

# Citometria de fluxo como ferramenta diagnóstica em tumores sólidos da infância

## *Flow cytometry as a diagnostic tool in childhood solid tumors*

Gislaine Furlanetto<sup>1</sup>; Fabiane Spagnol<sup>2</sup>; Ana Paula Alegretti<sup>2</sup>; Mariela G. Farias<sup>2</sup>; Victor J. Soares<sup>1</sup>; Liane E. Daudt<sup>2</sup>; Jiseh F. Loss<sup>2</sup>; Mariana B. Michalowski<sup>2</sup>

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. 2. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre; Rio Grande do Sul, Brasil.

### 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 no acompanhamento dessas 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 da literatura com uma pesquisa dos seguintes termos nas plataformas de dados Lilacs, PubMed e Scielo: neoplasia, oncologia, pediatria, imunofenotipagem e citometria de fluxo. Dessa forma, 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 rhabdomyosarcoma. Além disso, discutimos as principais vantagens e os inconvenientes do método e dos painéis que são propostos no diagnóstico diferencial dessas patologias por meio da literatura internacional. Observamos por meio desta revisão que a utilização da CF no diagnóstico de tumores sólidos pode ser útil para uma rápida e precisa identificação da patologia, bem como para o início precoce do tratamento.

**Unitermos:** neoplasia; oncologia; pediatria; imunofenotipagem; citometria de fluxo.

### ABSTRACT

*Childhood solid tumors represent about 30% of all pediatric cancers. In recent years, there has been some expansion in the use of flow cytometry (FC) in the diagnosis and monitoring of these diseases, since it is a method that allows for rapid and accurate results, enabling earlier conduct. We performed a literature search for a systematic review of the following terms in the Lilacs, PubMed, and Scielo data platforms: neoplasm, oncology, pediatrics, immunophenotyping, and flow cytometry. Thus, we describe the main findings to date on the use of FC in the differential diagnosis of the five main small round blue cell tumors of childhood: neuroblastoma, Ewing 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 the international literature. Through this review, we observed that the use of FC in the diagnosis of solid tumors can be useful for rapid and accurate identification of the disease, as well as for the early initiation of treatment.*

**Key words:** neoplasm; oncology; pediatrics; immunophenotyping; flow cytometry.

## RESUMEN

*Los tumores sólidos infantiles representan aproximadamente el 30% de todos los cánceres pediátricos. En los últimos años se ha incrementado el uso de la citometría de flujo (CF) en el diagnóstico y seguimiento de estas patologías, ya que es un método que permite obtener resultados rápidos y precisos, posibilitando un manejo más precoz. Realizamos esta revisión sistemática para la búsqueda bibliográfica de los siguientes términos en las plataformas de datos Lilacs, PubMed y Scielo: neoplasma, oncología, pediatría, inmunofenotipificación y citometría de flujo. Así, describimos los principales hallazgos hasta la fecha sobre el uso de CF en el diagnóstico diferencial de los cinco principales tumores de células pequeñas, redondas y azules de la infancia: neuroblastoma, sarcoma de Ewing, tumor neuroectodérmico primitivo, tumor de Wilms y rhabdomiocarcinoma. Además, describimos las principales ventajas y desventajas del método y paneles que se proponen en el diagnóstico diferencial de estas patologías a través de la literatura internacional. A través de esta revisión, observamos que el uso de CF en el diagnóstico de tumores sólidos puede ser útil para la identificación rápida y precisa de la enfermedad, así como para el inicio más temprano del tratamiento.*

**Palabras clave:** neoplasia; oncología; pediatría; inmunofenotipificación; citometría de flujo.

## 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<sup>(1, 2)</sup>. Essas neoplasias representam cerca de 30% de todos os cânceres pediátricos; os tipos mais comuns são: tumores cerebrais, neuroblastoma (NB), rhabdomiocarcinoma (RMS), tumor de Wilms (TW) e osteossarcoma<sup>(3)</sup>.

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

Entre os tumores sólidos, há um subgrupo denominado neoplasias de pequenas células azuis. Esse subgrupo recebe essa definição por ser composto de células primitivas, portanto, células que ainda não se diferenciam e que adquirem uma cor azulada ao serem analisadas pelo patologista<sup>(7)</sup>. Por apresentar aspecto semelhante entre patologias, necessita de uma análise aprofundada de marcadores para um diagnóstico correto. Nesse 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 dessas crianças. Novos métodos que permitam agilidade no

diagnóstico sem perder a sensibilidade e a especificidade das técnicas atuais disponíveis vêm ao encontro das necessidades e das demandas clínicas do momento. Dentro desse contexto, a citometria de fluxo (CF) mostra-se como uma importante ferramenta no auxílio a um diagnóstico mais rápido e preciso, em especial em centros que não dispõem de estudos citogenéticos. Por esse motivo, nesta revisão, abordaremos o uso da CF, assim como o imunofenótipo no diagnóstico das cinco principais neoplasias de pequenas células azuis da infância: NB, sarcoma de Ewing (SE), tumor neuroectodérmico primitivo (PNET), TW e RMS.

## NB

NB é o tumor sólido extracraniano mais comum na infância; é responsável por 8%-10% de todas as neoplasias nessa faixa etária<sup>(8-10)</sup>. Essa patologia corresponde de 25 a 50 casos por milhão de indivíduos<sup>(11)</sup>. Sua etiologia é pouco conhecida, porém, devido à sua maior incidência em lactentes, alguns autores sugerem que fatores pré-concepcionais ou eventos gestacionais (por exemplo, diabetes gestacional, deficiência de ácido fólico, exposição a drogas, hormônios, toxinas ou vírus) possam ter relevância no seu desenvolvimento<sup>(12-15)</sup>. Apesar de várias alterações genéticas terem sido observadas nessas neoplasias, incluindo alterações cromossômicas, polimorfismo e ampliações genéticas, não há atualmente uma alteração patognomônica de diagnóstico<sup>(11)</sup>.

O NB origina-se das células da crista neural e, geralmente, se desenvolve a partir da medula da adrenal, podendo ocorrer ainda em gânglios simpáticos<sup>(16)</sup>. Em 70% dos casos, o tumor está localizado no abdômen (25% no gânglio simpático e 40% na medula da adrenal<sup>(9)</sup>), 15% no tórax, 5% na região cervical e 5% no

gânglio simpático pélvico)<sup>(17, 18)</sup>. Aproximadamente metade deles apresenta doença localizada ou regional<sup>(19)</sup>, enquanto os outros 50%, metástases distantes por meio de disseminação linfática ou hematogênica no momento do diagnóstico<sup>(20, 21)</sup>.

O tratamento é variável e dependente de vários fatores que contribuem para a classificação do grupo de risco do paciente. A maioria dos protocolos internacionais utiliza os seguintes critérios na definição de risco: idade ao diagnóstico, *status* da amplificação do gene *N-MYC*, ploidia do ácido desoxirribonucleico (DNA), histologia e *international neuroblastoma staging system* (INSS), além de anormalidades genéticas, o que permite classificar o paciente em baixo, intermediário e alto risco<sup>(22, 23)</sup>. Também é importante avaliar a elevação do ácido vanilmandélico e do ácido homovanílico – que podem ser detectados em 90% dos indivíduos com NB<sup>(11)</sup> –, bem como da ferritina sérica e do lactato desidrogenase (LDH), os quais podem indicar pior prognóstico<sup>(24)</sup>.

Do ponto de vista molecular, o sequenciamento de genes candidatos identificou mutações no *anaplastic lymphoma kinase* (*ALK*) em mais de 50% dos casos familiares e em 5%-15% dos casos esporádicos de NB<sup>(25)</sup>. *ALK* é um expansor oncogênico estabelecido para NB que gera a proliferação descontrolada de células e as propriedades de sobrevivência delas<sup>(24)</sup>.

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<sup>(24)</sup>. Tanto a taxa de cura quanto a taxa de sobrevida são superiores a 90%<sup>(26)</sup> nos pacientes que apresentam riscos baixo e intermediário e tumores localizados; nos casos de alto risco, essas taxas caem para 40%-50%<sup>(27, 28)</sup>.

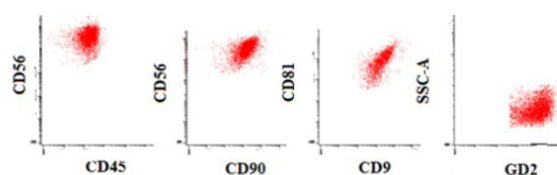
A partir desse contexto, a CF pode ser útil para o NB, tanto no diagnóstico, por meio da análise de marcadores de superfície celular, quanto na estratificação de risco, através da avaliação do índice de DNA.

## DETECÇÃO DE NB POR CF

Recentemente, houve um aumento considerável 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 na medula óssea (MO), bem como no acompanhamento do tratamento por meio da pesquisa de doença residual mínima (DRM)<sup>(29, 30)</sup>.

Nas últimas décadas, diversos pesquisadores testaram diferentes combinações de anticorpos monoclonais com o objetivo de obter maior especificidade nas células tumorais. Em 1998, Komada *et al.* (1998)<sup>(29)</sup> utilizaram uma combinação de CD9/CD56/CD45 para detecção de células residuais de NB na MO e no SP. Neste estudo, análises simultâneas foram feitas com diferentes fluorocromos e evidenciaram uma população celular distinta com o fenótipo CD9<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>, sugerindo a presença de células de NB metastáticas. Já em 2000, Nagai *et al.* (2000)<sup>(31)</sup> concluíram que a combinação de CD81<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> era mais sensível e específica para detecção de DRM para NB. Os autores compararam a reatividade do CD81 com a do CD9 e observaram maior sensibilidade do CD81 possivelmente devido à interferência do CD9 na marcação de plaquetas.

Em 2002, Warzynski *et al.* (2002)<sup>(32)</sup> utilizaram os marcadores anteriormente descritos para identificar as células de NB e estudaram dois novos marcadores: a proteína de membrana disialogangliosídeo (GD2) e a enzima enolase neuroespecífica intracitoplasmática (cyNSE). Com essa pesquisa, eles concluíram que as células de NB são CD45<sup>-</sup>/CD56<sup>forte</sup>/GD2<sup>+</sup>/cyNSE<sup>+</sup>. Portanto, hoje podemos usar uma combinação imunofenotípica de marcadores com um painel de, no mínimo, seis cores para a caracterização dessa patologia. Para tanto, 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<sup>forte</sup>, CD81, CD9, CD90, GD2 e negatividade para o CD45 é específica de NB, conforme mostra a **Figura 1**<sup>(31, 33)</sup>.



**FIGURA 1** – Diagramas de dot plot ilustrando a população de neuroblastoma, cujo fenótipo é representado por CD45<sup>-</sup>/CD56<sup>forte</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD81<sup>+</sup>/CD9<sup>+</sup>/GD2<sup>+</sup>

Fonte: Ferreira-Facio et al. (2013)<sup>(33)</sup>.

## AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PLOIDIA DE NB POR CF

A ploidia é um fator importante e útil para a classificação de risco e o prognóstico do paciente com NB. Esta análise pode ser estabelecida por meio da CF e de métodos citogenéticos, como o *fluorescent in situ hybridization* ou *microarray* (FISH)<sup>(34, 35)</sup>.

As alterações na ploidia da célula tumoral são resultado de uma alteração na função mitótica, relacionada com a taxa de proliferação celular. Elas são um indicador de prognóstico em vários tipos de tumores<sup>(36)</sup>. Quando os tumores apresentam índice de DNA  $\leq 1$  caso hipodiploide, os resultados são piores do que nos casos hiperdiploides, em que o índice de DNA é  $\geq 1,16$ <sup>(36, 37)</sup>.

Em 1984, Look *et al.* (1984)<sup>(36)</sup> relataram que índices mais elevados de DNA estavam associados a uma melhor resposta terapêutica em bebês com tumores irrissecáveis. A partir da análise de inúmeras séries de pacientes, verificamos que crianças com menos de 1 ano de idade com NB apresentam melhor prognóstico em comparação com pacientes mais velhos. Entretanto, o tratamento de lactentes com NB, quando hipodiploides, apresenta maior chance de falha terapêutica precoce<sup>(38)</sup>. Um resultado favorável para o prognóstico está associado à aneuploidia na linhagem de células-tronco e à baixa porcentagem de células tumorais nas fases S, G2 e M do ciclo celular<sup>(39)</sup>. A influência da ploidia em relação ao prognóstico parece desaparecer após os 2 anos de idade<sup>(40)</sup>.

Em 1987, Kaneko *et al.* (1987)<sup>(41)</sup> mostraram associação entre tumores triploides e prognóstico favorável, enquanto 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 houver amplificação do gene *N-MYC*<sup>(38, 40, 42, 43)</sup>. Nos tumores com estadio mais avançado, é comum a diploidia (44-57 cromossomos) e a hipotetraploidia (81-103 cromossomos)<sup>(44)</sup>. As neoplasias hiperdiploides são mais propensas a ter mais apoptose durante o tratamento antineoplásico<sup>(40)</sup>.

A análise do conteúdo de DNA por CF é amplamente utilizada para revelar a ploidia e estimar a proliferação celular por meio da distribuição dos ciclos celulares em populações de células normais e tumorais<sup>(45)</sup>.

