CLAUDIO CARNEIRO BORBA

**Fatores que influenciaram nos resultados das coletas
de células progenitoras hematopoéticas em crianças
portadoras de neuroblastoma avançado**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lilian Maria Cristófani

**SÃO PAULO
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Borba, Claudio Carneiro

Fatores que influenciaram nos resultados das coletas de células progenitoras
hematopoéticas em crianças portadoras de neuroblastoma avançado / Claudio Carneiro
Borba. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientadora: Lilian Maria Cristófani.

Descritores: 1.Neuroblastoma 2.Fator estimulador de colônias de granulócitos
3.Mobilização de células-tronco hematopoéticas 4.Células-tronco/transplante
5.Células-tronco hematopoéticas 6.Criança 7.3-iodobenzilguanidina

USP/FM/DBD-040/16

À Lilian, minha esposa, companheira maravilhosa, grande incentivadora da minha evolução profissional e pessoal. Combustível essencial para o desenvolvimento deste trabalho, respeitando e entendendo as madrugadas à frente do computador. Eu te dedico esta e todas as conquistas.

Ao meu filho João Pedro, um sorriso e o dia melhora. Inimaginável o amor que sinto, chegou a pouco e já faz toda a diferença.

Aos meus pais Vera e Claudio. Meus dois maiores ídolos. Médicos dotados de grande humanidade e sabedoria. Meus exemplos de dedicação, companheirismo, e disposição. Sempre atenciosos e presentes. Meu pai o “técnico”, minha mãe a “psicóloga do time”, dupla mais que perfeita para minha vida. Sou imensamente agradecido por tudo.

À minha irmã Roberta, com o dom do ensinar, sempre disposta a ajudar seus alunos, contribui de maneira exemplar na formação de melhores cidadãos. Um exemplo de dedicação.

In memoriam:

Ao meu avô Claudio, exemplo de que a determinação e o esforço trazem bons resultados; à minha avó Amayr, bondosa e dedicada à família; ao meu avô Célio, médico visionário e a frente do seu tempo; e a minha avó Martha, minha protetora, com amor incondicional e imensurável me ensinou a acreditar.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Lílian Maria Cristófani, profissional extraordinária, agradeço a oportunidade, a paciência o carinho e dedicação durante a orientação deste estudo. Minha admiração cresce a cada dia.

Ao Professor Dr. Vicente Odone Filho, professor e médico brilhante, com o dom de cuidar é exemplo de como a medicina deve ser exercida. Sou muito grato pelo acolhimento e pela oportunidade de aprendizado constante.

Ao Dr. José Roberto Luzzi, principal responsável pelo meu interesse em hemoterapia. Mais que um professor, aos moldes dos verdadeiros e antigos mestres, seus ensinamentos e seu carinho fraterno superam o campo da medicina e muito contribuem na minha formação pessoal.

Ao Professor Dr. Israel Bendit, amigo sempre muito atencioso e com contribuições inestimáveis ao meu trabalho e a minha carreira como médico. Realizador da estatística desse estudo. Serei sempre grato.

Ao Dr. André Albieiro, médico hemoterapeuta responsável pela maioria dos procedimentos aqui estudados, agradeço pela atenção, pela confiança e disposição em ajudar.

À Dra. Maria Tereza Assis de Almeida, médica de extrema competência e cultura, agradeço a atenção e os ensinamentos que frequentemente me enriquecem.

À Dra. Ana Lucia Cornachionne, agradeço a oportunidade, orientações e incentivo para realização desta dissertação.

Ao Dr. Roberto Augusto Plaza Teixeira, exemplo de profissional, que durante meu internato, me recebeu em seu consultório e contribuiu para aumentar meu interesse nos cuidados da criança com câncer.

Ao Professor Dr. Paulo T. Maluf Jr., modelo de sucesso acadêmico e profissional, meu respeito e admiração.

Aos colegas assistentes do SOH-ICr-HCFMUSP, Juliana Folloni, Alessandra Azambuja, Alessandra Gomes, Camila França, Carolina Vince, Arianne Casarim, Melina Brumatti, Priscilla Lubraico, Angela Venancio, Luiz Fernando Mantovani, Gabriele Zamperlini, Gustavo Zamperlini, Catya Munhoz, Carla Breviglieri, Nathalia Halley, Ana Beatriz Mafra, Karen Minami, Georgione Leite e Silvana Forsait, profissionais de imensa capacidade com quem tenho tido a honra de conviver.

À Dra. Marlene Garanito e ao Dr. Jorge Carneiro, muito atenciosos contribuem muito para enriquecer meus conhecimentos na especialidade.

À Kátia Regina de Oliveira, Supervisora do SOH-ICr-HCFMUSP, que mantém o funcionamento da instituição de maneira exemplar e eficiente.

À Ana Biatriz Dontel e Darcio Rodriguês de Araujo, responsáveis pelo SAME, exemplos de dedicação e organização, sem eles este estudo não seria possível.

À Dona Olga Sunakozawa e à Débora Rodrigues, representando todas as enfermeiras e auxiliares do SOH-ICr, exemplos de dedicação e amor aos pacientes com câncer.

À minha família, meu filho João Pedro, minha esposa Lilian, minha mãe Vera, meu pai Claudio, minha irmã Roberta, meus tios, meus primos, meus sogros, meus cunhados e aos meus sobrinhos, meu alicerce, grandes incentivadores da minha profissão.

Aos nossos pequenos pacientes e seus familiares que, com sua luta e coragem nos ensinam a cada dia os reais valores da vida.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de quadros

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Justificativa	16
1.2 Hipótese	17
2 OBJETIVOS.....	18
3 MÉTODOS	20
3.1 Critérios de Inclusão	21
3.2 Critérios de Exclusão	21
3.3 Tratamento Progresso	22
3.4 Avaliação de Doença em Medula Óssea.....	22
3.5 Mobilização de CPH	23
3.6 Análise do Número de CPH no Sangue Periférico	23
3.7 Coleta das CPH no Sangue Periférico	25
3.8 Critério de Sucesso na Coleta de Células Hematopoéticas	27
3.9 Criopreservação das CPH Coletadas	28
3.10 Infusão das CPH	28
3.11 Recuperação Hematológica	31
3.12 Análise de Dados	31
4 RESULTADOS	33
4.1 Características dos Pacientes	34
4.2 Variáveis Pré-Regime de Mobilização	35
4.3 Regime de Mobilização	36
4.4 Resposta à Mobilização	37
4.5 Coleta de Células Progenitoras	40
4.6 Infusão de Células Progenitoras.....	42
4.7 Recuperação Hematológica	42
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES.....	56
7 ANEXOS.....	58
8 REFERÊNCIAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹³¹ I-MIBG	- 131-I-Metaiodobenzilguanidina
ANOVA	- Análise de variância
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CPH	- Células progenitoras hematopoéticas
CSFG	- Fator estimulador de colônias de granulócitos
CTH	- Célula-tronco hematopoética
DMSO	- Agente crioprotetor dimethylsulfoxido
DP	- Desvio-padrão
FDA	- <i>Food and Drug Adminsitration</i>
GM-CSF	- Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HVA	- Ácido homovanílico
INRG	- <i>International Neuroblastoma Risk Group</i>
MIBG	- Metaiodobenzilguanidina
n	- Número de observações válidas
NET	- Transportador de norepinefrina
SOH-ICr-HC-FMUSP	- Serviço de Oncologia e Hematologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
VIP	- Peptídeo intestinal vasoativo
VMA	- Ácido vanilmandélico

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistema Internacional de Estadiamento dos Neuroblastomas.....	8
Quadro 2 - Sistema de Estadiamento dos Neuroblastomas ao diagnóstico	8
Quadro 3 - Tabela da International Neuroblastoma Risk Group - Sobrevida livre de eventos conforme grupo de risco, análise ilustrativa de 8800 pacientes	9
Quadro 4 - Resumo dos resultados individuais dos pacientes incluídos no estudo	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Citometro de fluxo utilizado para determinar a quantidade de CTH CD34+/mm ³	24
Figura 2 - Coleta de CTH na enfermaria do SOH-ICr-HCFMUSP	24
Figura 3 - Equipamento de aférese Cobe [®] Spectra [™] (Terumo BCT) utilizado nas coletas de CTH	25
Figura 4 - Separação dos hemocomponentes segundo sua densidade. Imagem fornecida por Terumo BCT	26
Figura 5 - Ilustração do interior da centrifuga do equipamento de aférese, mostra a separação dos hemocomponentes. Imagem fornecida por Terumo BCT	26
Figura 6 - Bolsa contendo o produto coletado por aférese.....	27
Figura 7 - Maleta térmica exclusiva para transporte de células-tronco criopreservadas.....	29
Figura 8 - Cassete de armazenamento e bolsa com as CTH criopreservadas, antes do descongelamento.....	30
Figura 9 - Equipamento de descongelamento com controle de temperatura em banho-maria.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização demográfica e clínica da população da população estudada.....	34
Tabela 2 - Protocolos quimioterápicos utilizados na população do estudo	35
Tabela 3 - Distribuição da quantidade de pacientes em relação aos quartis das doses de G-CSF	36
Tabela 4 - Distribuição por quartis da quantidade de células CD34+ no sangue periférico (pico) encontradas no presente estudo	37
Tabela 5 - Distribuição da quantidade de pacientes em relação aos quartis do tempo entre o diagnóstico e o início da mobilização.....	38
Tabela 6 - Comparação do uso do ^{131}I -MIBG terapêutico e da quantidade de células CD34+/ μL no sangue periférico.....	40
Tabela 7 - Total de células CD34+ coletadas conforme uso prévio de ^{131}I -MIBG.....	41
Tabela 8 - Número de mobilizações necessárias para obtenção do número adequado de células, conforme uso prévio de ^{131}I -MIBG	41
Tabela 9 - Coleta de células CD34+ em função da contagem destas no sangue periférico.....	42

RESUMO

Borba CC. *Fatores que influenciaram nos resultados das coletas de células progenitoras hematopoéticas em crianças portadoras de neuroblastoma avançado* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Objetivos: Avaliar os resultados das coletas de células hematopoéticas CD34+, por aférese, em crianças portadoras de neuroblastoma tratadas no Serviço de Oncologia e Hematologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; estudar os fatores (idade, peso, estimulação com quimioterapia, dose do G-CSF, uso terapêutico de ^{131}I -MIBG e tempo entre exposição à quimioterapia prévia) que influenciaram na mobilização e no rendimento da coleta de células CD34+ no sangue periférico e associar a quantidade de células CD34+ obtidas com a evolução clínica do paciente. **Métodos:** Trata-se de um estudo retrospectivo de pacientes com neuroblastoma submetidos à coleta de células-tronco hematopoéticas entre janeiro de 1989 e junho 2012. **Resultados:** Avaliados 45 prontuários de crianças com idade mediana de 3,1 anos (0-12 anos), 26 (57%) apresentavam metástase em medula óssea ao diagnóstico. O tempo entre diagnóstico e o início da mobilização foi em média $19,7 \pm 12$ meses (mediana de 15,8 meses). Dos pacientes estudados, 11/45 (24,4%) receberam ^{131}I -MIBG terapêutico antes da mobilização. Somente cinco pacientes (11,1%) receberam quimioterapia associada ao G-CSF para mobilização; as demais 40 crianças (88,9%) receberam exclusivamente G-CSF na dose média $26,5 \pm 5,3$ $\mu\text{g/kg/dia}$ (mediana 28 $\mu\text{g/kg/dia}$). Não houve correlação entre o número máximo de células CD34+ no sangue periférico com a idade ($p=0,9$), com o peso ($p=0,63$), com a dose do G-CSF ($p=0,46$) ou com o intervalo entre o diagnóstico e o início da mobilização ($p=0,09$). A mediana da quantificação de células CD34+/ μL no

sangue periférico foi de 36,6 células, média de $45,2 \pm 42,6$ (mínimo 1,7 e máximo 236,3). Pacientes que haviam recebido ^{131}I -MIBG previamente à mobilização apresentaram menor número de células $\text{CD34}^+/\mu\text{L}$ no sangue periférico ($p=0,04$). Em 26 pacientes (57,8%) foi possível coletar mais de $2,0 \times 10^6$ células $\text{CD34}^+/\text{Kg}$ na primeira coleta e em 19 pacientes (42,2%) foram necessárias mais de uma coleta, sendo que, oito pacientes (17,8%) apresentaram falha de mobilização. Os pacientes que apresentaram menor quantidade de células $\text{CD34}^+/\mu\text{L}$ no sangue periférico (≤ 12) não conseguiram número maior ou igual a $2,0 \times 10^6$ células $\text{CD34}^+/\text{Kg}$ em 81,8% das coletas. O número mediano de células infundidas foi de $2,66 \times 10^6$ células $\text{CD34}^+/\text{Kg}$ (média $3,38 \pm 1,6$; mínimo 1,8; máximo $8,74 \times 10^6$ células $\text{CD34}^+/\text{Kg}$). Os pacientes apresentaram contagem de leucócitos maior que $1000/\text{mm}^3$ e de plaquetas maior $50000/\text{mm}^3$ por dois dias consecutivos em média, no dia 13 ± 10 e no dia 46 ± 33 , respectivamente, após infusão.

Conclusões: A coleta de células-tronco hematopoéticas por aférese foi factível em todos os pacientes do estudo. Não houve influência significativa da idade, do peso, da dose do G-CSF e do tempo entre diagnóstico e início da mobilização, no número máximo de células. O uso prévio à coleta de ^{131}I -MIBG terapêutico parece influenciar negativamente no pico de células CD34^+ no sangue periférico ($p=0,04$). A contagem de células CD34^+ no sangue periférico é importante fator preditivo do resultado das coletas de células progenitoras hematopoéticas CD34^+ por aférese.

Descritores: Neuroblastoma. Fator estimulador de colônias de granulócitos. Mobilização de células-tronco hematopoéticas. Células-tronco. Células-tronco hematopoéticas. Criança. 3-iodobenzilguanidina.

