sakamoto N, Onuki T, Mato N, et al. Pazopanib confers a progression-free survival in a patient with ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the lung. *Intern Med.* 2019;58(9):1335–9.
53. Cabral-Júnior FDC, Pinna FDR, Voegels RL. Tumor neuroectodérmico de seios paranasais: diagnóstico e tratamento. *Rev Med.* 2012;91(3):219.
54. Kadri PA do S, Mello PMP de, Olivera JG de, Braga FM. Sarcoma de Ewing Epidural Lombar Primário: relato de caso. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002;60(1):145–9.
55. Catalan J, Fonte AC da, Lusa JRB, Oliveira AD De, Melo ES De, Gonçalves CM. Sarcoma de Ewing: aspectos clínicos e radiográficos de 226 casos. *Radiol Bras.* 2005;38(5):333–6.
56. Tan Y, Zhang H, Ma GL, Xiao EH, Wang XC. Peripheral primitive neuroectodermal tumor: Dynamic CT, MRI and clinicopathological characteristics - analysis of 36 cases and review of the literature. *Oncotarget.* 2014;5(24):12968–77.
57. Kaspers GJ, Kamphorst W, van de Graaff M, van Alphen HA, Veerman AJ. Primary spinal epidural extraosseous Ewing's sarcoma. *Cancer.* 1991;68(3):648-54.
58. Gardner LJ, Polski JM, Fallon R, Dunphy CH. Identification of CD56 and CD57 by flow cytometry in Ewing's sarcoma or primitive neuroectodermal tumor. *Virchows Arch.* 1998;433(1):35–40.
59. Chang A, Benda PM, Wood BL, Kussick SJ. Lineage-specific identification of nonhematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* 2003;119(5):643–55.

60. DuBois SG, Epling CL, Teague J, Matthay KK, Sinclair E. Flow cytometric detection of ewing sarcoma cells in peripheral blood and bone marrow. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;54(1):13–8.
61. Lin PP, Wang Y, Lozano G. Mesenchymal stem cells and the origin of Ewing's sarcoma. Vol. 2011, *Sarcoma*. 2011.
62. Pearson HA. History of Pediatric Hematology Oncology. *Pediatr Res*. 2002;52(6):979–92.
63. Brok J, Lopez-Yurda M, Tinteren H V, Treger TD, Furtwängler R, Graf N, et al. Relapse of Wilms' tumour and detection methods: a retrospective analysis of the 2001 Renal Tumour Study Group–International Society of Paediatric Oncology Wilms' tumour protocol database. *Lancet Oncol*. 2018;19(8):1072–81.
64. Dabus GDC, Pereira IMR. Tumor de Wilms extra-renal: relato de caso. *Radiol Bras*. 2004;37(4):299–301.
65. Pode-Shakked N, Metsuyanım S, Harari-Steinberg O, Buzhor E, Omer D, Ben-Hur H, et al. Expression of stem cell markers in the human fetal kidney. *PLoS One*. 2009;4(8).
66. Royer-Pokora B, Busch M, Beier M, Duhme C, de Torres C, Mora J, et al. Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm. *Hum Mol Genet*. 2010;19(9):1651–68.
67. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: Connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):699–712.
68. Metsuyanım S, Harari-Steinberg O, Buzhor E, Omer D, Pode-Shakked N, Ben-Hur H, et al. Expression of stem cell markers in the human fetal kidney. *PLoS One*. 2009;4(8).
69. Choi PJ, Iwanaga J, Tubbs RS, Yilmaz E. Surgical Interventions for Advanced Parameningeal Rhabdomyosarcoma of Children and Adolescents. *Cureus*. 2018;10(1):8–11.
70. Siddiqui SH, Siddiqui E, Bavier RD, Patel NM, Kiliç S, Baredes S, et al. Clinicopathologic traits and prognostic factors associated with pediatric sinonasal rhabdomyosarcoma. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019;9(4):363–9.
71. Moretti G, Guimarães R, Oliveira KM de, Sanjar F, Voegels RL. Rabdomiossarcoma de cabeça e pescoço: 24 casos e revisão da literatura. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(4):533–7.
72. Shen H, Tang Y, Dong AO, Li H, Shen D, Yang S, et al. Staging and monitoring of childhood rhabdomyosarcoma with flow cytometry. 2014;970–6.
73. Bozzi F, Gambirasio F, Luksch R, Collini P, Brando B, Fossati-Bellani F. Detecting CD56+/NB84+/CD45- immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry. *Anticancer Res*. 2006;26(5 A):3281–7.

74. Almazán-Moga A, Roma J, Molist C, Vidal I, Jubierre L, Soriano A, et al. Optimization of rhabdomyosarcoma disseminated disease assessment by flow cytometry. *Cytom Part A*. 2014;85(12):1020–9.

75. Gautam U, Srinivasan R, Rajwanshi A, Bansal D, Marwaha RK. Comparative evaluation of flow-cytometric immunophenotyping and immunocytochemistry in the categorization of malignant small round cell tumors in fine-needle aspiration cytologic specimens. *Cancer Cytopathol*. 2008;114(6):494–503.

Anexos



Figura 2 - Padrão de expressão dos marcadores imunofenotípicos de alguns tumores sólidos pediátricos

Tabela 1 - Marcadores Imunofenotípicos

	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PERCP	PE-CY7	APC	APC-H7
Neuroblastoma	CD9	CD45		CD73	GD2	CD56	CD90	CD81
PNET	CD9	CD45	CD99	CD721		CD56	CD117	CD81
Tumor de Wilms	CD9	CD45	CD90	CD271		CD56	EPCAM	CD81
Rabdomiossarcoma	CD9	CD45	MYO1	MIOGENINA		CD56	CD90	CD81
Sarcoma de Ewing	CD9	CD45	CD99	CD117		CD56	CD90	CD81

PNET: tumores neuroectodérmicos primitivos.

Tabela 1 - Pannel de tubos para caracterização imunofenotípica e diferenciação de tumores sólidos pediátricos de pequenas células azuis.



Figura 1 - Diagramas de dot plot ilustrando a população de neuroblastoma, cujo fenótipo é representado por: CD45-/CD56+forte/CD90+/CD81+/CD9+/GD2+.

Anexo 2

STROBE

Statement - checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
Introduction		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
Methods		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses