



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD
CAMPO DE CONOCIMIENTO: ONCOLOGIA PEDIATRICA

TITULO DEL TRABAJO

**EFICACIA Y SEGURIDAD CARDIACA DE LA DOXORRUBICINA PEGILADA LIPOSOMAL
VS. DOXORRUBICINA CONVENCIONAL COMBINADA CON DEXRAZOXANE PARA EL
TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES PEDIÁTRICOS CON DIAGNÓSTICO DE SARCOMA.
ENSAYO CLÍNICO CONTROLADO**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

LILIANA VELASCO HIDALGO

TUTOR:

DR. ROBERTO RIVERA LUNA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MEXICO D.F. OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Resumen estructurado	3
Antecedentes	4
Planteamiento del Problema	21
Justificación	21
Preguntas de Investigación	21
Hipótesis	22
Objetivos Generales	22
Objetivos Secundarios	22
Clasificación de la Investigación	22
Material y Métodos	22
Variables del Estudio	24
Descripción General del Estudio	29
Recursos Materiales y Humanos	34
Financiamiento	34
Conflictos de Interés	34
Cálculo de la Muestra	34
Análisis Estadístico	35
Aspectos Éticos	37
Límites del estudio	39
Resultados	40
Anexo 1. Carta de Consentimiento y Asentimiento	62
Anexo 2. Tabla de Números Aleatorios	66
Anexo 3. Características de la Evaluación	67
Anexo 4. Hoja de captura de Datos	68
Aprobación por el comité del Instituto Nacional de Pediatria	71
Referencias	74

Eficacia y seguridad cardiaca de la doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane para el tratamiento de los pacientes pediátricos con diagnostico de sarcoma. Ensayo Clínico Controlado

Rivera-Luna, R; Velasco-Hidalgo, L, Cárdenas-Cardós, R; González-Garay, A ; Garrido M; De Uña-Flores A, Pérez-Juárez F. Departamento de Oncología, Departamento de Metodología de la Investigación, Departamento de Cardiología, Servicio de Radiología. Instituto Nacional de Pediatría. SSA.

Resumen Estructurado

Antecedentes.- Los sarcomas en edad pediátrica es una patología rara con una incidencia baja de 4.6 a 8.7 casos por millón de niños; en los últimos años la supervivencia de estos pacientes ha aumentado considerablemente logrando hasta 70% supervivencia libre de enfermedad a 5 años gracias a los esquemas de quimioterapia; sin embargo se ha reportado que desde el 1 al 65% desarrolla toxicidad cardiaca secundario a los efectos colaterales del tratamiento con doxorubicina. Se han buscado diferentes alternativas de tratamiento con la finalidad de disminuir los cardiotoxicos de la quimioterapia y mejorar la eficacia en la reducción y eliminación de la carga tumoral en los pacientes con dicha patología, sin embargo existe poca evidencia que demuestre que tratamiento es el más eficaz y seguro, debido a que los estudios que se han realizado solo analizan la supervivencia a corto plazo, y los efectos tóxicos generales, sin olvidar que contaron con un tamaño de muestra pequeño en población adulta.

Objetivo.- Comparar la eficacia con base a la reducción de la masa tumoral, así como evaluar la seguridad a nivel cardiaca entre la administración de los 2 esquemas de tratamiento quimioterápico: doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada más dexrazoxane en los pacientes pediátricos con sarcoma.

Material y Métodos.- Población Elegible Pacientes pediátricos con diagnóstico reciente de sarcoma (rabdomiosarcoma, sarcomas no rabdo de alto grado, osteosarcoma y sarcoma de Ewing), internados en el servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría entre el periodo comprendido del 01 marzo del 2010 al 28 febrero 2013. De acuerdo a los criterios de inclusión se elegirán a los pacientes a participar en el estudio contando con la confirmación histopatológica del diagnóstico. Se solicitará la firma de consentimiento informado a los familiares y según sea el caso asentimiento bajo información. Se asignarán los pacientes a la rama de tratamiento de acuerdo a una tabla de números aleatorios, dividida por bloques balanceados en Grupo 1 Doxorubicina + dexrazoxane, Grupo 2 Doxorubicina pegilada liposomal.

Análisis estadístico.- Se realizará un análisis univariado por medio de pruebas de tendencia central para conocer las características de la muestra estudiada, y así establecer el tipo de distribución de cada variable. La comparación de las medias se realizará mediante pruebas de T de Student o U de Mann Whitney dependiendo del tipo de distribución de los datos; mientras que para comparar las proporciones se utilizará la prueba de ji cuadrada. Se ajustarán los covariados y se identificará si existe colinealidad o modificación de efecto mediante el análisis bi-variado de cada una de las variables con el desenlace. La supervivencia de la enfermedad y la supervivencia libre de evento se analizará a través de la prueba de Kaplan Meyer y posteriormente se comparará la supervivencia entre los 2 grupos de tratamiento a través de Cox.