ABSTRACT

Borba CC. *Factors influencing results of peripheral hematologic progenitor cells harvesting in children with advanced Neuroblastoma* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Objectives: To evaluate the results of peripheral hematopoietic CD34+ stem cells harvesting in children with neuroblastoma treated at Serviço de Oncologia e Hematologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; regarding age, weight, stimulation with chemotherapy, G-CSF dose, time between diagnosis and the mobilization beginning and therapeutic ^{131}I -MIBG use and the influence in mobilization and peripheral harvesting of autologous hematopoietic stem cells and to associate the amount of CD34+ cells obtained with the patient's clinical evolution. **Methods:** Between January 1989 and June 2012, children with neuroblastoma underwent to mobilization and peripheral hematopoietic stem cell harvesting and were retrospectively analyzed. **Results:** The charts of 45 children were reviewed. Median age was 3.1 years (0-12years), and 26 (57%) had metastases in bone marrow at diagnosis. Average time between diagnosis and mobilization was 19.7 ± 12 months (median, 15.8 months). 11/45 (24.4%) received therapeutic ^{131}I -MIBG prior to mobilization. The average G-CSF dose was $26.5 \pm 5.3\text{mg/kg/day}$ (mean 28mg/kg/day). There was no correlation between the absolute number of peripheral CD34+ cells and age ($p=0.9$), weight ($p=0.63$), G-CSF dose ($p=0.46$) or the range between diagnosis and early mobilization ($p=0.09$). The median quantification of CD34+ cells/uL in peripheral blood was 36.6, average 45.2 ± 42.6 (minimum 1.7 and maximum 236.3 CD34+ cells/uL). Patients who had received therapeutic ^{131}I -MIBG prior to mobilization, showed fewer absolute amount of CD34+/uL cells in peripheral blood ($p=0.04$). In 26 patients (57.8%) it was possible to harvest more than 2.0×10^6

CD34+ cells/kg at first apheresis and in 19 patients (42.2%) more than one collection were necessary, and eight patients (17.8 %) failure to mobilize. Patients presenting less than 12 CD34+ cells/uL in peripheral blood on the harvesting day failed to reach more than 2.0×10^6 cells CD34+/kg in 81.8% of the apheresis procedures. It was infused a median number of 2.66×10^6 CD34+ cells/kg (mean 1.6 ± 3.38 ; min 1.8; max 8.74×10^6 CD34+ cells/kg). After the stem cells infusion, patients had white blood cells count greater than $1000/\text{mm}^3$ and platelet greater than $50,000/\text{mm}^3$ for two consecutive days on average after 13 ± 10 and 46 ± 33 days, respectively. **Conclusions:** The hematopoietic stem cells harvesting was feasible in all patients included in this report. The G-CSF dose, age, weight and the period between harvesting and diagnosis showed no influence in mobilization and harvesting of autologous hematopoietic stem cells, however the absolute number of peripheral blood CD34+ cells/ μL is an important predictive factor for the harvesting outcome. Additionally our findings support for the first time the notion that the use of therapeutic ^{131}I -MIBG could have a negative impact in mobilization of peripheral blood stem cells in children with neuroblastoma.

Descriptors: Neuroblastoma. Granulocyte colony-stimulating factor. Hematopoietic stem-cells mobilization. Stem-cells. Child. 3-iodobenzylguanidine.

1 INTRODUÇÃO

A sobrevida global das crianças portadoras de tumores sólidos vem gradativamente aumentando desde a década de cinquenta, passando de zero para aproximadamente 80% nos dias atuais. Entretanto, alguns tumores, como o neuroblastoma, ainda não atingiram esta margem de sucesso, com expectativa de vida em cinco anos menor que 50% para pacientes com doença metastática (Finkelstein, 1987; Odone-Filho, 1992; Evans *et al.*, 1992, Cohn *et al.*, 2009), e de 20% em pacientes que recidivam durante o tratamento (London *et al.*, 2011).

O neuroblastoma é o tumor sólido extracraniano mais comum da infância, representando 7% de todas as neoplasias malignas nesta faixa etária. A incidência é de 10,2 casos por milhão de crianças abaixo de 15 anos e a idade média ao diagnóstico é de 17 meses, com discreta predominância no sexo masculino (1,15: 1,0) (Maris *et al.*, 2007; Maris, 2010).

É um tumor que deriva das células nervosas primitivas da crista neural, e surge principalmente na medula da adrenal e gânglios simpáticos para-espinais da região cervical, tórax, abdome e pelve. É um dos tumores mais enigmáticos com heterogeneidade biológica e comportamento clínico com padrões contrastantes, pois se apresenta na maioria das vezes como um tumor agressivo e com alto grau de disseminação, e, por outras vezes, apresenta remissão espontânea (Kinnier-Wilson *et al.*, 1974; Carlsen, 1990; Goldsby e Matthay, 2004).

Os casos familiares ou aqueles sugestivos de mutação transmitida, como os neuroblastomas de adrenal bilateral, devem ter pesquisadas as mutações do oncogene ALK ou do PHOX2B (Mossé *et al.*, 2004 e 2008). Nos casos esporádicos, a transformação maligna provavelmente se origina da interação de variantes comuns do DNA com outros fatores. Polimorfismos de FLJ22536 no cromossomo 6p22.3 e BARD1 no cromossomo 2q35 são mais frequentes em crianças com neuroblastoma que na população normal (Maris *et al.*, 2008; Capasso *et al.*, 2009; Bagatell e Cohn, 2016).

Cerca de 30% dos neuroblastomas apresentam alterações cromossômicas correlacionadas ao prognóstico. A amplificação do oncogene MYCN (mais de duas cópias) contribui para o comportamento agressivo das células de neuroblastoma, principalmente quando acima de dez cópias (Brodeur *et al.*, 1984; Schwab, 1990). Alterações em 3p26 e 11q23 podem ser vistas em 19% e 29% dos casos de tumores avançados, respectivamente (Schulte e Eggert, 2015; Bagatell e Cohn, 2016).

A análise do conteúdo de DNA também pode mostrar anormalidades em pacientes com neuroblastoma, as quais têm valor prognóstico. Pacientes com hiperdiploidia, menores de 18 meses e sem amplificação do oncogene MYCN têm bom prognóstico mesmo com doença avançada (Godsby e Matthay, 2004; Look *et al.*, 1991; Maris, 2010; London *et al.*, 2011).

O neuroblastoma caracteriza-se por uma massa sólida, circunscrita, quando o tumor se localiza na adrenal ou no mediastino posterior, ou por várias massas contíguas quando paravertebral. A superfície de corte do tumor varia de cística e hemorrágica, a sólida e com calcificações finas e puntiformes, difusas ou localizadas, de coloração amarelada (necrose) ou

cinza (áreas maduras) ou branca com áreas hemorrágicas (áreas imaturas). O diagnóstico diferencial do neuroblastoma inclui cistos hemorrágicos da adrenal, feocromocitomas e neoplasias do córtex da adrenal (Dehner, 1990).

Microscopicamente, o neuroblastoma é uma das neoplasias de "pequenas células azuis" da infância. O típico neuroblastoma é composto de células pequenas e uniformes, com núcleo denso e hipercromático e citoplasma escasso, que se organizam em circunferências com um centro composto de uma rede de delicadas fibrilas representando processos neuríticos e denominadas rosetas de Homer-Wright. O estroma é composto por células fusiformes com citoplasma delicado, processos citoplasmáticos e pequenos corpos neuronais. Quando há células ganglionares maduras e imaturas e neuroblastos juntos, trata-se de um ganglioneuroblastoma (Shimada *et al.*, 1999).

O neuroblastoma pode ter origem em qualquer parte do sistema nervoso simpático. O local mais frequente de apresentação do tumor primário é o abdome, tanto na loja adrenal (40%), como na cadeia paraespinal (25%) e pelve (5%). Pode ocorrer também no tórax (15%), na região cervical (5%) e em 1,5% dos pacientes, o tumor primário não é detectado ao diagnóstico (Odone-Filho *et al.*, 1989; London *et al.*, 2011).

Geralmente, 50% dos lactentes menores de um ano e em 70% das crianças maiores apresentam doença disseminada ao diagnóstico, com preferência para linfonodos (42%), ossos (69%), medula óssea (78%), fígado (20%), sistema nervoso central (7%), testículos (2%) e pele (2%) (London *et al.*, 2011).

Os sintomas e sinais variam de acordo com o território acometido. O aumento de volume abdominal por crescimento tumoral é um dos principais sintomas, com massas irregulares, dolorosas, e que frequentemente ultrapassam a linha média (Maris *et al.*, 2007). Extensas massas retroperitoneais podem levar à compressão de vasos, causando linfedema de membros inferiores ou, se esta compressão atingir a vasculatura renal, hipertensão arterial. As massas torácicas podem permanecer assintomáticas por longo tempo e serem descobertas por acaso em radiografia, ou podem causar distúrbio respiratório por compressão das vias aéreas, quando seu volume é muito grande ou seu crescimento é muito acelerado (Lonrgan *et al.*, 2002).

A dor óssea por infiltração metastática também bastante frequente, levando a um prejuízo das atividades normais da criança. A infiltração do osso esfenóide e da órbita resulta em proptose e equimose periorbitária (olhos de guaxinim) (Hiorns, 2001; Maris *et al.*, 2007).

Sintomas inespecíficos como febre intermitente, emagrecimento, apatia, e dores generalizadas são frequentes. Sintomas neurológicos são também descritos, como a síndrome de opsomoclonus, uma cerebelite aguda de provável etiologia autoimune, caracterizada por ataxia e movimentos oculares, e que ocorre em 4% dos pacientes (Lonergan *et al.*, 2002; Maris *et al.*, 2007).

O neuroblastoma pode produzir um peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o qual provoca uma diarreia secretora crônica, com consequente hipocalcemia e desidratação (síndrome de Kerner-Morrison) (Kaplan *et al.*, 1980; Maris *et al.*, 2007).

A história e o exame físico cuidadoso geralmente levam a suspeita da doença. Entretanto, a incidência dos sintomas altamente característicos do neuroblastoma é baixa: opsomíoclonus/ataxia (3,9%), diarreia intratável (3,1%), sintomas compressivos (2,6%), síndrome de Horner (2,0%) e hipertensão arterial (0,2%) (Bordeus e Maris, 2010).

A punção aspirativa da medula óssea é obrigatória em pelo menos dois locais diferentes e pode mostrar infiltrado neoplásico com a formação de pseudorosetas. A excreção de catecolaminas - dopamina, norepinefrina e epinefrina - e seus metabólitos - ácido vanilmandélico (VMA) e homovanílico (HVA) na urina, bem como das catecolaminas está aumentada em mais de 95% dos casos, sendo necessário um aumento de pelo menos três desvios-padrões sobre a média por miligrama de creatinina para a idade. Os níveis séricos de desidrogenase láctica, enolase neurônio-específica e de ferritina também podem estar elevados nos casos avançados (Bordeus e Maris, 2010).

A tomografia computadorizada avalia com precisão a extensão das massas, incluindo o envolvimento de sistema nervoso central, torácico e abdominal. A ultrassonografia é útil para a detecção de massas abdominais e calcificações. A ressonância nuclear magnética é útil na avaliação de massas intraespinhais (Hiorns, 2001; McHugh, 2007; Dumba *et al.*, 2015).

O diagnóstico de neuroblastoma é firmado com a presença documentada de infiltrado neoplásico na punção aspirativa de medula óssea ou pela análise anatomopatológica de fragmento de tumor obtido por biópsia ou exérese cirúrgica (Gray e Kohler, 2009; Baker *et al.*, 2010). A análise citogenética de vários fragmentos do material, principalmente do *MYCN* é obrigatória (Gray e Kohler, 2009).

O diagnóstico de neuroblastoma deve estar em mente toda vez que o quadro clínico incluir massa abdominal, dor óssea, anemia, síndrome de compressão da cava superior, caquexia, hipertensão, hepatomegalia e alterações hematológicas.

A maioria dos grupos cooperativos usa sistemas de classificação de risco que combinam fatores clínicos, como idade e estágio do tumor ao diagnóstico, com variáveis biológicas. A idade é considerada uma variável contínua de risco e a maioria dos autores considera o nível de corte de 12 ou 18 meses. O estadiamento da doença baseia-se no Sistema Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma (*International Neuroblastoma Staging System*) que traduz a quantidade de doença e seu comportamento biológico (Quadro 1) (Brodeur *et al.*, 1994; London *et al.*, 2005). O *International Neuroblastoma Risk Group Task Force* elaborou um sistema de classificação a ser aplicado ao diagnóstico, sem a necessidade das informações obtidas na cirurgia (Quadro 2) (Cohn *et al.*, 2009).

Quadro 1 - Sistema Internacional de Estadiamento dos Neuroblastomas (Bordeus *et al.*, 1994)

Estádio	Descrição
Estádio 1	Tumor localizado e restrito ao local de origem; ressecção completa, com ou sem resíduos microscópicos; linfonodos ipsi ou contralaterais negativos; fígado normal
Estádio 2 A	Tumor unilateral parcialmente ressecado; envolvimento de linfonodos aderidos ao tumor positivos e distantes negativos; fígado negativo
Estádio 2 B	Tumor unilateral total ou parcialmente ressecado; linfonodos ipsilaterais não-aderidos positivos; linfonodos contralaterais e fígado negativos
Estádio 3	Tumor ultrapassa a linha média, com ou sem envolvimento de linfonodos regionais; ou tumor unilateral com linfonodos contralaterais positivos; ou tumor mediano com envolvimento ganglionar bilateral; fígado normal
Estádio 4	Metástases a linfonodos distantes, ossos, medula óssea, fígado ou outros órgãos
Estádio 4S	Tumor primário como em 1, 2 ou 2B, em < um ano com metástases hepáticas, de pele e/ou medula óssea (até 10%)

Quadro 2 - Sistema de Estadiamento dos Neuroblastomas ao diagnóstico (Cohn *et al.*, 2009)

Estádio	Descrição
L1	Tumor localizado sem envolvimento de estruturas vitais e confinado a um compartimento corporal
L2	Tumor locorregional com presença de um ou mais fatores de risco por imagem
M	Metástases à distância (exceto MS)
MS	Doença metastática em crianças menores de 18 meses (pele, fígado e/ou medula óssea), <i>MYCN</i> não-amplificado

Quanto à classificação de risco, em seus extremos definidos pela idade e o estágio, não há controvérsias quanto ao risco. Crianças mais velhas e com doença estágio 4 têm alta chance de insucesso terapêutico e óbito. Lactentes com tumor localizado quase sempre são curados, até sem intervenção terapêutica (Goldsby e Matthay, 2004). Para os demais pacientes situados entre estes extremos, a classificação de risco é difícil de ser padronizada. Recentemente, um grande consórcio internacional analisou mais de 8800 crianças portadoras de neuroblastoma quanto às variáveis de risco e chegou-se a uma nova classificação internacional de risco (*International Neuroblastoma Risk Group* [INRG]), que inclui 16 distintas categorias de risco baseados na avaliação de 13 potenciais fatores de risco, que resultaram em quatro grupos de risco, com diferentes perspectivas de sobrevida (Quadro 3) (Cohn *et al.*, 2009).