Para a identificação do NB e a análise do DNA, um anticorpo monoclonal é utilizado e conjugado com um fluorocromo que permite a identificação das células neoplásicas presentes na amostra, além de um corante de ligação de DNA – denominado iodeto de propídio (IP) –, o qual permite realizar uma análise de conteúdo do DNA das células neoplásicas, com base no conteúdo do DNA das células normais diploides<sup>(46)</sup>.

A comparação do conteúdo relativo de DNA no pico das fases G0/G1 das células tumorais com o conteúdo 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)<sup>(47)</sup>.

## DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO DO NB COMPARADO COM O DA CF

---

No diagnóstico histopatológico, a maioria desses tumores pertence ao grupo “tumores de células pequenas redondas e azuis”, pois são caracterizados por células indiferenciadas, pequenas e redondas, normalmente de difícil diagnóstico morfológico<sup>(48, 49)</sup>.

Em 1999, o Sistema Internacional de Classificação de Patologia do Neuroblastoma (INPC), com base na primeira classificação de Shimada, em 1984, acrescentou algumas informações relacionadas com a histologia do tumor. O NB divide-se em três subtipos: indiferenciado, pouco diferenciado e diferenciado<sup>(50)</sup>. O exame histopatológico convencional, associado à técnica de imuno-histoquímica, é o padrão-ouro para o diagnóstico de NB<sup>(53)</sup>.

A utilização da CF é um grande avanço para o diagnóstico de tumores sólidos. No trabalho de Ferreira-Facio *et al.* (2013)<sup>(33)</sup>, as análises de NB por CF e imuno-histoquímica foram concordantes em 100% dos diagnósticos.

Em 2018, Szánthó *et al.* (2018)<sup>(51)</sup> fizeram um estudo cujo objetivo era comparar a eficácia diagnóstica entre a CF e a morfologia/imuno-histoquímica na detecção de células tumorais disseminadas na MO, bem como os fluidos corporais de pacientes com tumores sólidos. Trinta e seis amostras foram analisadas 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. Os autores verificaram que a detecção de células tumorais disseminadas é mais eficaz na CF do que na imuno-histoquímica (100% *vs* 86%, respectivamente). A vantagem da CF foi ainda mais acentuada quando avaliaram DRM; a eficácia foi de 92% *vs* 68%, respectivamente. Além disso, outra vantagem da CF é poder analisar, mesmo em amostras hipoplásicas, mais células de um material.

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

## SE E PNET

---

SE é o tumor cujas células são indiferenciadas, e PNET é a patologia com células que apresentam diferenciação neural<sup>(49, 52, 53)</sup>. O SE normalmente se localiza em ossos longos e

na pelve; raramente se origina em tecidos não ósseos; é incomum no espaço epidural raquiano<sup>(54)</sup>. Estima-se que a incidência de SE seja de aproximadamente 6% a 10% dos tumores ósseos malignos primários, sendo, portanto, o quarto tumor mais frequente desse grupo de lesões<sup>(55)</sup>. Já o PNET representa 4% dos tumores de partes moles<sup>(56)</sup>.

O diagnóstico diferencial entre o SE e os demais PNET se baseia na história do paciente, no exame físico, nos resultados de exames de imagem, além da análise histopatológica<sup>(53, 57)</sup>. A CF tem sido estudada mais recentemente como método diagnóstico devido às suas potenciais vantagens de rapidez e sensibilidade.

## PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DE SE E PNET

Gardner *et al.* (1998)<sup>(58)</sup> identificaram a expressão de CD56/CD57 em dois casos de PNET, sugerindo que a expressão de CD56, juntamente à de CD99, na ausência do CD45, poderia ser altamente sugestiva de PNET.

Em 2003, Chang *et al.*<sup>(59)</sup> relataram um caso de SE positivo para CD56, CD99, CD90 e CD117 por CF. Dubois *et al.*<sup>(60)</sup>, em 2010, descreveram o achado de células CD99<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> em amostras de SP e MO de pacientes com SE. Nesse mesmo estudo, eles publicaram a utilização de CD99, CD45, CD14 e CD34. O CD14 foi utilizado para a exclusão de monócitos e o CD34, para progenitores hematopoiéticos. Tal medida tornou essa estratégia ideal para detecção de DRM de SE.