Resultados.- Titulación por producción científica, se incluyeron 4 artículos relacionados al campo de la oncología pediátrica y pediatría. Así mismo se realizó un análisis de la calidad metodológica de los artículos presentados.

***ANTECEDENTES**

El cáncer en población pediátrica en los últimos años se ha considerado como un problema de salud publica, ya que es la segunda causa de muerte en la población pediátrica. En las últimas décadas se han logrado avances importantes en la supervivencia de estos pacientes, observándose que en algunas patologías se ha alcanzado una supervivencia mayor del 90% a 5 años, sin embargo los efectos a largo plazo en supervivientes del cáncer limitan su calidad de vida, por lo que actualmente a nivel mundial, se están realizando estudios encaminados a disminuir estos efectos secundarios tardíos.

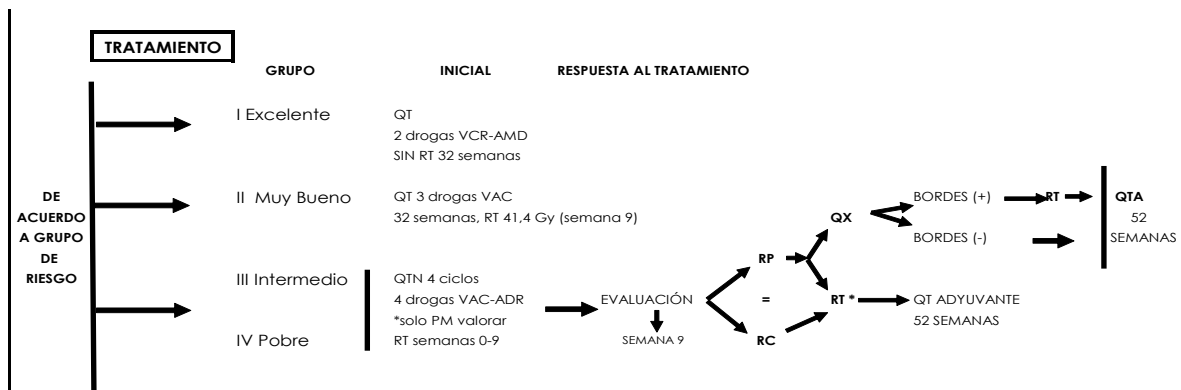
Los Sarcomas en edad pediátrica son raros, ya que tienen una presentación de 1000 casos nuevos por año en Estados Unidos; dentro de este tipo de tumores encontramos los siguientes: Rbdomiosarcoma, Sarcomas de tejidos blandos no rbdomiosarcoma, sarcomas óseos y el sarcoma de Ewing.

El **Rbdomiosarcoma** es el sarcoma de tejidos blandos más común en niños menores de 15 años, tiene una incidencia de 4.6 casos por millón por año y representa el 50% de todos los sarcomas de tejidos blandos, a esta edad; y se ha observado que su incidencia en los últimos 30 años ha sido constante. ¹

Se han reportado una serie de grupos cooperativos desde 1972 constituidos por el Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group (IRSG), que han redefinido de manera continua el diagnóstico, estratificación de riesgo y tratamiento de estos pacientes. El Rbdomiosarcoma (RMS) requiere de un abordaje interdisciplinario coordinado para alcanzar la curación y gracias a la integración de estos grupos de estudio, la sobrevida libre de evento de los pacientes con dicha patología se ha incrementado notablemente (del 25% al 70% en 21 años) gracias al esquema de tratamiento individualizado de acuerdo al sitio primario, etapa TNM y grupo clínico del tumor.

Actualmente a nivel nacional, la coordinación del protocolo Nacional para RMS del programa de seguro popular, ha evaluado cuidadosamente este tipo de tumores, estableciendo el tratamiento en base a lo descrito por estudios cooperativos internacionales (IRS), formulando rutas críticas para el adecuado tratamiento de estos pacientes. (Figura 1)

Figura 1. Protocolo Nacional de tratamiento para pacientes con RMS.



RC = Resección completa QT = Quimioterapia RT = Radioterapia AMD = Actinomicina

RP = Resección parcial QX = Cirugía VCR = Vincristina VAC = Vincristina, actinomicina, ciclofosfamida

Los sarcomas de tejidos blandos no rbdomiosarcomas (STBNR) son un grupo heterogéneo de neoplasias derivadas de células mesenquimatosas, la mayoría se denomina con el nombre del tejido maduro al que recuerda el tumor; son raros y no han sido bien estudiados, se conoce poco acerca de su biología, historia natural y tratamiento óptimo; representan el 4% de las neoplasias en menores de 20