Quadro 3 - Tabela da International Neuroblastoma Risk Group - Sobrevida livre de eventos conforme grupo de risco, análise ilustrativa de 8800 pacientes (Cohn *et al.*, 2009)

Grupo de risco	% sobrevida livre de eventos em cinco anos	% pacientes
Muito baixo	> 85	28,2
Baixo	> 75 a ≤ 85	26,8
Intermediário	≥ 50 a ≤ 75	9
Alto	< 50	36

Embora o neuroblastoma seja estudado há mais de um século, os resultados terapêuticos seguem desfavoráveis para os pacientes com idade ao diagnóstico acima de um ano e doença avançada. Crianças com doença

localizada podem ser curadas e lactentes com menos de um ano têm melhor sobrevida com abordagens terapêuticas pouco complexas (Brodeur e Maris, 2010).

O tratamento deve ser programado de acordo com os fatores prognósticos, sendo intensivo nas neoplasias agressivas e mais brando naquelas de evolução favorável (Kaneke *et al.*, 2002).

Vários agentes quimioterápicos foram utilizados em pacientes com neuroblastoma, como a ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina, melfalan, imidazol-carboxamida, teniposide, daunorrubicina, cisplatino, ifosfamida, etoposide, carboplatina e topotecan (De Bernardi *et al.*, 2003; Brodeur e Maris, 2010).

Os protocolos quimioterápicos com múltiplas drogas e a combinação de estratégias de tratamento que associem quimioterapia, cirurgia e radioterapia, têm melhorado os resultados dos tratamentos em pacientes pediátricos com tumores sólidos de alto risco, incluindo o neuroblastoma (Grupp *et al.*, 2000; Kaneke *et al.*, 2002; Brodeurs e Maris, 2010). Entretanto, pela baixa perspectiva de cura, pode ser considerado um dos desafios da oncologia pediátrica (Odone-Filho, 1992).

O neuroblastoma, por ser um tumor derivado de células do sistema nervoso simpático, expressa uma proteína transmembrana carreadora de norepinefrina, conhecida como transportador de norepinefrina (NET), em 90% dos pacientes. A Metaiodobenzilguanidina (MIBG) é uma guanidina análoga da norepinefrina que é carregada para dentro das células dos tumores neuroendócrinos que possuem o NET. O MIBG pode ser marcado com um isótopo radioativo ^{123}I odo ou ^{131}I odo para uso clínico no diagnóstico

(^{123}I -MIBG) e tratamento (^{131}I -MIBG) de tumores como o neuroblastoma (Carlin *et al.*, 2003; Dubois *et al.*, 2012).

Em 1985 foi reportada, pela primeira vez, sua utilização para determinar a localização do neuroblastoma e desde então é utilizado para diagnóstico e localização de sítios metastáticos na medula óssea, ossos e outros órgãos (Geatti *et al.*, 1985). Pela sua atividade radioterápica, desde então, o ^{131}I -Metaiodobenzylguanidina (^{131}I -MIBG), em altas doses, se tornou uma importante arma terapêutica na tentativa do controle de doença residual (Treuner *et al.*, 1984; Howman-Giles *et al.*, 2007; Streby *et al.*, 2015). No entanto, existe descrição de toxicidade hematológica após altas doses de ^{131}I -MIBG, com mecanismos ainda não bem definidos (DuBois *et al.*, 2004).

A hipótese de que escalonar as doses de quimioterapia poderia curar mais crianças guiou os pesquisadores para explorar o uso de protocolos mais citotóxicos em regimes de consolidação da remissão de tumores (Cheung e Heller, 1991). Geralmente, estes protocolos com altas doses de quimioterapia (mieloablativos) estão além das doses toleradas pela medula óssea do doente, o que resultaria em aplasia medular. Visando melhorar a tolerância à administração de doses maiores de quimioterapia propôs-se a infusão de células progenitoras hematopoéticas para repovoar a medula óssea e restabelecer a hematopoese, procedimento conhecido como transplante autólogo de medula óssea (Cheung e Heller, 1991).

Diversos estudos demonstram que altas doses de quimioterapia seguida de resgate com células-tronco hematopoéticas têm aumentado a sobrevida livre de eventos quando comparadas com quimioterapia de

manutenção exclusiva em pacientes com neuroblastoma de alto risco (Cheung e Heller, 1991; Cristófani, 1994; Matthay *et al.*, 1999; Berthold *et al.*, 2005).

Para a realização do transplante autólogo de medula óssea é necessária a coleta e o armazenamento de células progenitoras hematopoéticas (CPH) do próprio paciente, não contaminadas por neoplasia, para posterior reinfusão, após administração de altas doses de quimioterapia (Matthay *et al.*, 1999).

Tais CPH eram inicialmente obtidas somente da própria medula óssea livre de neoplasia, através de múltiplas punções nas cristas ilíacas. Com a constatação da presença destas células no sangue periférico através da expressão do antígeno CD34, seu uso foi proposto e progressivamente com a melhora das técnicas de coleta por aférese, se tornou uma opção viável para o resgate após a quimioterapia no transplante autólogo de medula óssea (McCredie *et al.*, 1971; Barr *et al.*, 1975; Lasky *et al.*, 1982).

Em 1989, foram publicados trabalhos pioneiros, descrevendo a coleta de células progenitoras hematopoéticas do sangue periférico e posteriormente a utilização como resgate, após altas doses de quimioterapia em crianças portadoras de neuroblastoma e leucemia (Lasky *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1989).

Em condições fisiológicas a quantidade de CPH circulantes no sangue periférico é muito baixa, inferior a 0,05% (Arslan e Moog, 2007), quando comparada à medula óssea que possui 1,1% (Körbling e Anderlini, 2001).

A técnica para o aumento do número de CPH circulantes no sangue periférico recebe o nome de mobilização e pode ser realizada com uso isolado de hemopoetinas como o fator estimulador de colônias de

granulócitos e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (G-CSF e GM-CSF, respectivamente) ou pode ser feita com o uso de droga quimioterápica seguida dos fatores de crescimento (Socinski *et al.*, 1988; Duhrsen *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 2006). Atualmente, o G-CSF é a hemopoetina de escolha para as mobilizações por apresentar melhores resultados (Lane *et al.*, 1995).

Em 2008 a agência regulatória americana (*Food and Drug Administration* - [FDA]) aprovou o uso do Plerixafor (AMD3100) para mobilização de pacientes com linfoma não Hodgkin e mieloma múltiplo (Stewart *et al.*, 2009; Körbling e Freireich, 2011). O Plerixafor inibe a ligação do fator derivado da célula estromal (SDF-1) com seu receptor (CXCR4) (Donzella *et al.*, 1998) liberando as células-tronco CD34+ da medula óssea para circulação periférica, possibilitando a coleta (Liles *et al.*, 2003). Apesar dos poucos dados sobre a farmacodinâmica e farmacocinética em crianças alguns estudos demonstraram a eficácia do Plerixafor como segunda opção de mobilização após falha da primeira tentativa com agentes convencionais (Toledano *et al.*, 2010; Aabideen *et al.*, 2011; Modak *et al.*, 2012). Em estudo recente foi demonstrada a segurança e a baixa toxicidade em pacientes pediátricos com neuroblastoma (Goosken *et al.*, 2012) e outros tumores sólidos que falharam à mobilização com G-CSF, com descrição de até 93% de sucesso nas coletas de CTH (Maschan *et al.*, 2015).

A mobilização ideal deve ser a que propicia, por meio do aumento do número de células-tronco hematopoéticas circulantes no sangue periférico, a possibilidade de coleta destas células sem alterar o tratamento do doente.

A mobilização e coleta das células progenitoras hematopoiéticas é parte integrante dos protocolos de transplante autólogo de medula óssea em pediatria e, atualmente, a coleta por aférese a partir do sangue periférico tem sido a mais frequente fonte destas células (Diaz *et al.*, 2000). Pela maior facilidade em obtenção, menor contaminação tumoral e bacteriana do produto coletado, reconstituição hematológica e imunológica do paciente mais rápida, conforto e segurança, evitando-se a necessidade de exposição à anestesia, a coleta por aférese vem substituindo quase totalmente a coleta de medula óssea de crista ilíaca nos transplantes autólogos e, parcialmente, nos transplantes alogênicos (Marson *et al.*, 1998; Grupp *et al.*, 2000; Diaz *et al.*, 2000; George *et al.*, 2006; Fish e Grupp, 2008).

Kanold *et al.*, em 1994, conduziram um ensaio clínico comparando a efetividade da mobilização com quimioterapia associada a G-CSF ou a GM-CSF e somente utilizando G-CSF e não encontraram diferenças significativas no número de células coletadas. Entretanto, Watanabe *et al.* (2006), descrevem que a recuperação plaquetária após a infusão foi mais lenta nos pacientes mobilizados exclusivamente com G-CSF, apesar de descrever vantagens como a determinação do dia da coleta com mais precisão, a não ocorrência de neutropenia febril e menor necessidade transfusional.

A célula-tronco hematopoética (CTH) é caracterizada principalmente por duas atribuições, ter grande potencial proliferativo com capacidade de renovação e ser capaz de reconstituir a população hematopoética. A principal maneira de identificar as células progenitoras hematopoéticas é pela expressão do antígeno CD34+. O uso e eficácia das células CD34+ do sangue periférico para reconstituição da hematopoese após altas doses de

quimioterapia já foi demonstrado por diversos autores (Civin *et al.*, 1984; Berenson *et al.*, 1991) e atualmente, a contagem de células CD34+ circulantes no sangue periférico nos serve de guia para determinar o momento adequado para início da coleta por aférese e pode também ser considerado fator preditivo para o resultado da mobilização e estabelecer quais pacientes serão bons ou maus mobilizadores (Diaz *et al.*, 1999).

Após a quimioterapia, o período em que o paciente permanece pancitopênico e especialmente o tempo que permanece neutropênico é de grande importância por ser o momento de maior risco de infecções e sangramentos. Este tempo, está intimamente ligado à quantidade de células CD34+ infundidas (Diaz *et al.*, 1996) e tem duração mediana de 12 dias (nove a 40 dias) para enxertia neutrofílica (mais de 500 neutrófilos/mm³ ao hemograma) e 35 dias (zero a 54 dias) para contagem maior que 50000 plaquetas/mm³ (Kanold *et al.*, 1998).

A quantidade ideal de células CD34 positivas que devem ser infundidas em crianças, como resgate após altas doses de quimioterapia, ainda é bastante discutida e varia de 2×10^6 /kg até 8×10^6 /kg (Siena *et al.*, 2000). Alguns estudos mostram que a infusão de 5×10^6 /kg de células CD34+ proporciona recuperação neutrofílica e plaquetária mais precoce quando comparada a infusão de 2×10^6 CTH/kg, diminuindo a necessidade de transfusões, os riscos infecciosos relacionados à neutropenia e os dias de internação. A quantidade de 1×10^6 /kg de células CD34+ é considerada boa para recuperação de neutrófilos, porém, insuficiente para recuperação plaquetária, sendo então estabelecida a quantidade mínima de 2×10^6 /kg de células CD34+ em crianças (Diaz *et al.*, 2000).

Para obtenção de mais de 2×10^6 células CD34+/kg propõe-se que se inicie a coleta quando número de células CD34+ no sangue periférico exceda 20 células/ μ L (Armitage *et al.*, 1997). Em estudo com 162 coletas em adultos, quando existia menos de oito células CD34+/ μ L no sangue periférico, não foi coletado 2×10^6 células CD34+/kg em nenhum paciente (Moncada *et al.*, 2003).

Em resumo, a determinação do melhor momento para iniciar a coleta e a obtenção do número adequado de células CD34+ é importante para minimizar o número de procedimentos realizados em cada paciente e desta forma reduzir os custos humanos e materiais do tratamento.

1.1 Justificativa

A equipe de Oncologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas foi a pioneira na implantação dos processos e procedimentos de transplante autólogo de medula óssea no Brasil, quando em 1987 realizou o primeiro transplante autólogo em uma criança com Sarcoma de Ewing em segunda remissão clínica utilizando a medula óssea como fonte de células CD34+ em outra instituição. No Serviço de Oncologia e Hematologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SOH-ICr-HC-FMUSP) o primeiro transplante foi realizado em 1989 (Odone-Filho, 1996). A partir desta data muitos pacientes foram transplantados e a necessidade de padronização dos métodos de coleta de CTH justifica o presente estudo.

1.2 Hipótese

O número de células progenitoras hematopoéticas CD34+ obtidas na coleta por aférese tem influência nos resultados imediatos do transplante autólogo de medula óssea em crianças portadoras de neuroblastoma avançado.

2 OBJETIVOS

a) Avaliar os resultados das coletas de células progenitoras da hematopoese, CD34+, por aférese, em crianças portadoras de neuroblastoma tratadas no Serviço de Oncologia e Hematologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

b) Estudar os fatores (idade e peso do paciente, estimulação com agentes quimioterápicos, dose do G-CSF, tempo entre exposição à quimioterapia prévia e uso terapêutico de ^{131}I -MIBG) que influenciaram no número de células CD34+ no sangue periférico no dia da coleta (mobilização) e no rendimento da coleta das células-tronco hematopoéticas CD34+ nesses pacientes.

c) Associar a quantidade de células CD34+ obtidas com a evolução clínica do paciente (pega do enxerto).

3 MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo por análise de prontuários de uma coorte de pacientes, matriculados no SOH-ICr-HC-FMUSP, no período de 1989 a 2012, com diagnóstico de neuroblastoma estágio 3 e 4, submetidos à coleta de células-tronco hematopoéticas. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) com número 1019 em setembro de 2011. Por se tratar de estudo retrospectivo por análise de prontuários e seguindo orientação da CAPPesq, não houve necessidade de termo de consentimento livre e esclarecido.