Em 2013, Ferreira-Facio *et al.*<sup>(63)</sup> relataram que GD2 e CD271 foram os dois marcadores mais úteis para diferenciar NB (GD2<sup>forte</sup> e CD271<sup>negativo/fraco</sup>) dos demais PNET (GD2<sup>negativo/fraco</sup> e CD271<sup>forte</sup>). Esses resultados sustentam a hipótese de que a expressão forte de CD271 observada nos PNETs pode estar associada à origem das células-tronco mesenquimais desses tumores.

Os estudos mencionados mostram o potencial do uso desses marcadores na CF no diagnóstico e na diferenciação dessas neoplasias<sup>(61)</sup>.

## TW

O TW, também conhecido como nefroblastoma, é o tumor primário renal mais comum da infância; corresponde a 6% dos casos de câncer pediátrico. A média de idade ao diagnóstico é de 3-5 anos<sup>(62)</sup>. Estima-se que, na Europa, a cada ano, 1000 novos pacientes são diagnosticados com essa patologia<sup>(63)</sup>.

O diagnóstico é realizado associando-se métodos de imagem, achados cirúrgicos e histológicos<sup>(64)</sup>. 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 TW

Em 2009, Pode-Shakked *et al.*<sup>(65)</sup> relataram a expressão variada de alguns marcadores de células hematopoiéticas (CD34, CD117 e CD133) e mesenquimais (CD105, CD90 e CD44) e daquelas que se relacionam com o câncer (CD133 e MDR1), bem como a associação entre a positividade para NCAM (CD56) e a fração de “células-tronco tumorais” na análise de células do TW. Os autores ainda sugerem que o NCAM também é um marcador de células progenitoras renais malignas de TW.

Royer-Pokora *et al.* (2010)<sup>(66)</sup> relataram 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 evidenciam a capacidade limitada para diferenciar Wilms das linhagens mesenquimais, pois o perfil de expressão gênica demonstra que as linhagens celulares de WT são muito semelhantes às das células-tronco mesenquimais humanas, por possuírem as mesmas expressões de proteínas de superfície. Eles também concluíram que o WT com mutações *WT1* apresentam características específicas do mesoderma paraxial, que é a fonte de células estromais renais.

No estudo de Ferreira-Facio *et al.* (2013)<sup>(63)</sup>, dois pacientes foram diagnosticados com TW. Tais casos mostraram populações de células tumorais (coexistentes), porém, claramente distintas quanto ao fenótipo; elas foram positivas para CD56 e CD58 e negativas para CD45, CD99, GD2, nuMYOD1, nuMiogenina, CD10 e NG2. Contudo, apresentaram 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<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>) e componentes celulares mesenquimais (EpCAM<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>) em TW por histopatologia<sup>(65, 67, 68)</sup>. Esses dados mostram outro uso potencial da CF: compreender melhor a heterogeneidade tumoral.

## RMS

O RMS 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 do TW, e aproximadamente 50% dos pacientes acometidos têm menos de 10 anos de idade<sup>(69,70)</sup>.

O sítio primário mais comum de RMS em crianças e adolescentes é a região da cabeça e do pescoço, seguida pelo trato genitourinário, extremidades, tórax e retroperitônio. Os subsítios tumorais na região da cabeça e do pescoço incluem órbita, sítios parameningeos (nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, osso temporal, fossa pterigopalatina e fossa infratemporal) e sítios não parameningeos. Os tumores que invadem apenas a órbita apresentam melhor prognóstico<sup>(71)</sup>. Seu diagnóstico se baseia em história clínica, exame físico, exames laboratoriais (como hemograma, perfil bioquímico e enzimas hepáticas), nasofibrosopia, tomografia computadorizada, ressonância magnética e biópsia com anatomopatológico<sup>(71)</sup>.

## CF NO RMS

Atualmente, houve uma evolução no uso da CF para o diagnóstico de metástases em MO de pacientes com RMS. Shen *et al.* (2014)<sup>(72)</sup> avaliaram 11 pacientes com suspeita de metástase, comparando análise morfológica (padrão-ouro) com CF de aspirado de MO. Nesse estudo, foi possível observar a positividade para células malignas em três pacientes por meio do exame anatomopatológico e em quatro pacientes por meio da CF. Todos os três casos positivos no anatomopatológico também foram positivos na CF (que ainda 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 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, a qual também obteve resultado positivo para o achado de células neoplásicas. Esses estudos realizados com pequenos números de pacientes sugerem a importância da CF como método sensível na detecção da extensão tumoral<sup>(72,73)</sup>.