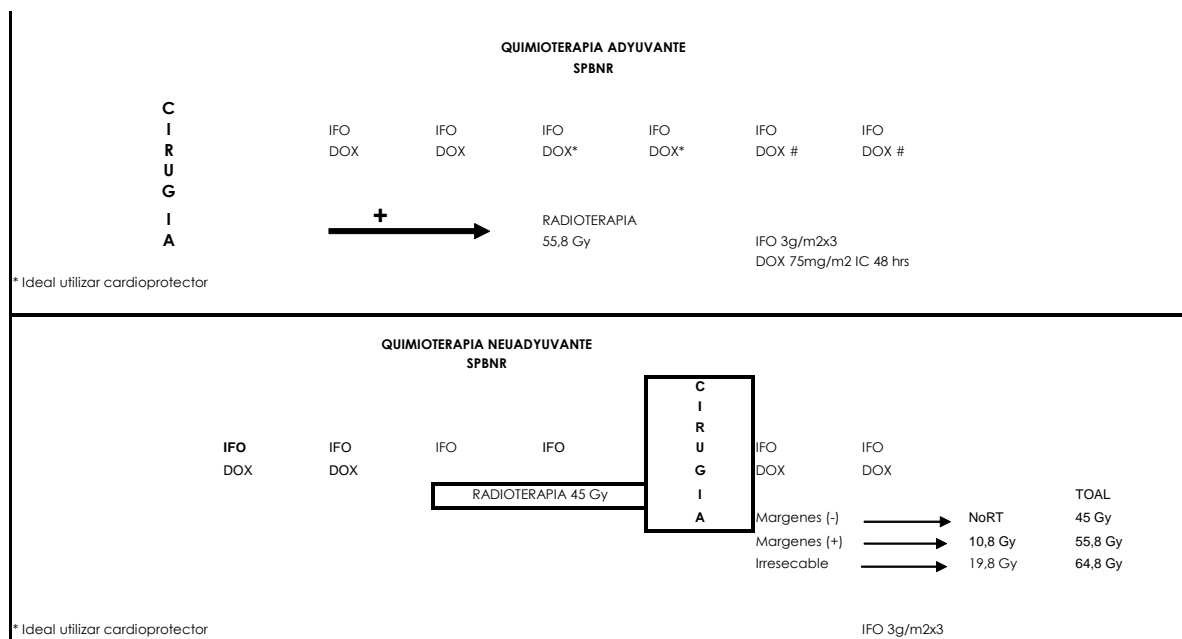
años y tienen una distribución bimodal en población pediátrica presentándose en la infancia y en la adolescencia.

El tratamiento de los pacientes con STBNR se encuentra sin estandarización; se ha observado claramente la importancia de la radioterapia, sin embargo el rol de la quimioterapia permanece controversial, ya que este tipo de tumores es relativamente quimiorresistente.

Existen algunos estudios en pediatría donde se ha observado respuestas al tratamiento entre 36-40%. Debido a que la quimioterapia tiene una eficacia limitada, se han establecido recomendaciones para su uso en este tipo de pacientes; esta indicada en pacientes con tumores no resecables, en tumores no metastáticos de alto grado con un diámetro mayor de 5 cm y en pacientes con enfermedad metastásica, obteniendo una sobrevida de hasta el 50%. Los agentes más activos contra este tipo de neoplasia son la doxorubicina y la ifosfamida.

El tratamiento establecido mediante el Protocolo Nacional y empleado en el Instituto Nacional de Pediatría, es el siguiente (Figura 2).²

Figura 2. Protocolo Nacional de tratamiento para pacientes con Sarcoma de Tejidos Blandos no RMS



El **Osteosarcoma** es el tumor óseo más frecuente en niños y adolescentes, es una neoplasia altamente agresiva, con una incidencia de 650 a 700 casos nuevos por año, el pronóstico de estos pacientes era pobre (supervivencia de 15 a 20%) antes del uso de quimioterapia efectiva; posteriormente se ha observado que la supervivencia ha incrementado hasta el 70% para pacientes con enfermedad no metastásica y al 40% para enfermedad metastásica.

Los agentes terapéuticos más activos son el cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, y metotrexate a muy altas dosis.³

El Protocolo Nacional, se basa en una combinación de las drogas que han demostrado ser activas contra el tumor (Cuadro 1).

Cuadro 1. Protocolo Nacional de tratamiento para pacientes con Osteosarcoma

PROTOCOLO NACIONAL NEOADYUVANCIA.								ADYUVANCIA.					
Semanas	0	2	4	6	8	10	12	Semanas	15	18	21	24	27
CDDP	X	X	X	X	X	X	Cirugía	VP-16	X	X	X	X	X
DOX	X		X		X			CFA	X	X	X	X	X

El **Sarcoma de Ewing** (SE) es un tumor de origen neuroectodérmico, que se origina en las células parasimpáticas. Los tumores de la familia de Sarcoma de Ewing se presentan con mayor frecuencia en la segunda década de la vida y comprenden aproximadamente el 4% de los tumores pediátricos. Predomina en el sexo masculino en proporción de 1.1:1.