3.1 Critérios de Inclusão

Pacientes entre zero e 18 anos de idade, portadores de neuroblastoma estágio 3 e 4, inexistência de doença documentada em medula óssea, que posteriormente foram submetidos à coleta de CPH do sangue periférico por aférese no SOH-ICr-HC-FMUSP e ao transplante autólogo de medula óssea.

3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os pacientes submetidos à coleta de células-tronco de medula óssea e os pacientes submetidos à coleta de células em outros serviços e transplantados na Instituição.

3.3 Tratamento Pgresso

Os pacientes incluídos na análise foram submetidos ao protocolo brasileiro de tratamento de neuroblastoma avançado nas versões Neuro-92, Neuro-97 e Neuro-2000 contendo as drogas: vincristina, ciclofosfamida, topotecano, adriamicina, carboplatina, etoposide, ifosfamida e ^{131}I -MIBG terapêutico antes do início da mobilização. O ^{131}I -MIBG terapêutico foi introduzido sistematicamente a partir do ano 2000 (Anexos A, B e C).

3.4 Avaliação de Doença em Medula Óssea

O neuroblastoma é um tumor que infiltra a medula óssea de maneira focal, sendo necessários múltiplos pontos de avaliação para excluir ou minimizar a chance de se coletar células-tronco de pacientes com doença residual medular. Em centro cirúrgico, sob sedação e analgesia foram realizadas, em até duas semanas antes do início da mobilização, nove punções aspirativas (duas em cada crista ilíaca, direita e esquerda, anterior e posterior, e uma no esterno) e duas biópsias de medula óssea (uma em cada crista ilíaca posterior). Somente os pacientes com medula livre de doença iniciaram a mobilização. A análise imunohistoquímica foi realizada em todos os casos, o que aumenta a segurança na confirmação de ausência de tumor na medula óssea.

3.5 Mobilização de CPH

A mobilização foi realizada com administração intravenosa de ciclofosfamida na dose de 1 g/m^2 associada ao G-CSF ou apenas com G-CSF.

O G-CSF foi administrado por via intravenosa ou subcutânea na dose diária de 9 µg/kg/dia a 36 µg/kg/dia divididas em duas doses iguais a cada 12 horas e se estendeu até o último dia de coleta de células por aférese ou até a que a falha na estimulação fosse determinada. Os pacientes permaneceram internados na Instituição durante o processo de mobilização.

3.6 Análise do Número de CPH no Sangue Periférico

Ao início da mobilização amostras de sangue dos pacientes foram coletadas para realização de hemograma e determinação do número de leucócitos basais do paciente.

Nos dias subsequentes ao início da mobilização, o hemograma foi realizado diariamente e no quinto dia, ou quando a contagem de leucócitos se duplicou, nova amostra de sangue foi coletada e encaminhada para o laboratório de criopreservação celular da Fundação Pró-sangue/Hemocentro de São Paulo para dosagem de células CD34+ no sangue periférico em equipamento de citometria de fluxo (Figura 1) conforme protocolo internacional ISHAGE (Sutherland *et al.*, 1996).

Figura 1 - Citometro de fluxo utilizado para determinar a quantidade de CTH CD34+/mm³

Levando-se em conta o número absoluto de células CD34+ no sangue periférico os pacientes foram submetidos à coleta de CPH por aférese, sob supervisão do médico hemoterapeuta, em enfermaria do SOH ou do ICr (HC-FMUSP) (Figura 2).

Figura 2 - Coleta de CTH na enfermaria do SOH-ICr-HCFMUSP

3.7 Coleta das CPH no Sangue Periférico

Todas as crianças portavam um cateter rígido semi-implantável permanente de dupla via, inserido usualmente na subclávia, para a coleta de células.

As coletas de células por aférese foram realizadas no equipamento de fluxo contínuo Cobe[®] Spectra[™] (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA) (Figura 3). Este equipamento possui um centrifuga que separa as células segundo sua densidade (Figuras 4 e 5). A volemia de cada paciente foi calculada em função de seu peso e altura. Como padrão do serviço, três volemias do paciente eram processadas em cada procedimento de aférese.

Figura 3 - Equipamento de aférese Cobe[®] Spectra[™] (Terumo BCT) utilizado nas coletas de CTH

Figura 4 - Separação dos hemocomponentes segundo sua densidade. Imagem fornecida por Terumo BCT

Figura 5 - Ilustração do interior da centrífuga do equipamento de aférese, mostra a separação dos hemocomponentes. Imagem fornecida por Terumo BCT

Em todos os procedimentos de coleta por aférese foi utilizado o anticoagulante ACD-A (adenina, citrato e dextrose fórmula A) na proporção de 1 mL para cada 15 mL de sangue, para anticoagulação do circuito extracorpóreo. Este circuito extracorpóreo é estéril, descartável e específico para o equipamento de coleta selecionado.

Foram realizadas coletas por aférese diariamente até que se atingisse o objetivo de no mínimo $2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg no produto coletado (Figura 6).

Figura 6 - Bolsa contendo o produto coletado por aférese

3.8 Critério de Sucesso na Coleta de Células Hematopoéticas

Foi definido como critério de sucesso quando um número maior ou igual a $2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg foi obtido na primeira coleta de CTH por aférese.

O insucesso foi definido para os pacientes que necessitaram de mais de uma coleta para atingir $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg ou que nunca atingiram esses valores.

3.9 Criopreservação das CPH Coletadas

O Produto coletado foi encaminhado para o laboratório de criopreservação da Fundação Pró-sangue para quantificar e calcular o número de células CD34+/kg de peso do paciente e para criopreservação.

As CPH do sangue periférico foram criopreservadas utilizando o agente crioprotetor dimethylsulfoxido (DMSO) com concentração final de 10%.

Após adição do DMSO ao produto coletado, iniciou-se a redução gradual de temperatura com taxa controlada de resfriamento no equipamento Cryomed modelo 1010 (Forma Scientific, Marietta, OH, USA). A temperatura do produto foi reduzida em 1 °C por minuto até atingir 40 °C negativos, a partir desta temperatura a redução passou a ser de 10 °C por minuto até a temperatura de 80 °C negativos. Neste momento as células foram transferidas para o freezer de armazenamento com temperatura controlada de 120 °C negativos, onde permaneceram até o momento da infusão.

3.10 Infusão das CPH

Os pacientes permaneceram internados em leitos preparados e adequados para o transplante autólogo com monitoramento clínico e controles laboratoriais diários que incluíam a realização do hemograma. Receberam a infusão de células-tronco hematopoéticas para o transplante autólogo de medula após o término da quimioterapia mieloablativa prevista em seus protocolos, sendo este dia considerado o dia zero do procedimento.

As infusões foram realizadas seguindo protocolo institucional com monitorização cardíaca e respiratória, oximetria e aferição da pressão

arterial não invasiva, iniciada antes do procedimento e mantida por duas horas após o término da infusão de células. As bolsas contendo as células progenitoras foram retiradas da maleta de transporte individualmente e imediatamente descongeladas em banho-maria específico em temperatura de 37°C (Figuras 7, 8 e 9). Após o descongelamento, uma amostra do volume contido em cada bolsa foi encaminhada para cultura e identificação de possíveis agentes contaminantes. As infusões foram realizadas em acesso venoso central por um profissional médico, sem sedação prévia. No dia posterior à infusão iniciou-se G-CSF na dose de 10 µg/kg/dia até a recuperação hematológica.

Figura 7 - Maleta térmica exclusiva para transporte de células-tronco criopreservadas

Figura 8 - Cassete de armazenamento e bolsa com as CTH criopreservadas, antes do descongelamento

Figura 9 - Equipamento de descongelamento com controle de temperatura em banho-maria

3.11 Recuperação Hematológica

A recuperação leucocitária foi considerada quando a criança apresentava contagem de leucócitos maior que $1000/\text{mm}^3$ por dois dias consecutivos e a recuperação plaquetária com contagem de plaquetas superior a $50000/\text{mm}^3$ por dois dias consecutivos, sem que o paciente tenha recebido transfusão de plaquetas. Nosso protocolo para transfusão de plaquetas preconiza a indicação profilática de infusão de concentrado de plaquetas quando a contagem está abaixo de $20000/\text{mm}^3$ ou se existe algum outro fator de risco clínico de sangramento associado.

3.12 Análise de Dados

As análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico SPSS para Windows versão 13.0, os dados resumidos através de estatísticas descritivas adequadas ao tipo de variável. Frequência e porcentagem utilizadas para as variáveis categóricas e número de observações válidas (n), média, mediana, desvio-padrão (DP), valores mínimo e máximo foram apresentados para as variáveis contínuas.

As variáveis categóricas foram: sexo, mobilização com quimioterapia, tratamento prévio com ^{131}I -MIBG terapêutico e infiltração da medula óssea ao diagnóstico.

As variáveis contínuas foram: idade, tempo entre o diagnóstico e o início da mobilização, intervalo entre a última quimioterapia e o início da mobilização, dose do G-CSF, número máximo de células CD34+ no sangue

periférico, número de células CD34+ no produto coletado, quantidade de células infundidas e recuperação hematológica.

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar associação entre variáveis contínuas com variáveis categóricas. Quando as assertivas do modelo ANOVA não foram satisfatórias, foram usados os testes não paramétricos respectivos (Kruskal-Wallis).

Teste qui-quadrado e o teste Exato de Fisher foram utilizados para verificar associação entre duas variáveis categóricas.

Análise de regressão foi utilizada para verificar associação entre duas variáveis numéricas.

O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$). Os testes estatísticos foram bilaterais.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos Pacientes

Foram avaliados 93 prontuários de pacientes portadores de neuroblastoma estágio 3 e 4, que foram submetidos ao transplante autólogo de medula óssea no SOH-ICr-HC-FMUSP de janeiro de 1989 a junho de 2012. Foram excluídos da análise 48 pacientes, sendo 24 por coleta de células-tronco apenas da medula óssea, seis pelo fato das coletas de células terem sido realizadas em outros serviços e 18 por falta de dados nos prontuários. Foram analisados 45 prontuários.

Dos 45 prontuários analisados, 20 eram de crianças do sexo masculino (44,4%) e 25 do sexo feminino (55,6%). A idade média ao diagnóstico foi de $3,7 \pm 2,3$ anos variando de zero a 12 anos com mediana de 3,1 anos. O peso variou de 10,3 a 88 kg (mediana de 17 kg) e 57,7% dos pacientes apresentavam invasão medular ao diagnóstico (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização demográfica e clínica da população da população estudada

Variável	Caracterização	
Idade (anos)	Mediana de 3,1 (0 - 12)	
Peso (kg)	Mediana de 17 (10,3 - 88)	
Sexo	Masculino 20 (44,4%)	Feminino 25 (55,6%)
Presença de medula óssea infiltrada ao diagnóstico	Sim= 26 (57,7%)	Não= 19 (42,3%)

Todos os pacientes incluídos na análise foram tratados conforme os protocolos brasileiros de tratamento de neuroblastoma, em suas várias versões: um paciente (2,2%) seguiu o protocolo Neuro-92, cinco (11,1%) o Neuro-97 e 39 (86,7%) o protocolo Neuro-2000 (Tabela 2).

Tabela 2 - Protocolos quimioterápicos utilizados na população do estudo

Protocolo	Pacientes incluídos n(%)
Neuro-92	1 (2,2%)
Neuro-97	5 (11,1%)
Neuro-2000	39 (86,7%)
Total	45 (100%)

4.2 Variáveis Pré-Regime de Mobilização

Todos os pacientes tiveram avaliação da medula óssea com a realização de mielogramas e biópsia ao diagnóstico da neoplasia, sendo que em 26 (57,7%) deles, havia invasão tumoral e 19 (42,3%) estavam com a medula livre de doença. Antes de iniciar a mobilização, nova avaliação da medula óssea era realizada para assegurar inexistência de doença após o tratamento quimioterápico e sua elegibilidade ao transplante autólogo de medula óssea.

O tempo entre diagnóstico e o início da mobilização foi em média de $19,7 \pm 12$ meses (mediana de 15,8 meses, mínimo de 8,9 e máximo de 85,6 meses). Tal intervalo de tempo é explicado pela dificuldade em eliminar a neoplasia da medula óssea, permitindo a coleta.

O intervalo entre a última dose de quimioterapia do protocolo de tratamento e o início da mobilização teve mediana de 56 dias e média de $87,8 \pm 88,6$ dias (mínimo de sete e máximo de 407 dias).

Dos pacientes deste estudo, 11 (24,4%) receberam ^{131}I -MIBG terapêutico previamente à coleta e 34 (75,6%) não o fizeram.

4.3 Regime de Mobilização

Somente cinco pacientes (11,1%) receberam quimioterapia associada ao G-CSF para mobilização, todas as demais 40 crianças (88,9%) receberam exclusivamente G-CSF em doses que variaram de nove a 36 $\mu\text{g/kg/dia}$ (média $26,5 \pm 5,3$ $\mu\text{g/kg/dia}$ e mediana 28,0 $\mu\text{g/kg/dia}$), divididos em duas doses diárias.

Quando analisada a distribuição dos pacientes em relação aos quartis da dose de G-CSF, 12 pacientes receberam dose menor ou igual a 24 $\mu\text{g/kg/dia}$, 15 receberam dose maior que 24 e menor ou igual 28 $\mu\text{g/kg/dia}$, nove receberam dose maior que 28 e menor ou igual 30 $\mu\text{g/kg/dia}$ e nove pacientes receberam mais de 30 $\mu\text{g/kg/dia}$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição da quantidade de pacientes em relação aos quartis das doses de G-CSF

Dose do G-CSF ($\mu\text{g/kg/dia}$)	Pacientes
≤ 24	12
$> 24 \text{ e } \leq 28$	15
$> 28 \text{ e } \leq 30$	9
> 30	9
Total	45

4.4 Resposta à Mobilização

A mediana da quantificação de células CD34+/ μ L no sangue periférico foi de 36,6 células com média de $45,2 \pm 42,6$ (mínimo 1,7 e máximo 236,3 células).

Analizada a distribuição dos pacientes em relação aos quartis da quantidade de células CD34+ no sangue periférico (pico) encontrados no presente estudo, 11 pacientes apresentaram quantidade de células CD34+ no sangue periférico ≤ 12 ; 13 pacientes >12 e ≤ 35 células, 10 pacientes >35 e ≤ 53 células e 11 > 53 células (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição por quartis da quantidade de células CD34+ no sangue periférico (pico) encontradas no presente estudo

Células CD34+ no sangue periférico	Pacientes
≤ 12	11
> 12 e ≤ 35	13
> 35 e ≤ 53	10
> 53	11
Total	45

Quando avaliamos a influência da idade e do peso no número máximo de células CD34+ no sangue periférico, não houve correlação significativa ($p=0,9$ e $p=0,63$).