Novas possibilidades de detecção de células tumorais circulantes por meio da CF sugerem aumentar a precisão desses achados. Um dos biomarcadores expressos em RMS, o gene da família BOX emparelhado 3 (*PAX3*), foi quantificado por CF em comparação com a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), obtendo sensibilidade similar ou até superior em diferentes linhagens celulares para essa neoplasia<sup>(74)</sup>.

Atualmente, o fenótipo CD45/CD56<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/mioigenina<sup>+</sup> é utilizado para o diagnóstico de RMS. Entretanto, pode haver uma expressão variável de CD57<sup>(75)</sup>. Esse perfil é semelhante ao perfil imunofenotípico de NB, porém, a utilização de GD2 auxilia na diferenciação dessas duas neoplasias, já que é somente positivo nos NBs<sup>(72)</sup>.

## DISCUSSÃO

A CF é uma metodologia diagnóstica e de monitoramento muito utilizada nas doenças hematológicas. Ela apresenta diversas vantagens em relação ao exame anatomopatológico tradicional (histopatológico e imuno-histoquímico), entre elas, a sensibilidade e a rapidez do método. Para garantir a qualidade e a 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. A partir desses achados, desenvolvemos um painel de tubos para a caracterização das doenças abordadas nesta revisão, conforme descrito na **Tabela**.

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 em nosso estudo.

Nos dias atuais, entendemos 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,

TABELA – 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	CD721		CD56	EPCAM	CD81
Rabdomiossarcoma	CD9	CD45	MYOD1	MIOGENINA		CD56	CD90	CD81
Sarcoma de Ewing	CD9	CD45	CD99	CD117		CD56	CD90	CD81

PNET: tumores neuroectodérmicos primitivos.

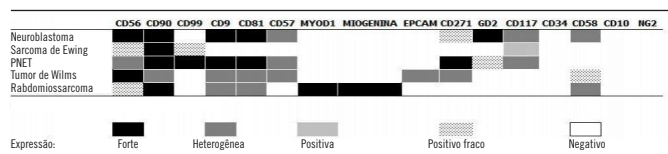


FIGURA 2 – Marcadores imunofenotípicos

PNET: tumores neuroectodérmicos primitivos.

no contexto familiar, além da tomada de decisão terapêutica<sup>(5,6)</sup>. Nesse sentido, a imunofenotipagem por CF tem se mostrado uma ferramenta útil como método diagnóstico para avaliação da disseminação de células tumorais na MO e em fluidos corporais e para o acompanhamento da avaliação de resposta ao tratamento por meio da pesquisa de DRM de diversos tumores pediátricos<sup>(29,51)</sup>.

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.* (2014)<sup>(74)</sup>, a CF parecer ter mais sensibilidade na detecção de células tumorais circulantes.

## CONCLUSÃO

---

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

## REFERÊNCIAS

---

1. Gavhane Y, Shete A, Bhagat A, 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 KES. Apresentação clínica dos tumores sólidos mais comuns na infância e adolescência. *Rev Med Minas Gerais.* 2008; 18(4): 27-33.
5. Bouzas LF, Calazans M. Tumores sólidos e hematológicos na infância e na adolescência – Parte I. *Adolescência & Saúde.* 2007; 4(1): 40-4.
6. Van Arendonk KJ, 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 Med Lab.* 2010; 46(1): 55-9.
8. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editores. *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, 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, 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, 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 NY Acad Sci.* 2015; 1335(1): 23-31.
22. Brodeur GM, Castleberry RP. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editores. *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, editores. *Principles and practice of pediatric oncology.* 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 895-937.

24. Newman EA, Abdessalam S, Aldrink JH, et al. Update on neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 2019; 54(3): 383-9.
25. Devoto M, Specchia C, Laudenslager M, 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, 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, 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: 227-30.
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, 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 JV, 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, 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: 231-35.
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: 772-80.
38. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, 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, 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, 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, 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. Kaneko 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, 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, 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, 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 Jr FDC, Pinna FDR, Voegels RL. Tumor neuroectodérmico de seios paranasais: diagnóstico e tratamento. *Rev Med.* 2012; 91(3): 219.
54. Kadri PAS, Mello PMP, Olivera JG, Braga FM. Sarcoma de Ewing epidural lombar primário: relato de caso. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002; 60(1): 145-9.
55. Catalan J, Fonte AC, Lusa JRB, Oliveira AD, Melo ES, 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, Matthey 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 HV, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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.

#### AUTOR CORRESPONDENTE

Gislaine Furlanetto  0000-0003-4911-8942  
e-mail: gislainefurlanetto@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.