Los tumores de la familia del SE son curables con un manejo en combinación de quimioterapia y radioterapia o quimioterapia y cirugía o ambos esquemas de tratamiento. El tratamiento debe orientarse a lograr el control local de la enfermedad y erradicar la enfermedad sistémica. Para la quimioterapia se emplearon regímenes que contenían vincristina, actinomicina D, ciclofosfamida y doxorubicina (VACD); al combinar este esquema con estrategias de tratamiento local e intensificar dosis de alquilantes y de doxorubicina, la supervivencia aumento de 20% a 60%.^{4, 5}

Actualmente el tratamiento para este tipo de neoplasia se establece de acuerdo al riesgo. La supervivencia que se obtiene para pacientes con enfermedad metastásica es pobre, el tratamiento convencional consigue supervivencia que no supera el 25%. El manejo de los pacientes con diagnóstico de SE en el INP esta basado en el protocolo nacional el cual consiste en (Cuadros 2 a 5):

Cuadro 2. Tratamiento Neoadyuvante para Sarcoma de Ewing

Semana 0	Semana 3	Semana 6
Vincristina	Vincristina	Vincristina
2 mg/m2/día 1	2 mg/m2/día 1	2 mg/m2/día 1
Ciclofosfamida	Ciclofosfamida	Ciclofosfamida
2.1 gr/m2/día. Días 1 y 2	2.1 gr/m2/día. Días 1 y 2	2.1 gr/m2/día. Días 1 y 2
Mesna 100% día 1 y 2	Mesna 100% día 1 y 2	Mesna 100% día 1 y 2
Doxorrubicina	Doxorrubicina	Doxorrubicina
25 mg/m2/día. Días 1, 2 y 3	25 mg/m2/día. Días 1, 2 y 3	25 mg/m2/día. Días 1, 2 y 3
FECC 5mcg/kg/día 4-13	FECC 5mcg/kg/día 4-13	FECC 5mcg/kg/día 4-13
		Valorar resección quirúrgica

Cuadro 3. Quimioterapia postquirurgica sin residual

Semana 12	Semana 15	Semana 18	Semana 21
Ifosfamida 2	Ifosfamida	Vincristina	Ifosfamida
2 gr/m2/día 1-5	2 gr/m2/día 1-5	2 mg/m2/día 1	2 gr/m2/día 1-5
Mesna 100%	Mesna 100%	Ciclofosfamida	Mesna 100%
Etopósido	Etopósido	2.1 gr/m2/día. Días 1 y 2	Etopósido
100 mg/m2/día 1-5	100 mg/m2/día 1-5	Mesna 100% día 1 y 2	100 mg/m2/día 1-5
FECG 5 mcg/kg/día	FECG 5 mcg/kg/día	Doxorrubicina	FECG 5 mcg/kg/día
6-15	6-15	25 mg/m2/día. Días 1, 2 y 3	6-15
		FECG 5 mcg/kg/día	
		4-13	

Cuadro 4. Quimioterapia postquirúrgica con enfermedad residual microscópica

Semana 11	Semana 14	Semana 17	Semana 20	Semana 23
Radioterapia 50.4 gy	Radioterapia	Ifosfamida	Vincristina	Ifosfamida
Vincristina 1.5 mg/m2/dosis semana 11,12,13	50.4 gy	2.2gr/m2/día 1-5	2 mg/m2/día 1	2.2gr/m2/día 1-5
	Vincristina 1.5 mg/m2/dosis semana 14,15,16	Mesna 100%	Ciclofosfamida 2.1gr/m2/día 1,2	Mesna 100%
		Etopósido 100 mg/m2/día 1-5	Doxorrubicina	Etopósido 100 mg/m2/día 1-5
		FECG 5mcg/kg/día 6-15	25mg/m2/día 1,2,3	FECG 5mcg/kg/día 6-15
			FECG 5mcg/kg/día 4-13	
	Semana 26		Semana 29	
Ifosfamida		Vincristina		
2.2gr/m2/día 1-5		2 mg/m2/día 1		
Mesna 100%		Ciclofosfamida 2.1gr/m2/día 1,2		
Etopósido 100 mg/m2/día 1-5		Doxorrubicina		
FECG 5mcg/kg/día 6-15		25mg/m2/día 1,2,3		
		FECG 5mcg/kg/día 4-13		

Cuadro 5. Quimioterapia postquirúrgica enfermedad macroscópica

Semana 11	Semana 14	Semana 18	Semana 21	Semana 24
Radioterapia 55.8 Gy	Radioterapia	Ifosfamida	Vincristina	Ifosfamida
Vincristina	55.8 Gy	2.2gr/m2/día 1-5	2 mg/m2/día 1	2.2gr/m2/día 1-5
1.5mg/m2/dosis	Vincristina	Mesna 100%	Ciclofosfamida 2.1gr/m2/día 1	Mesna 100%
Semana 11,12,13	1.5mg/m2/dosis	Etopósido 100 mg/m2/día 1-5	Actinomicina D 500 mcg/m2/día 1-4	Etopósido 100 mg/m2/día 1-5
	Semana 14,15,16	FECG 5mcg/kg/día 6-15	Doxorrubicina	FECG 5mcg/kg/día 6-15
			20mg/m2/día 1,2,3	
			FECG 5mcg/kg/día 5-14	
	Semana 27		Semana 30	