A dose do G-CSF não influenciou no pico máximo de células CD34+/ μ L no sangue periférico ($p=0,46$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Análise das doses de G-CSF e o pico de células CD34+/ μ L no sangue periférico (p=0,46)

Nenhum paciente apresentou efeito adverso com intensidade moderada ou grave, isto é, que tenha necessitado suspensão do G-CSF e/ou intervenção médica para alívio dos sintomas.

Foi analisada a quantidade de pacientes em relação aos quartis do tempo entre o diagnóstico e o início da mobilização (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição da quantidade de pacientes em relação aos quartis do tempo entre o diagnóstico e o início da mobilização

Tempo entre o diagnóstico e o início da mobilização	Pacientes
≤ 12 meses	11
> 14 e ≤ 14 meses	12
> 14 e ≤ 21 meses	12
> 21 meses	10
Total	45

Não houve correlação significativa entre o intervalo do diagnóstico da neoplasia e a mobilização com pico de células CD34+ no sangue periférico ($p=0,09$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Análise do pico de células CD34+/ μ L no sangue periférico em relação ao intervalo entre o diagnóstico da neoplasia e o início da mobilização ($p=0,09$)

Os pacientes que haviam recebido ^{131}I -MIBG previamente à mobilização apresentaram menor número de células CD34+/ μ L no sangue periférico ($p=0,048$). Esta tendência também foi mantida quando separados os pacientes por quartis em relação ao pico de células e o uso do ^{131}I -MIBG terapêutico ($p=0,044$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação do uso do ^{131}I -MIBG terapêutico e da quantidade de células CD34+/ μL no sangue periférico

	Células CD34+/ μL no sangue periférico				p = 0,04
	≤ 12	$> 12 \text{ e } \leq 35$	$> 35 \text{ e } \leq 53$	> 53	Total
Não recebeu MIBG	6	11	6	11	34
Recebeu MIBG	5	2	4	0	11
Total	11	13	10	11	45

4.5 Coleta de Células Progenitoras

O número médio de dias entre o início da mobilização e o primeiro dia de coleta foi de 5,3 dias (variou de quatro a 13 dias). As coletas ocorreram no dia ou no dia seguinte à identificação do pico de células CD34+ no sangue periférico.

Foram coletadas em média $2,7 \pm 1,9$ células CD34+/kg (mediana 2,18 células CD34+/ μL) por procedimento.

Em 26 pacientes (57,8%) foi possível coletar mais de $2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg na primeira coleta e em 19 pacientes (42,2%) foram necessárias mais de uma coleta para atingir o objetivo. Entre os pacientes que necessitaram de mais de uma coleta, oito pacientes (17,8%) apresentaram falha de mobilização e precisaram de uma nova mobilização (Tabela 7).

Tabela 7 - Total de células CD34+ coletadas conforme uso prévio de ^{131}I -MIBG

Células CD34+ coletadas/kg	< $2,0 \times 10^6$	$\geq 2,0 \times 10^6$	Total	p
Não recebeu ^{131}I -MIBG	12	22	34	
Recebeu ^{131}I -MIBG	7	4	11	= 0,09
Total	19	26	45	

Não houve diferença significativa entre os pacientes que receberam ou não ^{131}I -MIBG terapêutico e o número de mobilizações necessárias para coleta de pelo menos 2×10^6 células CD34+/kg ($p = 0,08$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Número de mobilizações necessárias para obtenção do número adequado de células, conforme uso prévio de ^{131}I -MIBG

	Uma mobilização	Duas ou mais mobilizações	Total	p
Não recebeu ^{131}I -MIBG	30	4	34	
Recebeu ^{131}I -MIBG	7	4	11	= 0,08
Total	37	8	45	

Os pacientes que apresentaram menor pico de células CD34+/ μL no sangue periférico (≤ 12) não conseguiram número maior ou igual a 2×10^6 células CD34+/Kg em 81,8% das coletas, enquanto com pico de células no sangue periférico maior que 12 o sucesso nas coletas sobe para 46,2%, chegando em 100% de sucesso nos pacientes que apresentaram contagem de CD34+ periférico maior que 53 (Tabela 9).

Tabela 9 - Coleta de células CD34+ em função da contagem destas no sangue periférico

Células CD34+/μL no sangue periférico	Células CD34+ coletadas/kg		Total
	< 2,0 x 10 ⁶	≥ 2,0 x 10 ⁶	
≤ 12	9 (81,8%)	2 (18,2%)	11
> 12 e ≤ 35	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13
> 35 e ≤ 53	3 (30%)	7 (70%)	10
> 53	0	11 (100%)	11

4.6 Infusão de Células Progenitoras

O número mediano de células infundidas foi de 2,66 x10⁶ células CD34+/kg (média 3,38 ±1,6; mínimo 1,8; máximo 8,74 x10⁶ CD34+/kg).

Todas as hemoculturas que foram coletadas das bolsas, com as CTH infundidas, foram negativas.

4.7 Recuperação Hematológica

Os pacientes apresentaram contagem de leucócitos maior que 1000/mm³ e de plaquetas maior 50000/mm³ por dois dias consecutivos em média, no dia 13 ± 10 e no dia 46 ± 33, respectivamente, após infusão.

Três pacientes faleceram por sepse no período de internação para o transplante de medula óssea, todos apresentavam neutropenia com menos de 500 neutrófilos/mm³ e infecção documentada em culturas de sangue.

Um resumo dos resultados individuais dos pacientes incluídos neste estudo está representado na Quadro 4.

Quadro 4 - Resumo dos resultados individuais dos pacientes incluídos no estudo

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg) no dia da coleta	Estádio	Metástase em medula óssea ao diagnóstico	Protocolo de QT utilizado	¹³¹ I-MIBG terapêutico	Número de coletas	Dose do G-CSF µg/kg/dia	Células CD34+/ μ L no sangue periférico no dia da coleta	Células CD34+ coletadas na primeira aférese ($\times 10^6$ /Kg)	Total de células CD34+ coletadas ($\times 10^6$ /Kg)
1	M	2,72	15,70	4	Sim	N 2000	Não	1	19,0	47,5	2,99	2,99
2	F	0,25	13,00	4	Não	N 2000	Não	1	9,0	79,7	6,52	6,52
3	F	2,24	15,10	4	Não	N 2000	Não	1	27,0	14,8	3,78	3,78
4	F	2,17	14,30	4	Sim	N 2000	Não	3	30,0	35,0	0,75	2,40
5	F	2,92	14,10	4	Sim	N 2000	Sim	1	27,0	37,0	2,60	2,60
6	M	2,37	16,30	4	Sim	N 2000	Sim	1	25,0	40,0	1,96	1,96
7	M	3,72	21,00	4	Sim	N 2000	Sim	1	14,0	10,6	3,24	3,24
8	M	7,44	25,50	4	Sim	N 2000	Não	2	30,0	NR	1,38	2,18
9	F	5,45	36,00	4	Não	N 2000	Sim	3	25,0	2,7	0,37	2,21
10	M	1,22	12,60	4	Não	N 2000	Não	1	24,0	22,0	2,05	2,05
11	F	0,72	10,30	4	Não	N 2000	Não	2	29,0	10,6	1,13	4,87
12	F	4,03	16,70	4	Sim	N 2000	Não	2	30,0	13,5	2,55	2,76
13	M	2,04	13,50	4	Não	N 2000	Sim	2	26,0	1,7	0,15	3,28
14	M	3,00	17,00	4	Não	N 2000	Não	1	30,0	63,0	2,13	2,13
15	F	4,57	25,20	4	Não	N 2000	Sim	2	24,0	1,1	1,47	2,81
16	F	2,73	17,80	4	Não	N 2000	Não	2	28,0	10,2	1,94	2,62
17	F	7,20	20,00	4	Sim	N 2000	Não	1	31,0	70,0	5,90	5,90
18	F	5,99	23,80	4	Sim	N 2000	Não	1	26,0	78,9	5,27	5,27
19	M	5,56	24,00	4	Sim	N 97	Não	4	16,0	1,9	0,43	2,55
20	M	3,84	28,20	4	Não	N 2000	Não	1	30,0	79,7	2,00	2,00
21	F	1,61	12,00	4	Sim	N 2000	Sim	2	24,0	21,0	0,57	2,57
22	F	1,78	14,60	4	Não	N 2000	Não	2	30,0	13,2	0,36	2,00
23	M	1,14	14,60	3	Não	N 2000	Não	2	20,0	15,0	0,63	2,41
24	F	8,28	24,50	4	Não	N 2000	Não	4	30,0	2,4	0,26	2,14
25	F	3,53	19,30	4	Não	N 2000	Não	1	31,0	24,7	3,21	3,21
26	F	2,96	14,50	4	Não	N 97	Sim	2	28,0	50,0	1,93	2,43
27	F	4,39	22,20	4	Sim	N 2000	Não	1	28,0	46,5	2,12	2,12
28	F	3,73	18,70	4	Não	N 2000	Não	1	32,0	51,7	2,18	2,18
29	M	0,87	17,20	4	Sim	N 2000	Não	1	17,0	236,3	8,74	8,74

Continua

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg) no dia da coleta	Estádio	Metástase em medula óssea ao diagnóstico	Protocolo de QT utilizado	¹³¹ I-MIBG terapêutico	Número de coletas	Dose do G-CSF µg/kg/dia	Células CD34+ µL no sangue periférico no dia da coleta	Conclusão	
											Células CD34+ coletadas na primeira aférese (x10 ⁹ /Kg)	Total de células CD34+ coletadas (x10 ⁶ /Kg)
30	M	3,33	13,80	4	Sim	N 92	Não	4	22,0	5,0	0,41	2,00
31	M	1,93	13,00	4	Não	N 2000	Não	1	30,0	43,3	3,57	3,57
32	M	4,61	20,10	4	Sim	N 2000	Sim	2	31,0	15,0	0,75	2,00
33	F	3,53	18,90	4	Sim	N 2000	Não	1	32,0	32,3	2,52	2,52
34	F	4,46	17,90	4	Sim	N 2000	Não	1	25,0	36,3	5,10	5,10
35	F	5,95	29,50	4	Sim	N 2000	Não	1	31,0	61,0	4,10	4,10
36	F	0,52	11,50	4	Sim	N 97	Não	1	26,0	82,0	7,60	7,60
37	M	3,02	14,00	4	Sim	N 2000	Não	1	36,0	54,1	4,30	4,30
38	M	11,43	63,50	4	Sim	N 2000	Não	1	28,0	14,7	2,50	2,49
39	F	6,23	25,50	4	Sim	N 97	Não	2	24,0	12,5	1,64	3,12
40	M	9,07	88,00	4	Não	N 97	Não	1	28,0	111,7	4,57	4,57
41	F	2,88	14,70	4	Sim	N 2000	Não	2	34,0	29,9	0,75	3,34
42	M	3,14	19,40	4	Sim	N 2000	Não	1	25,0	36,2	2,66	2,66
43	M	3,62	22,00	4	Sim	N 2000	Não	1	26,0	52,2	4,00	4,00
44	M	2,68	17,30	4	Sim	N 2000	Sim	1	24,0	48,0	7,40	7,40
45	F	1,78	15,20	4	Não	N 2000	Sim	3	32,0	8,1	0,15	1,80

5 DISCUSSÃO

A cura de pacientes com neuroblastoma representa um grande desafio para a oncologia pediátrica e o emprego de altas doses de quimioterapia seguida de resgate com infusão de células-tronco hematopoéticas é importante arma terapêutica no combate a este agressivo tumor (Cristófani, 1994; Maris *et al.*, 2007).

Este estudo possui como diferencial a avaliação da mobilização e coleta de CTH periféricas em crianças, enquanto a maioria das publicações inclui somente pacientes adultos (Körbling e Freireich, 2011). Permite definir de forma mais acurada os fatores que influenciaram na mobilização e coleta, pois, inclui uma população uniforme caracterizada por pacientes com neuroblastoma avançado que foram tratados com drogas semelhantes, enquanto trabalhos publicados anteriormente incluíram crianças com diversos diagnósticos tratadas com múltiplos protocolos (Cecyn *et al.*, 2005; Velikovic *et al.*, 2011). Nossos dados mostram pela primeira vez que o uso terapêutico do ^{131}I -MIBG pode produzir impacto negativo nas coletas de células CD34+ por aférese, embora pouco expressivo.

A dose ideal do G-CSF ainda permanece controversa, alguns autores recomendam dose entre cinco e 15 $\mu\text{g/Kg/dia}$ (Stute *et al.*, 1992), enquanto outros sugerem como ideal a dose de 12 $\mu\text{g/kg/dose}$, duas vezes ao dia (Sevilla *et al.*, 2002; Merlin *et al.*, 2006) ou mais recentemente 15 $\mu\text{g/kg/dose}$,

duas vezes ao dia (Edi *et al.*, 2015). Existem descrições da relação entre a dose e a resposta, referindo que, quanto maior a dose administrada, maior é a concentração de células CD34+ no sangue periférico e consequentemente menos procedimentos por aférese serão necessários para se coletar as CTH (Weaver *et al.*, 1998; Engelhardt *et al.*, 1999; Edi *et al.*, 2015).

Não observamos influência significativa da dose do G-CSF no pico de células, porem somente cinco pacientes receberam menos de 20 µg/kg/dia, mostrando que na maioria das nossas mobilizações utilizamos doses mais altas que as descritas por outros autores. À ausência de influência no resultado das células CD34+ no sangue periférico, pode ser justificada pelo emprego de altas doses do G-CSF em grande parte dos pacientes.

Kröger *et al.* (2002) publicaram um estudo realizado em doadores adultos saudáveis, e mostraram que o grupo que recebeu a dose de 16µg/Kg/dia apresentou melhor mobilização de células CD34+, entretanto, às custas de maior incidência de efeitos colaterais como cefaleia, dor óssea, tromboembolismo, reação anafilactoide e ruptura esplênica. Inesperadamente, apesar de utilizarmos altas doses de G-CSF (média $26,5 \pm 5,3$ µg/kg/dia e mediana 28,0 µg/kg/dia), os pacientes pediátricos incluídos neste estudo não apresentaram tais efeitos adversos.

Em nosso estudo somente cinco pacientes foram mobilizados com quimioterapia seguida de G-CSF, não nos permitindo análise comparativa entre o grupo de pacientes que foram mobilizados com ciclofosfamida e G-CSF e o grupo que recebeu somente G-CSF.

A eleição para utilização exclusiva de G-CSF, preferencialmente, se deve ao fato que, a dose extra de ciclofosfamida para mobilização

significaria quebra no protocolo de tratamento Neuro-2000, atualmente em estudo na Instituição e acrescentaria toxicidade ao procedimento.

O plerixafor foi liberado para uso no Brasil em 2010 e no período que compreendeu este estudo nenhum paciente pediátrico foi mobilizado com este medicamento no ICr-HC-FMUSP. Atualmente, raramente é utilizado em nosso Serviço pelo seu alto custo.

Por ser um tumor agressivo, muitas vezes diagnosticado já em estágio avançado, os protocolos de tratamento do neuroblastoma envolvem múltiplas estratégias terapêuticas que contemplam exposição intensa à quimioterapia (Cheung e Heller, 1991; Cristófani, 1994; Matthay *et al.*, 1999). Os dados encontrados em relação ao período entre diagnóstico e o início da mobilização (mediana de 15,8 meses e média de $19,7 \pm 12$ meses) podem ser atribuímos a necessidade de múltiplos ciclos de quimioterapia para a eliminação de doença mensurável.

Não encontramos diferença significativa nos resultados do pico de células CD34+ no sangue periférico entre os pacientes em que o intervalo entre o diagnóstico e a mobilização foi mais longo ($p=0,09$), contrapondo a literatura atual relacionada, que descreve picos mais baixos nos pacientes tratados com mais ciclos de quimioterapia por esgotamento da reserva medular (Sevilla *et al.*, 2003; Mendrone *et al.*, 2008). Os dados encontrados em nosso estudo se referem a crianças com uma doença agressiva e que muitas vezes invade a medula óssea, este fator nos faz pensar que os pacientes recebem quimioterapia agressiva com impacto semelhante na medula óssea, independentemente do tempo de tratamento.

Em doadores adultos saudáveis foi demonstrado que a idade acima de 55 anos influencia negativamente na mobilização (Zhang *et al.*, 2008; Lysak *et al.*, 2011), entretanto, Mendrone *et al.* (2008) não encontraram influência negativa da idade na mobilização em pacientes adultos com diferentes diagnósticos. Na população pediátrica aqui estudada, a idade não influenciou nos resultados das mobilizações.

A coleta de CTH na população pediátrica envolve cuidados e preocupações em relação à segurança e riscos associados à idade e ao peso destes pacientes (Karakukcu e Unal, 2015), principalmente nas crianças abaixo de 20 kg, onde o volume extracorpóreo (quantidade de sangue dentro do equipamento de coleta) é proporcionalmente maior em relação à sua volemia, quando comparados com adultos (Orbach *et al.*, 2003; Veljkovic *et al.*, 2011). Nossos pacientes apresentavam mediana de peso de 17 kg e a criança com menor peso no momento da coleta possuía 10,3 kg. Assim como a idade, o peso não influenciou no pico de células CD34+ no sangue periférico e foi possível realizar o procedimento sem relatos de efeitos adversos relacionados com hipovolemia e hipoxemia.

O neuroblastoma tipicamente expressa o transportador da norepinefrina que media a entrada do ^{131}I -MIBG na célula e induzindo sua destruição (Carlin *et al.*, 2003; DuBois e Matthay, 2008). A toxicidade mais importante relacionada ao uso deste isótopo radioativo é a medular, descrita como sendo mais expressiva nos pacientes com metástase em medula óssea e em pacientes submetidos à radioterapia prévia (DuBois *et al.*, 2004). Alguns autores relatam necessidade de infusão de CTH após doses do ^{131}I -MIBG, acima de 18 mCi/kg, por toxicidade medular. Atualmente a dose

máxima sugerida é de 12 mCi/kg, sem a necessidade de resgate com infusão de células (Matthay *et al.*, 2006 e 2007).

DuBois *et al.*, 2004, em estudo sobre a toxicidade medular após ^{131}I -MIBG evidenciaram que os pacientes permaneciam neutropênicos com mediana de cinco dias e dependente de transfusões de plaquetas com mediana de 5,4 semanas, demonstrando que a toxicidade do isótopo radioativo ^{131}I -MIBG pode se estender por um período de até 8,7 semanas no tocante as plaquetas. Esta toxicidade foi pior nos pacientes com comprometimento medular quando comparada aos pacientes com medula livre de doença. O mecanismo de mielossupressão ainda não é bem elucidado, mas uma possibilidade é a de lesão das células progenitoras hematopoéticas e do estroma medular adjacente às células tumorais que estão infiltrando a medula (Shapiro e Gross, 1987).

Apesar de relatos anteriores sobre a toxicidade medular do ^{131}I -MIBG (Hutchinson *et al.*, 1992; Sisson *et al.*, 1994; Matthay *et al.*, 2001), Gooskens *et al.* (2012) descrevem a mobilização e coleta de 94 pacientes pediátricos, sendo 24 com diagnóstico de neuroblastoma 4. Destes pacientes, 14 receberam ^{131}I -MIBG e somente dois pacientes apresentaram falha na coleta, ambos haviam recebido ^{131}I -MIBG. O relato não descreve como foi a resposta a mobilização dos pacientes estudados e quais apresentaram número insuficiente de células CD34+ no sangue periférico para contraindicar a coleta de células por aférese nos pacientes que foram estudado.

Até o momento, não há descrição se a toxicidade medular após infusão do ^{131}I -MIBG terapêutico é temporária, se existe realmente lesão do estroma medular, se há diminuição permanente dos precursores celulares

na medula e qual impacto, o uso do ^{131}I -MIBG, poderia ter na mobilização e coleta de CTH.

Nosso trabalho, de forma inédita, mostra impacto negativo na mobilização de CTH em pacientes que receberam o ^{131}I -MIBG antes do início da mobilização, ($p=0,04$), porem com pequena diferença estatística. Talvez, aumentando-se a amostra de pacientes estudados poderíamos reforçar estes dados e confirmar o impacto negativo que o ^{131}I -MIBG terapêutico parece ter nas coletas de CTH. Soma-se, a necessidade de estudos adicionais para investigação e determinação das consequências da toxicidade medular do ^{131}I -MIBG e o desenvolvimento de novas estratégias para aumentar e melhorar o resultado das mobilizações e coletas de células progenitoras hematopoéticas nas crianças portadoras de neuroblastoma avançado expostas a este isótopo radioativo.

Em 17,8% dos nossos pacientes houve falha na primeira mobilização. Este resultado está dentro da faixa de valores encontrados por outros pesquisadores, que apesar da segurança e eficiência dos protocolos de mobilização clássicos, descrevem falha considerável de 10-30% em pacientes adultos (Moncada *et al.*, 2003; Medrone *et al.*, 2008; Damon e Damon, 2009). Até o momento, os dados referentes à porcentagem de falhas de mobilização na população pediátrica não estão disponíveis na literatura.

A determinação da quantidade de células CD34+ no sangue periférico orienta o momento ideal para início da coleta de CTH periféricas. Muitos autores indicam a coleta somente se o número de células CD34+ periféricas for maior que 10/ μL (Trickett *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2007). Outros são mais

restritivos e não iniciam a coleta com menos de 20/ μ L (Dettke *et al.*, 2001; Sarkodee-Adoo *et al.*, 2003).

Em nosso estudo, 11 pacientes, 24,4%, apresentaram quantidade de células CD34+ no sangue periférico menor ou igual a 12/ μ L e foram submetidos à coleta de CTH periféricas. O insucesso de 81,8% das coletas nestes pacientes, menos de $2,0 \times 10^6$ CTH coletadas/kg, demonstra que a quantidade de células CD34+ periféricas é confiável como valor preditivo para o resultado das coletas e deve ser levado em consideração para indicação do início do procedimento de aférese.

Em nosso estudo observamos que com pico de células no sangue periférico maior que 12 o sucesso nas coletas sobe progressivamente para 46,2% até chegar em 100% de sucesso com quantidade de células CD34+ periféricas maior que 53/ μ L.

Basquiera *et al.* (2003) avaliaram pacientes com tumores sólidos ou hematológicos e observaram que o valor mínimo de 16 células CD34+/ μ L no sangue periférico era necessário para se coletar mais de $1,5 \times 10^6$ células CD34+/kg na primeira aférese. Do mesmo modo, em pacientes pediátricos, Diaz *et al.* (1999) demonstraram que, para obter pelo menos $1,0 \times 10^6$ células CD34+/kg em uma única coleta, a quantidade de CTH periféricas deveria ser maior ou igual a 30/ μ L e se o alvo for coletar $5,0 \times 10^6$ células/kg, o CD34 periférico deveria ser maior ou igual a 50/ μ L.

Alguns autores propuseram uma classificação de acordo com o CD34 no sangue periférico antes da coleta, na qual, menos de cinco células CD34/ mm^3 no sangue periférico são definidos como maus mobilizadores absolutos, entre seis e 10 células CD34/ mm^3 , maus mobilizadores relativos e

entre 11 e 19 células, limítrofes. Relatam que sessenta e cinco por cento dos pacientes classificados como maus mobilizadores relativos conseguiram coletar mais do que 2×10^6 células CD34+/kg em uma mediana de três aféreses (mínimo 1 e máximo 5), enquanto apenas 36% dos absolutos conseguiram a mesma concentração de células em até seis procedimentos.

Com base nestes dados, recomendamos o início do procedimento de coleta quando as células CD34+ periféricas são maiores que $12/\mu\text{L}$. Esta recomendação objetiva reduzir o número de procedimentos necessários para se coletar o mínimo de $2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg, reduzindo o risco de efeitos adversos, tais como hipocalcemia (Lins *et al.*, 1995; Bolan *et al.*, 2002), arritmia, hipotensão (Michon *et al.*, 2007), hipoxemia (Orbach *et al.*, 2003), plaquetopenia e alterações hidroeletrólíticas (Bojko *et al.*, 2002; Bolan *et al.*, 2004; Krishnan *et al.*, 2007), além do impacto psicológico e financeiro associado às múltiplas coletas (Schulman *et al.*, 1999; Sheppart *et al.*, 2015).

A capacidade de reconstituição do sistema hematopoético de maneira efetiva e sustentada depende do número de células CD34+/kg infundidas (Scheid *et al.*, 1999).

A relação inversamente proporcional entre a quantidade células CD34+/Kg infundidas e o tempo de recuperação hematológica já foi demonstrada em adultos (Stewart *et al.*, 1999; Villalon *et al.*, 2000) e mais recentemente em crianças, mostrando que doses maiores, em torno de 10×10^6 CD34+/kg, podem encurtar o tempo de recuperação neutrofilica em alguns dias (Dubrovsky *et al.*, 2012). Apesar da pequena diferença, a redução do período em que o paciente permanece neutropênico é uma importante vantagem, pois, os dias que a criança está neutropênica são os

momentos de maior risco infeccioso com complicações que podem postergar a recuperação medular e em situações mais agressivas serem até fatais (Schulman *et al.*, 1999; Scheid *et al.*, 1999).

Ainda não há consenso sobre a dose ideal a ser infundida, mas a dose mínima geralmente aceita para transplante é $2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg (Grupp *et al.*, 2006; Klaus *et al.*, 2007; Stiff *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, foi infundido o número médio de $3,3 \pm 1,6 \times 10^6$ células CD34+/kg e a maioria dos pacientes (40 dos 45 pacientes) apresentou pega da medula até o 22º dia pós-infusão, caracterizada pela contagem de leucócitos maior que $1000/\text{mm}^3$ por dois dias consecutivos. Em sendo um estudo retrospectivo nem sempre, em nosso serviço, existia a disponibilidade da contagem de neutrófilos no prontuário devido à dificuldade técnica na realização do exame. O tempo maior para pega (48 e 61 dias) de dois pacientes citados acima, foi atribuído a complicações infecciosas, já que receberam as quantidades preconizadas de CTH (2,81 e 2,66 células CD34+/Kg respectivamente) e três pacientes faleceram no período de neutropenia grave (menos de $500 \text{ neutrófilos}/\text{mm}^3$) com infecção documentada e sepse. Destes três pacientes, um faleceu no dia da infusão de células, um no 11º dia e um no 22º dia após a infusão de células-tronco. Apesar dos óbitos ocorrerem no período do transplante de medula óssea, não foram consequência direta da infusão de células (hemoculturas das células eram negativas), nem da quantidade de CTH infundidas (3,75; 2,43 e 2,8 células CD34+/kg respectivamente).

Este estudo nos permite formular um protocolo para coleta de CTH em pacientes pediátricos do SOH do ICr-HC-FMUSP com início da

mobilização após cinco semanas do uso terapêutico do ^{131}I -MIBG, que incluía a infusão de G-CSF endovenoso na dose de 15 $\mu\text{g/kg/dia}$ divididos em duas doses, seguido da quantificação das células CD34+ no sangue periférico após o quarto dia do início da mobilização e a indicação do início do procedimento de coleta por aférese quando a quantidade de células CD34+ periféricas estiver maior que $12/\text{mm}^3$, com o objetivo de coletar no mínimo $2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg em um único procedimento por aférese e a realização do transplante autólogo de medula óssea com segurança, para minimizar possíveis efeitos adversos relacionados com múltiplos procedimentos e reduzir os custos globais do processo de coleta de células.

6 CONCLUSÕES

a) A coleta de células-tronco hematopoéticas por aférese foi factível em todos os pacientes do estudo.

b) Não houve influência significativa da idade, do peso, da dose do G-CSF e do tempo entre diagnóstico e início da mobilização, no número máximo de células CD34+ no sangue periférico.

c) O uso prévio à coleta de ^{131}I -MIBG terapêutico parece influenciar negativamente no pico de CPH no sangue periférico ($p=0,04$).

d) A contagem de células CD34+ no sangue periférico é importante fator preditivo do resultado das coletas de CPH por aférese.

e) O programa padronizado para coleta de células hematopoéticas por aférese em crianças portadoras de neuroblastoma 4, contempla: início da mobilização após cinco semanas do uso terapêutico do ^{131}I -MIBG com infusão endovenosa de 15 $\mu\text{g/kg/dia}$ do GCSF e a partir do quarto dia de mobilização contagem de células CD34+ no sangue periférico para indicação da coleta de células por aférese quando superior a 12 células/ μL .