Ifosfamida 2.2gr/m2/día 1-5 Mesna 100% Etopósido 100 mg/m2/día 1-5 FECG 5mcg/kg/día 6-15	Vincristina 2 mg/m2/día 1 Ciclofosfamida 2.1gr/m2/día 1 Actinomicina D 500 mcg/m2/día 1-4 Doxorubicina 20mg/m2/día 1,2,3 FECG 5mcg/kg/día 5-14
--	--

Doxorrubicina.

La doxorubicina es un medicamento que pertenece al grupo de los antracíclicos que son drogas antineoplásicas, los cuales empleados de manera aislada o combinada con otros agentes, son útiles en el tratamiento de diversos tumores sólidos, así como en enfermedades hematológicas malignas. Es un fármaco de primera línea empleado ampliamente en el tratamiento de los Sarcomas y su dosis y tiempo de administración depende del tipo de neoplasia.

Estas drogas intervienen en la replicación actuando en diferentes niveles del DNA, con efectos en cada fase del ciclo celular.

Los principales mecanismos citotóxicos son:

- 1) Intercalarse con los ácidos nucleicos causando inhibición de la síntesis de DNA y RNA, así mismo pueden causar alteración en la topoisomerasa II
- 2) Unión a la membrana celular, alterando el transporte iónico normal.
- 3) Producir radicales libres de oxígeno.

Cardiotoxicidad.

Los antracíclicos son potentes agentes citotóxicos, sin embargo su empleo se ve limitado por sus efectos a nivel cardíaco. A pesar de múltiples estudios, el mecanismo preciso de la cardiotoxicidad, aun no es bien comprendido, sin embargo se sabe que involucra la formación de radicales libres, causando estrés oxidativo, las células cardíacas son más sensibles al daño por radicales libres, debido a su alto metabolismo oxidativo y sus pocas defensas antioxidantes, ya que la concentración de enzimas antioxidantes a nivel cardíaco es baja. ⁶

El daño miocárdico causado por la doxorubicina involucra a la apoptosis, este proceso de muerte celular programada parece ser iniciada por la formación de radicales libres. La homeostasis del calcio es considerado un mecanismo alternativo potencial, ya que el estrés oxidativo puede provocar alteración del transporte de calcio a nivel mitocondrial, causando daño en los tejidos, muerte celular y alteraciones en la contractilidad cardíaca.

Después de la administración de doxorubicina independientemente de la neoplasia, se ha observado elevación de los niveles cardíacos de troponina T, debido a daño en los miocitos por un mecanismo diferente al involucrado en la destrucción de las células tumorales. ⁷

El daño directo a la membrana lipídica parece ser responsable del daño indirecto a través de radicales libres de oxígeno que afecta el transporte de calcio y deprime la función miocárdica y la ausencia casi total de catalasa y superóxido dismutasa en el músculo cardíaco lo cual hace difícil disminuir la producción de radicales libres.

Evidencia reciente ha mostrado que la generación de radicales libres está mediada por los complejos doxorubicina-hierro; ⁸ La doxorubicina sufre un extenso metabolismo, el adriamicinol es uno de sus principales metabolitos con un amplio efecto sobre la bomba de calcio en el retículo sarcoplasmático, causando la toxicidad cardíaca.

La cardiotoxicidad en niños supervivientes de cáncer, se caracteriza por adelgazamiento de la pared del ventrículo izquierdo; la disminución de la masa cardíaca aumenta la post carga con disminución de la contractibilidad del ventrículo izquierdo, resulta en el desarrollo de cardiomiopatía e insuficiencia cardíaca.

La miocardiopatía inducida por estas drogas puede ir desde cambios subclínicos en la función cardíaca hasta falla cardíaca irreversible; se ha estimado que cerca del 60% de los niños tratados con antracíclicos, desarrollaron cardiotoxicidad. El riesgo de los efectos cardiotóxicos ocurre después de 15 años de tratamiento cuando se supera una dosis acumulada de 400mg/m².

En los últimos años la supervivencia a 5 años de los niños con cáncer ha aumentado de 30 a 70%, sin embargo la mortalidad es 11 veces mayor que la esperada debido a eventos cardíacos.

La dosis acumulada segura es aquella en la que el riesgo de falla cardíaca es del 5%. En 1973 se empleaban dosis de 600mg/m², las cuales se fueron disminuyendo de manera paulatina. A mediados de los setentas Minow et al ⁹ identificó pacientes con falla cardíaca a dosis menores de las empleadas en la época y recomendó limitar la dosis a 450mg/m²; series más recientes han demostrado un riesgo substancial de falla cardíaca con dosis entre 400 y 450 mg/m², recomendando limitar la dosis acumulada a 400mg/m².