7 ANEXOS

Anexo A - Protocolo Neuro 92 da Unidade de Onco-Hematologia-ICr-HCFMUSP

Módulos						
Ciclofosfamida 200mg/m ² /dia	1º ao 7º dia					
Adriamicina 45 mg/m ² /dia		8º dia				
Vincristina 2 mg/m ² /dia			14º dia		28 º dia	
Carboplatina 200 mg/m ² /dia Vepeside 300 mg/m ² /dia G/GM-CSF após				21º ao 23º dia		
Verapamil						21º ao 23º dia

Cirurgia	
MIBG terapêutico	10 - 12 mci/kg
Coleta de células-tronco periféricas	
Transplante autólogo de medula óssea	
Radioterapia individualizada	

Anexo B - Protocolo Neuro 97 da Unidade de Onco-Hematologia-ICr-HCFMUSP

Módulos						
Ciclofosfamida 200mg/m ² /dia	1º ao 7º dia					
Adriamicina 45 mg/m ² /dia		8º dia				
Vincristina 2 mg/m ² /dia			14º dia		28º dia	
Carboplatina 200 mg/m ² /dia Vepeside 300 mg/m ² /dia G/GM-CSF após				21º ao 23º dia		

Cirurgia	
MIBG terapêutico	10 - 12 mci/kg
Coleta de células-tronco periféricas	
Transplante autólogo de medula óssea	
Radioterapia individualizada	

Anexo C - Protocolo Neuro 2000 da Unidade de Onco-Hematologia-ICr-HCFMUSP

Módulos	2 ciclos pré-indutórios	
Ciclofosfamida 250mg/m ² /dia	1º ao 5º dia	
Topotecam 0,75mg/m ² /dia	1º ao 5º dia	
G-CSF 10mcg/kg/dia		6º ao 15º dia

Módulos	4 ciclos indutórios					
Ciclofosfamida 200mg/m ² /dia	1º ao 7º dia					
Adriamicina 45 mg/m ² /dia		8º dia				
Vincristina 1,5mg/m ² /dia			14º dia			28º dia
Carboplatina 200 mg/m ² /dia Vepeside 300 mg/m ² /dia				20º ao 22º dia		
G-CSF 10mcg/kg/dia					23º ao 24º dia	

Cirurgia	
MIBG terapêutico	10 - 12 mci/kg
Coleta de células-tronco periféricas	
Transplante autólogo de medula óssea	
Radioterapia individualizada	

8 REFERÊNCIAS

Aabideen K, Anoop P, Ethell ME, Potter MN. The feasibility of plerixafor as a second-line stem cell mobilizing agent in children. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2011; 33(1):65-7.

Armintage S, Hargreaves R, Samson D, Brennan M, Kanfer E, Navarrete C. CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20:587-91.

Arslan O, Moog R. Mobilization of peripheral blood stem cells. *Transfus Apher Sci.* 2007; 37(2):179-85..

Bagatell R, Cohn SL. Genetic discoveries and treatment advances in neuroblastoma. *Curr Opin Pediatr.* 2016; 28(1):19-25.

Baker DL, Schmidt ML, Cohn SL, Maris JM, London WB, Buxton A, et al. Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010; 363: 1313-23.

Barr RD, Whang-Peng J, Perry S. Hematopoietic stem cell in human peripheral blood. *Science.* 1975; 190:284-5.

Basquiera AL, Abichain P, Damonte JC, Ricchi B, Sturich AG, Palazzo ED, García JJ. The number of CD34(+) cells in peripheral blood as a predictor of the CD34(+) yield in patients going to autologous stem cell transplantation. *J Clin Apher.* 2006; 21(2):92-5.

Berenson RJ, Bensinger WI, Hill RS, Andrews RG, Garcia-Lopez J, Kalamasz DF, Still BJ, Spitzer G, Buckner CD, Bernstein ID, et al. Engraftment after infusion of CD34+ marrow cells in patient with breast cancer or neuroblastoma. *Blood.* 1991; 77(8):1717-22.

Berthold F, Boos J, Burdach S, Erttmann R, Henze G, Hermann J, Klingebiel T, Kremens B, Schilling FH, Schrappe M, Simon T, Hero B. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2005; 6(9):649-58.

Bojko P, Scharifi M, Stössel K, Seeber S. Comparison of processing four and five times the patients' blood volume during peripheral blood stem cell collection and analysis of CD34+38--and CD34+49d+ subsets during apheresis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002; 128(1):19-28.

Bolan CD, Cecco SA, Wesley RA, Horne M, Yau YY, Remaley AT, Childs RW, Barrett AJ, Rehak NN, Leitman SF. Controlled study of citrate effects and response to i.v. calcium administration during allogeneic peripheral blood progenitor cell donation. *Transfusion.* 2002; 42(7):935-46.

Bolan CD, Yau YY, Cullis HC, Horwitz ME, Mackall CL, Barrett AJ, Malech HL, Rehak NN, Wayne AS, Leitman SF. Pediatric large-volume leukapheresis: a single institution experience with heparin versus citrate-based anticoagulant regimens. *Transfusion*. 2004; 44(2):229-38.

Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and practice of pediatric oncology*. 6nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 886-922.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *Prog Clin Biol Res*. 1994; 385:363-9.

Brodeur GM, Seeger R, Schwab M, Varmus H, Bishop JP. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stages. *Science*. 1984; 224:1121-4.

Capasso M, Devoto M, Hou C, Asgharzadeh S, Glessner JT, Attiyeh EF, et al. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat Genet*. 2009; 41(6):718-23.

Carlin S, Mairs RJ, McCluskey AG, Tweddle DA, Sprigg A, Estlin C, Board J, George RE, Ellershaw C, Pearson AD, Lunec J, Montaldo PG, Ponzoni M, van Eck-Smit BL, Hoefnagel CA, van den Brug MD, Tytgat GA, Caron HN. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for prediction of the uptake of meta-[(131)I]iodobenzylguanidine by neuroblastoma tumors. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(9):3338-44.

Carlsen NL. How frequent is spontaneous remission of neuroblastomas? Implications for screening. *Br J Cancer*. 1990; 61(3):441-6.

Cecyn KZ, Seber A, Ginani VC, Gonçalves AV, Caram EM, Oguro T, Olivveira OM, Carvalho MM, Bordin JO. Large-volume leukapheresis for peripheral blood progenitor cell collection in low body weight pediatric patients: a single center experience. *Transfus Apher Sci*. 2005;32(3):269-74.

Cheung NV, Heller G. Chemoteraphy dose intensity correlates strongly with response, median survival, and median progression-free survival in metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1991; 9(6):902-4.

Civin CI, Strauss LC, Bovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis III: A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by monoclonal antibodies against KG1 cells. *J Immunol*. 1984; 133(1):157-65.

Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, lehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK; INRG Task Forc. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009; 27(2):289-97.

Cristófani LM. *Estudo comparativo para o tratamento de crianças com neuroblastoma avançado* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 1994.

Damon LE, Damon LE. Mobilization of hematopoietic stem cells into the peripheral blood. *Expert Rev Hematol*. 2009; 2(6):717-33.

De Bernardi B, Nicolas B, Boni L, Indolfi P, Carli M, Cordero Di Montezemolo L, et al. Disseminated neuroblastoma in children older than one year at diagnosis: comparable results with three consecutive high-dose protocols adopted by the Italian Co-Operative Group for Neuroblastoma. Italian Co-Operative Group for Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2003; 21(8):1592-601.

Dehner LP. Pathologic anatomy of classic neuroblastoma: including prognostic features and differential diagnosis. In: Pochedly C (Ed.). *Neuroblastoma: tumor biology and therapy*. Boca Raton: CRC Press 1990. p.111-43.

Dettke M, Greinix HT, Kalhs P, Kührer I, Worel N, Höcker P. Kinetics of PBPC mobilization by cyclophosphamide, as compared with that by epirubicin/paclitaxel followed by G-CSF support: implications for optimal timing of PBPC harvest. *Transfusion*. 2001; 41(5):681- 6.

Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Lillo R, Vicent MG, Vicario JL, Madero L. Large-volume leukapheresis in pediatric patients: pré-apheresis peripheral blood CD34+ cell count predicts progenitor cell yield. *Haematologica*. 1999; 84:32-5.

Diaz MA, Villa M, Alegre A, Lamana ML, de la Vega A, Granda A, Madero L. Collection and transplantation of peripheral blood progenitor cells mobilized by G-CSF alone in children with malignancies. *Br J Haematol*. 1996; 94(1):148-54.

Diaz MA, Vincent MG, Garcia-Sanchez F, Vicario JL, Madero L. Long-term hematopoietic engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in pediatric patients: effect of the CD34+ cell dose. *Vox Sang*. 2000; 79:145-50.

Donzella GA, ScholsD, Lin SW, Esté JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP. A small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med*. 1998; 4(1):72-7.

Dubois SG, Geier E, Batra V, Yee SW, Neuhaus J, Segal M, Martinez D, Pawel B, Yanik G, Naranjo A, London WB, Kreissman S, Baker D, Attiyeh E, Hogarty MD, Maris JM, Giacomini K, Matthay KK. Evaluation of norepinephrine transporter expression and metaiodobenzylguanidine avidity in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *Int J Mol Imaging*. 2012; 2012:250834.

DuBois SG, Matthay KK. Radiolabeled metaiodobenzylguanidine for the treatment of neuroblastoma. *Nucl Med Biol*. 2008; 35(Suppl 1):S35-48.

DuBois SG, Messina J, Maris JM, Glindden DV, Veatch J, Charron M, Hawkins R, Matthay KK. Hematologic toxicity of high-dose iodine-131-metaiodobenzylguanidine therapy for advanced neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22(12):2452-60.

Dubrovsky L, McCarter RJ, Fry TJ, Wong E, Cheng Y, Perez-Albuérne ED. Analysis of pediatric autologous PBSC apheresis and transplant: age is a major factor affecting post-transplant toxicity. *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 59:301-5.

Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on haemopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood*. 1988; 72(6):2074-81.

Dumba M, Jawad N, McHugh K. Neuroblastoma and nephroblastoma: a radiological review. *Cancer Imaging*. 2015; 15:5.

Eid KA, Miranda EC, Aguiar Sdos S. Mobilization and collection of CD34(+) cells for autologous transplantation of peripheral blood hematopoietic progenitor cells in children: analysis of two different granulocyte-colony stimulating factor doses. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015; 37(3):160-6.

Engelhardt M, Bertz H, Afting M, Waller CF, Finke J. High-versus standard-dose filgrastim (rhG-CSF) for mobilization of peripheral-blood progenitor cells from allogeneic donors and CD34(+) immunoselection. *J Clin Oncol*. 1999; 17(7):2160-72.

Evans A, Scher C, D'angio G. Treatment of advanced neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1992; 28A(8/9):1301-2.

Finkelstein JZ. Neuroblastoma: the challenge and frustration. *Hematology*. 1987; 1(4):675-94.

Fish JD, Grupp SA. Stem cell transplantation for neuroblastoma. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 41:159-65.

Geatti O, Shapiro B, Sisson JC, Hitchinson RJ, Mallette S, Eyre P, Beierwaltes WH. Iodine-131 metaiodobenzylguanidine scintigraphy for the location of neuroblastoma: preliminary experience in ten cases. *J Nucl Med*. 1985; 26(7):736-42.

George RE, Li S, Medeiros-Nancarrow C, Neuberg D, Marcus K, Shamberger RC, Pulsipher M, Grupp SA, Diller L. High-risk neuroblastoma treated with tandem autologous peripheral-blood stem cell-supported transplantation: long-term survival update. *J Clin Oncol*. 2006; 24(18):2891-6.

Goldsby RE, Matthay KK. Neuroblastoma: evolving therapies for a disease with many faces. *Paediatr Drugs*. 2004; 6(2):107-22.

Gooskens SL, Braakman E, van den Boom AL, So-Osman C, de Winter F, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. Peripheral stem cell harvest using regular chemotherapy schedules in childhood cancer. *Pediatr Transplant*. 2012; 16(7):758-65.

Gray JC, Kohler JA. Immunotherapy for neuroblastoma: turning promise into reality. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53:931-40.

Grupp SA, Cohn SL, Wall D, Reynolds CP; Hematopoietic Stem Cell Transplant Discipline and the Neuroblastoma Disease Committee, Children's Oncology Group. Collection, storage, and infusion of stem cells in children with high-risk neuroblastoma: saving for a rainy day. *Pediatr Blood Cancer*. 2006; 46(7):719-22.

Grupp SA, Stern JW, Bunin N, Nancarrow C, Ross AA, Mogul M, Adams R, Grier HE, Gorlin JB, Shamberger R, Marcus K, Neuberg D, Weinstein HJ, Diller L. Tandem high-dose therapy in rapid sequence for children with high-risk neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2000; 18:2567-75.

Hill QA, Buxton D, Pearce R, Gesinde MO, Smith GM, Cook G. An analysis of the optimal timing of peripheral blood stem cell harvesting following priming with cyclophosphamide and G-CSF. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40(10):925-30.

Hiorns MP, Owens CM. Radiology of neuroblastoma in children. *Eur Radiol*. 2001; 11(10):2071-81.

Howman-Giles R, Shaw PJ, Uren RF, Chung DK. Neuroblastoma and other neuroendocrine tumors. *Semin Nucl Med*. 2007; 37:286-302.

Hutchinson RJ, Sisson JC, Shapiro B, Miser JS, Normole D, Shulkin BL, Francis IR, Zasadny K, Carey JE, Johnson JW, et al. 131-I-metaiodobenzylguanidine treatment in patients with refractory advanced neuroblastoma. *Am J Clin Oncol*. 1992; 15(3):226-32.

Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H, Ohnuma N, Yamamoto K, Kawa K, et al. Intensified chemotherapy increases the survival rates in patients with stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002; 24(8):613-21.

Kanold J, Berger M, Halle P, Rapatel C, Schoepfer C, de Lumley L, Vannier JP, Lutz P, Plantaz D, Stéphan JL, Malpuech G, Deméocq F. Kinetics of hematopoietic progenitor cell release induced by G-CSF-alone in children with solid tumors and leukemias. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21(1):59-63.