La cardiotoxicidad por antracíclicos puede ser dividida en tres tipos de daño:

- 1) Aguda
- 2) Cardiomiopatía crónica progresiva de presentación temprana
- 3) Cardiomiopatía crónica progresiva de presentación tardía.

La **Cardiotoxicidad Aguda** es una depresión de la función miocárdica que ocurre inmediatamente después de la infusión de la droga o hasta dos semanas después de esta; se pueden presentar como cambios electrocardiográficos (arritmias, ectopia ventricular, cambios en el segmento ST o en la onda T), pericarditis, miocarditis o insuficiencia cardíaca fulminante. Este tipo de toxicidad se presenta sobre todo en pacientes que recibieron dosis únicas altas del fármaco y se presenta en menos del 1% de los pacientes pediátricos.

Estos cambios son usualmente transitorios y no asociados a la dosis acumulada. Los mecanismos específicos del daño cardíaco en pacientes con toxicidad temprana no es bien entendida y su tratamiento consiste en medidas de soporte.

La **Cardiotoxicidad Crónica Progresiva de Presentación Temprana**, es una depresión de la función miocárdica que ocurre durante el tratamiento o en el primer año después de este, la cual se relaciona con daño o muerte de los miocitos; se presenta desde 1.6 al 2.1% de los niños tratados con antracíclicos.

La **Cardiotoxicidad Crónica Progresiva de Presentación Tardía**, es una depresión de la función miocárdica que ocurre al menos un año después de finalizado el tratamiento; frecuentemente se ha observado años después del tratamiento presentando anomalías de la estructura y función cardíaca.

Prevención de la cardiotoxicidad.

La prevención de la cardiotoxicidad inducida por antracíclicos es importante en niños y adultos jóvenes, quienes tienen mayor posibilidad de supervivencia a largo plazo, por lo que el objetivo principal es minimizar la toxicidad cardíaca y maximizar la eficacia clínica. Para este fin los protocolos actuales han propuesto: limitar la dosis acumulada de antracíclicos, cambiar en el esquema de administración de los antracíclicos, desarrollar análogos menos cardiotoxicos y administrar agentes cardioprotectores que atenúen los efectos sobre el corazón.

Los pacientes menores son especialmente susceptibles a la cardiomiopatía inducida por antracíclicos, se han descrito algunos otros factores de riesgo, sin embargo la posibilidad de predecir que paciente desarrollaran cardiotoxicidad es limitada (Cuadro 6).¹⁰

Cuadro 6. Factores de riesgo asociados a cardiotoxicidad inducida por antracíclicos.

Factor de Riesgo	Cardiotoxicidad	Autor
Dosis acumulada	Dosis mayor de 400mg/m² se asocia con mayor riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva	Van Dalen et al, 2006. ¹¹
Edad	Se presenta mayor cardiotoxicidad con el empleo de antracíclicos en niños menores de tres años y ancianos.	Lipshultz et al, 1991 ¹² Hequet et al, 2004 ¹³
Raza	Se presenta mayor cardiotoxicidad en raza negra	Krischer et al, 1997 ¹⁴
Sexo	El sexo femenino se asocia con mayor cardiotoxicidad	Lipshultz et al, 1995 ¹⁵
Trisomía 21	Sx Down se asocia con mayor riesgo	Krischer et al, 1997 ¹⁴
Radiación mediastinal	Historia de radioterapia incrementa el riesgo de daño cardíaco inducido por antracíclicos	Pein et al, 2004 ¹⁶
Tipo de antracíclico	Preparaciones liposomales disminuyen el riesgo cardíaco	Theodoulou et al, 2004 ¹⁷
Pico de nivel sérico	Hay disminución de la cardiotoxicidad de doxorubicina administrada en infusión intravenosa continua en pacientes con cáncer de mama	Lega et al, 1982 ¹⁸

Se observa que los investigadores con la finalidad de determinar la aparición de cardiotoxicidad con el uso de diferentes esquemas de dosificación de antracíclicos en pacientes con cáncer, realizaron un metaanálisis con búsquedas en el registro Cochrane central de Ensayos controlados, MEDLINE (1966 hasta junio 2004) y en EMBASE (1980 hasta junio 2004), se seleccionaron los ensayos controlados aleatorios en los que se compararan diferentes esquemas de dosificación de antracíclicos en paciente con cáncer (niños y adultos), dos autores realizaron de forma independiente la selección de estudios, la evolución de la calidad y la extracción de datos, con inclusión de los efectos adversos. Se identificaron 6 ensayos clínicos aleatorios de variada calidad, que investigaron diferentes duraciones de infusión de antracíclicos (625 pacientes). El metaanálisis mostró una diferencia estadísticamente significativa más baja de insuficiencia cardíaca clínica en aquellos pacientes con infusión de quimioterapia en 6 horas o

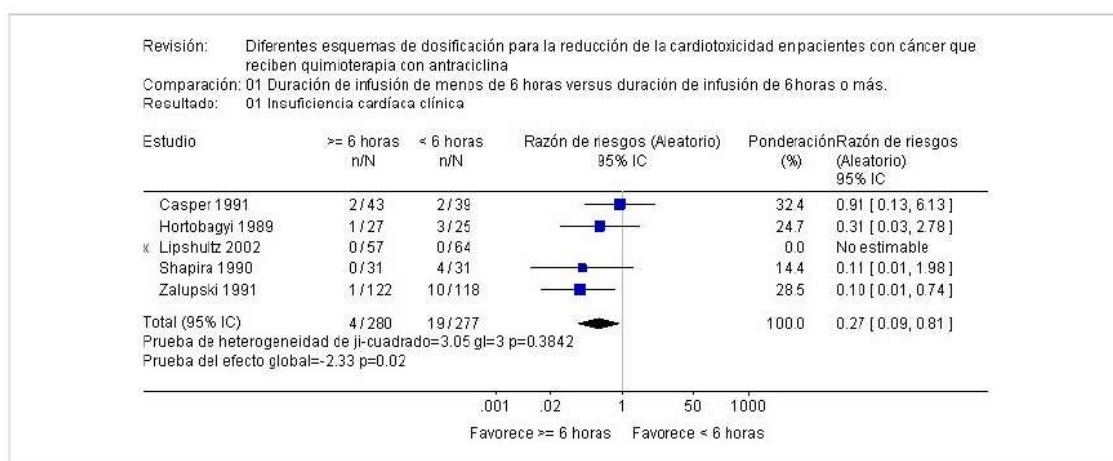
más, en comparación con una duración de infusión más corta, es decir, una duración máxima de una hora (RR=0.27; IC del 95%: 0.009 a 0.81; 5 estudios: 557 pacientes). En los estudios individuales la duración de infusión de 6 horas o más pareció reducir el riesgo de lesión cardíaca subclínica. No se halló ninguna diferencia estadísticamente significativa en la tasa de respuesta (RR= 0.83; IC del 95%: 0.45 a 1.54: 2 estudios; 292 pacientes). No se halló ninguna diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia general (RR= 1.42; IC del 95%: 0.61 a 3.30; 2 estudios; 322 pacientes), pero existió una heterogeneidad no explicada ($I^2 = 75\%$). (Cuadro 7 y 8). Los autores concluyeron que no se puede extraer conclusiones en relación a los efectos adversos y que se debe enfatizar que la mayoría de los pacientes incluidos en estos estudios fueron adultos con diferentes tumores sólidos; no se pudieron incluir niños con leucemia en los metaanálisis realizados, pero fueron incluidos en los resultados descriptivos de los estudios no agrupados.¹⁹

Cuadro 7. Duración de la infusión de antracíclicos.

Velocidad de infusión de Doxorrubicina menor o mayor de 6 horas.				
Resultado	Número de estudios	Número de pacientes	Método estadístico	Tamaño del efecto
Insuficiencia cardíaca clínica	5	557	Riesgo Relativo (efectos aleatorios) IC del 95%	0.27 (0.09, 0.81)
Insuficiencia cardíaca clínica y subclínica combinada (subclínica definida como > = 10% de disminución del FeVi)	1	82	Riesgo Relativo (efectos aleatorios) IC del 95%	0.78 (0.46, 1.26)
Insuficiencia cardíaca clínica y subclínica combinada (subclínica definida como > = 15% de disminución del FeVi)	1	52	Riesgo Relativo (efectos aleatorios) IC del 95%	0.31 (0.03, 2.79)
Insuficiencia cardíaca clínica y subclínica combinada (subclínica definida como > 20% de disminución del FeVi)	1	62	Riesgo Relativo (efectos aleatorios) IC del 95%	0.04 (0.00, 0.60)
Insuficiencia cardíaca clínica y subclínica combinada (subclínica definida como una disminución del FeVi)	1	240	Riesgo Relativo (efectos aleatorios) IC del 95%	0.36 (0.15, 0.90)
Tasa de respuesta	2	292	Riesgo Relativo	0.83 (0.45,

			(efectos aleatorios) IC del 95%	1.54)
Supervivencia General	2		Cociente de riesgo (efectos aleatorios) IC del 95%	1.42 (0.61, 3.30)

Cuadro 8. Infusión de 6 horas vs. Infusión mayor a 6 horas



En conclusión el metaanálisis mostró una tasa estadísticamente significativa más baja de insuficiencia cardíaca clínica con una duración de infusión de seis horas o más en comparación con una duración de infusión más corta (RR=0.27; IC del 95%: 0.09 a 0.81; P=0.02)

Dexrazoxane

El dexrazoxane es un cardioprotector sitio específico contra el efecto cardiotoxico inducido por los antracíclicos. Este complejo cataliza la formación de radicales hidroxilos que causan daño oxidativo en las células, su actividad cardioprotectora esta basada en el efecto quelante de los iones de hierro libres o unidos al antracíclico en el miocardio.