Kanold J, Rapatel C, Berger M, Chassagne J, Lutz P, de Lumley L, et al. Use of G-CSF alone to mobilize peripheral blood stem cells for collection from children. *Br J Haematol.* 1994; 88(3):633-5.

Kaplan S, Holbrook C, McDaniel H, Buntain W, Crist W. Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood. *Am J Dis Child.* 1980; 134:21-4.

Karakukcu M, Unal E. Stem cell mobilization and collection from pediatric patients and healthy children. *Transfus Apher Sci.* 2015; 53(1):17-22.

Kinnier-Wilson LM, Draper GJ. Neuroblastoma, its natural history and prognosis: a study of 487 cases. *Br J Med.* 1974; 3:301-7.

Klaus J, Herrmann D, Breitzkreutz I, Hegenbart U, Mazitschek U, Egerer G, Cremer FW, Lowenthal RM, Huesing J, Fruehauf S, Moehler T, Ho AD, Goldschmidt H. Effect of CD34 cell dose on hematopoietic reconstitution and outcome in 508 patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Eur J Haematol.* 2007; 78(1):21-8.

Körbling M, Anderlini P. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood.* 2001; 98(10):2900-8.

Körbling M, Freireich EJ. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2011; 16:6411-6.

Krishnan RG, Coulthard MG. Minimising changes in plasma calcium and magnesium concentrations during plasmapheresis. *Pediatr Nephrol*. 2007; 22(10):1763-6.

Kröger N, Zander AR. Dose and schedule effect of G-CSF for stem cell mobilization in healthy donors for allogeneic transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2002; 43(7):1391-4.

Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, Mealiffe M, Terstappen LW, Hardwick a, Moubayed M, et al. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1995; 85(1):275-82.

Lasky LC, Ash RC, Kersey JH, Zanjani ED, McCullough J. Collection of pluripotential hematopoietic stem cells by cytapheeresis. *Blood*. 1982; 59:822-7.

Lasky LC, Bostrom B, Smith J, Moss TJ, Ramsay NK. Clinical collection and use of peripheral blood stem cells in pediatric patients. *Transplantation*. 1989; 47(4):613-6.

Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hübel K, Cooper S, Hangoc G, Bridger GJ, Henson GW, Calandra G, Dale DC. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2003; 102(8):2728-30.

Lin JS, Burgstaler EA, Pineda AA, Gertz MA. Effects of whole blood flow rates on mononuclear cell yields during peripheral blood stem cell collection using Fenwal CS 3000 Plus. *J Clin Apher*. 1995; 10(1):7-11.

London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, Berthold f, Nakagawara A, Ladenstein RL, lehara t, Matthay KK. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *J Clin Oncol*. 2011; 29(24):3286-92.

London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2005; 23(27):6459-65.

Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2002; 22(4):911-34.

Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc amplification in childhood neuroblastoma: a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol.* 1991; 9:581-91.

Lysak D, Koristek Z, Gasova Z, Skoumalova I, Jindra P. Efficacy and safety of peripheral blood stem cell collection in elderly donors; does the age interfere? *J Clin Apher.* 2011; 26(1):9-16.

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet.* 2007; 369(9579):2106-20.

Maris JM, Mosse YP, Bradfield JP, Hou C, Monni S, Scott RH, Asgharzadeh S, Attiyeh EF, Diskin SJ, Laudenslager M, Winter C, Cole KA, Glessner JT, Kim C, Frackelton EC, Casalunovo T, Eckert AW, Capasso M, Rappaport EF, McConville C, London WB, Seeger RC, Rahman N, Devoto M, Grant SF, Li H, Hakonarson H. Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2008; 358(24):2585-93.

Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2010; 362(23):2154-211.

Marson P, Petris MG, Silvestro G. Collection of peripheral blood stem cells in pediatric patients: a concise review on technical aspects. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 22(suppl 5):7-11.

Maschan AA, Balashov DN, Kurnikova EE, Trakhtman PE, Boyakova EV, Skorobogatova EV, Novichkova GA, Maschan MA. Efficacy of plerixafor in children with malignant tumors failing to mobilize a sufficient number of hematopoietic progenitors with G-CSF. *Bone Marrow Transplant*. 2015; 50(8):1089-91.

Matthay KK, Panina C, Huberty J, Price D, Glidden DV, Tang HR, et al. Correlation of tumor and whole-body dosimetry with tumor response and toxicity in refractory neuroblastoma treated with (131)I-MIBG. *J Nucl Med*. 2001; 42(11):1713-21.

Matthay KK, Tan JC, Villablanca JG, Yanik GA, Veatch J, Franc B, Twomey E, Horn B, Reynolds CP, Groshen S, Seeger RC, Maris JM. Phase I dose escalation of iodine-131-metaiodobenzylguanidine with myeloablative chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in refractory neuroblastoma: a new approaches to Neuroblastoma Therapy Consortium Study. *J Clin Oncol*. 2006; 24(3):500-6.

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbin RB, Reynolds CP. 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.

Matthay KK, Yanik G, Messina J, Quach A, Huberty J, Cheng SC, *et al.* Phase II study on the effect of disease sites, age, and prior therapy on response to iodine-131-metaiodobenzylguanidine therapy in refractory neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2007; 25(9):1054-60.

McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science.* 1971; 171:294-4.

McHugh K. Renal and adrenal tumours in children. *Cancer Imaging.* 2007; 7:41-51.

Mendrone A Jr, Arrais CA, Saboya R, Chamone Dde A, Dulley FL. Factors affecting hematopoietic progenitor cell mobilization: An analysis of 307 patients. *Transfus Apher Sci.* 2008; 39(3):187-92.

Merlin E, Piguet C, Auvrignon A, Rubie H, Deméocq F, Kanold J. The pros and the cons of split-dose granulocyte colony-stimulating factor alone rather than a single high dose for hematopoietic progenitor cell mobilization in small children (< 15Kg) with solid tumors. *Haematologica.* 2006; 91:1004-5.

Michon B, Moghrabi A, Winikoff R, Barrette S, Bernstein ML, Champagne J, David M, Duval M, Hume HA, Robitaille N, Bélisle A, Champagne MA. Complications of apheresis in children. *Transfusion.* 2007; 47(10):1837-42.

Modak S, Cheung IY, Kushner BH, Kramer K, Reich L, Cheung NK. Plerixafor plus granulocyte-colony stimulating factor for autologous hematopoietic stem cell mobilization in patients with metastatic neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2012; 58:469-71.

Moncada V, Bolan C, Yau YY, Leitman SF. Analysis of PBPC cell yield during large-volume leukopheresis of subjects with a poor mobilization response to filgrastim. *Transfusion*. 2003; 43:495-501.

Mossé YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. 2004; 75(4):727-30.

Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008; 455(7215):930-5.

Odone Filho V. Transplantes autólogos de medula óssea em oncologia pediátrica - Experiência preliminar do Instituto da Criança Prof. Pedro de Alcântara, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr). *J Pediatr*. 1996; 72:209-14.

Odone-Filho V, Maluf JR PT, Cristófani LM, Weltman E, Lopes LH, Leite K, et al. *Central Nervous system metastases in neuroblastoma: a possible pathway*. ASCO. 1989. Proceedings, p. 305, abstract 1190.

Odone-Filho V. *Tratamento convencional dos neuroblastomas*. São Paulo, 1992. 123 p. Tese (Livre-Docência) Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.

Orbach D, Hojjat-Assari S, Doz F, Pacquement H, Guillaume A, Mathiot C, Zucker JM, Michon J. Peripheral blood stem cell collection in 24 low-weight infants: experience of a single centre. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31(3):171-4.

Sarkodee-Adoo C, Taran I, Guo C, Buadi F, Murthy R, Cox E, Lopez R, Westphal S, Shope S, O'Connell B, Wethers L, Meisenberg B. Influence of preapheresis clinical factors on the efficiency of CD34+ cell collection by large-volume apheresis. *Bone Marrow Transplant*. 2003; 31(10):851-5.

Scheid C, Draube A, Reiser M, Schulz A, Chemnitz J, Nelles S, Fuchs M, Winter S, Wickramanayake PD, Diehl V, Söhnngen D. Using at least 5×10^6 /Kg CD34+ cells for autologous stem cell transplantation significantly reduces febrile complications and use of antibiotics after transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 23(11):1177-81.

Schulman KA, Birch R, Zhen B, Pania N, Weaver CH. Effect of CD34(+) cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral-blood stem-cell support. *J Clin Oncol*. 1999; 17(4):1227.

Schulte JH, Eggert A. Neuroblastoma. *Crit Rev Oncog*. 2015; 20(3-4):245-70.

Schwab N. Amplification of the MYCN oncogene and deletion of putative tumour suppressor gene in human neuroblastomas. *Brain Pathol*. 1990; 1(1):41-6.

Sevilla J, González-Vicent M, Madero L, García-Sánchez F, Angel Diaz M. Large volume leukapheresis in small children: safety profile and variables affecting peripheral blood progenitor cell collection. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31(4):263-7.

Sevilla J, González-Vincent M, Madero L, García-Sánchez F, Díaz MA. Granulocyte colony-stimulating factor alone at 12 µg/Kg twice a day for 4 days for peripheral blood progenitor cell priming in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30:417-20.

Shapiro B, Gross MD. Radiochemistry, biochemistry, and kinetics of ¹³¹I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) and ¹²³I-MIBG: clinical implications of the use of ¹²³I-MIBG. *Med Pediatr Oncol.* 1987; 15(4):170-7.

Sheppard D, Tay J, Palmer D, Xenocostas A, Doulaverakis C, Huebsch L, McDiarmid S, Tinmouth A, Mallick R, Martin L, Birch P, Hamelin L, Allan D, Bredeson C. Improved Prediction of CD34+ Cell Yield before Peripheral Blood Hematopoietic Progenitor Cell Collection Using a Modified Target Value-Tailored Approach. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015Nov 28. pii: S1083-8791(15)00743-0.

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer.* 1999; 86(2):364-72.

Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34+ cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2000; 18:1360-77.

Sisson JC, Shapiro B, Hutchinson RJ, Carey JE, Zasadny KR, Zempel SA, Normolle DP. Predictors of toxicity in treating patients with neuroblastoma by radiolabeled metaiodobenzylguanidine. *Eur J Nucl Med*. 1994; 21(1):46-52.

Socinski MA, Cannistra SA, Elias A, Antman KH, Schnipper L, Griffin JD. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet*. 1988; 1(8596):1194-98.

Stewart DA, Guo D, Luider J, eauer I, Klassen J, Chinbg e, Morris D, Chaudhry A, Brown C, Russel JA. Factor predicting engraftment of autologous blood stem cells: CD34+ subsets inferior to the total CD34+ cell dose. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 23(1):1237-43.

Stewart DA, Smith C, MacFarland R, Calandra G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of plerixafor in patients with non-Hodgkin lymphoma and multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15(1):39-46.

Stiff PJ, Micallef I, Nademanee AP, Stadtmauer EA, Maziarz RT, Bolwell BJ, Bridger G, Marulkar S, Hsu FJ, Dpersio JF. Transplanted CD34(+) Cell Dose Is Associated with Long- Term Platelet Count Recovery following Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplant in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma or Multiple Myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011; 17(8):1146-53.

Streby KA, Shah N, Ranalli MA, Kunkler A, Cripe TP. Nothing but NET: a review of norepinephrine transporter expression and efficacy of ¹³¹I-mIBG therapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2015; 62(1):5-11.

Stute N, Santana VM, Rodman JH, Schell MJ, Ihle JN, Evans WE. Pharmacokinetics of Subcutaneous Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Children. *Blood*. 1992; 79:2849-54.

Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, ChinYee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematoth*. 1996; 5:213-26.

Toledano H, Yahel A, Cohen IJ, Yaniv I, Stein J. Successful mobilization, harvest and transplant of peripheral blood stem cells using AMD3100 and G-CSF following high dose craniospinal irradiation for medulloblastoma in a young child. *Pediatr Blood Cancer*. 2010; 54(4):613-5.

Treuner J, Feine U, Niethammer D, Muller-Schaumburg W, Meinke J, Eibach E, Dopfer r, Klingebiel T, Grumbach S. Scintigraphic imaging of neuroblastoma with [¹³¹I]iodobenzylguanidine. *Lancet*. 1984; 1(8372):333-4.

Trickett AE, Smith S, Kwan YL. Accurate calculation of blood volume to be processed by apheresis to achieve target CD34+ cell numbers for PBPC transplantation. *Cytotherapy*. 2001; 3(1):5-10.

Veljkovic D, Vujic D, Nonkovic OS, Jevtic D, Zecevic Z, Lazic E. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells in pediatric patients with solid tumors. *Therc Apher Dial*. 2011; 15(6):570-86.

Villalon L, Odriozola J, Laraña JG, Zamora C, Pérez de Oteyza J, Jodra MH, López J, Herrera P, Roldán E, Ramos ML, Ramos P, Navarro JL. Autologous peripheral blood progenitor cells transplantation with $< 2 \times 10^6$ CD34+/Kg: An analysis of variables concerning mobilization and engraftment. *Hematol J*. 2000; 1(6):374-81.

Watanabe H, Watanabe T, Suzuya H, Wakata Y, Kaneko M, Onishi T, Okamoto Y, Abe T, Kawano Y, Kagami S, Takaue Y. Peripheral blood stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor alone and engraftment kinetics following autologous transplantation in children and adolescents with solid tumor. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 37:661-8.

Watanabe T, Takaue Y, Kawano Y, Koyama T, Huq MA, Shimokawa T, Ninomiya T, Aga Y, Inai T, Hino M, et al. Peripheral blood stem cell autotransplantation in treatment of childhood cancer. *Bone Marrow Transplant*. 1989; 4(3):261-5.

Weaver CH, Birch R, Greco FA, Schwartzberg L, McAneny B, Moore M, Oviatt D, Redmond J, George C, Alberico T, Johnson P, Buckner CD. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized evaluations of different doses of filgrastim. *Br J Haematol*. 1998; 100(2):338-47.

Zhang C, Chen X, Zhang X, Gao L, Kong P, Wang Q, Peng X, Liu H. Mobilization of peripheral blood stem cells for autologous transplantation patients with hematological malignancies: Influence of disease, mobilization method, age and sex. *Transfus Apher Sci*. 2008; 39(1):21-8.