Después de la administración intravenosa su distribución en los tejidos es rápida, alcanzando un equilibrio en 2 a 4 hrs.

Lipshultz et al. Realizaron un estudio para evaluar el efecto del dexrazoxane en el daño cardiaco asociado a doxorubicina, en el cual aleatorizaron 101 niños con diagnóstico de leucemia aguda linfoblástica, que recibieron doxorubicina (30mgm² cada 3 semanas por 10 dosis) y 105 niños que recibieron dexrazoxane 300mgm² seguido inmediatamente después de doxorubicina, con una dosis total de 300mgm². En ambos grupos se determino troponina T de manera seriada (antes, durante y después del tratamiento). Evaluaron si tenían elevación >0.01ng/ml de troponina T el cual se presentó en 35% de los pacientes (55/158).

Los pacientes tratados solo con doxorubicina tuvieron una elevación de troponina T mayor que los que recibieron dexrazoxane y doxorubicina (50% vs. 21% P<0.001) y una elevación extrema (32% vs. 10%, P<0.001). (Cuadro 9). La supervivencia libre de evento a 2.5 años fue de 83% en ambos grupos (P=0.87

por la prueba de long rank). Concluyeron que el dexrazoxane previene y reduce el daño cardiaco reflejado en la elevación de la troponina T asociado al empleo de doxorubicina en niños con leucemia aguda linfoblástica sin compromiso en el efecto antileucémico de la droga.²⁰

Cuadro 9. Características de los pacientes		
Características	Doxorrubicina (N=101)	Doxorrubicina + Dexrazoxane (N=105)
Sexo		
Femenino	56	64
Masculino	45	41
Edad media al diagnóstico (años)	7.3	7.5
Doxorrubicina		
Dosis acumulada mgm2sc	300	300
Recibieron menos de la media de 300mg/m2 no/%	26/96 (27)	19/101 (19)
Muestras de Troponina T		
Mediana no/pacientes	15.0	15.1
Total de no. que pudo ser evaluado	1139	1238
No hubo diferencias significativas entre los dos grupos		

Doxorrubicina Pegilada Liposomal

La doxorubicina pegilada liposomal es una formulación reciente de doxorubicina encapsulada en liposomas cubiertos con polietilén glicol, la cual fue diseñada para aumentar la eficacia y disminuye la toxicidad de la doxorubicina convencional en los tejidos periféricos y a nivel cardiaco. El diámetro pequeño de los liposomas (100nm) y su persistencia en la circulación sanguínea permite que penetre en la vasculatura tumoral alterada y al espacio intersticial del tejido maligno. Una vez concentrada en el tejido tumoral los liposomas gradualmente se rompen con liberación de la doxorubicina en el tejido.²¹

Otra forma conocida para disminuir el efecto cardiotoxico es mediante la encapsulación de drogas antineoplásicas en liposomas parece aumentar sus efectos terapéuticos, sin embargo la recaptura de este tipo de formulaciones por el sistema reticuloendotelial puede limitar su utilidad. Estudios preclínicos han mostrado aumento en la acumulación de doxorubicina en tumores murinos tratados con preparaciones liposomales, resultando en un prolongado tiempo de circulación y por lo tanto la deposición preferencial de la droga en el tejido tumoral.²²

Estudios clínicos fase I han demostrado que la doxorubicina pegilada disminuye la inmunosupresión comparado con la doxorubicina convencional, así mismo también se ha observado disminución de la cardiotoxicidad. Fujisaka Y et al en 2006 realizaron un estudio fase 1 en pacientes adultos con tumores sólidos avanzados, a los cuales se les administró doxorubicina pegilada con intervalo de 4 semanas, escalando dosis de 30 a 60mgm2 con incrementos de 10mgm2 por curso. Se incluyeron 50 pacientes,

edades 49-69 años (mediana 56 años) con tumores sólidos avanzados. Las toxicidades no hematológicas más frecuentes fueron síndrome mano-pie, exantema y estomatitis. Las toxicidades hematológicas fueron mielosupresión especialmente leucopenia y neutropenia. El pico de concentración plasmática y el área bajo la curva de concentración por tiempo tuvo incrementos de manera proporcional a la dosis (Cuadro 10, Figura 3). Concluyendo que para estudios fase 2 en pacientes japoneses se emplearan dosis de 50mg/m².²³

Cuadro 10. Características farmacocinéticas.											
Dosis mg/m ²	No. Pacientes	C max (µg/ml)		ABC (µgh/ml)		t1/2 (h)		CL(ml/h/m ²)		Vd(l/m ²)	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
30	6	19.312	(2.502)	2512.7	(783.5)	89.50	(24.05)	13.14	(4.84)	1.569	(0.187)
40	3	25.605	(2.866)	3228.0	(789.6)	86.30	(14.72)	12.99	(3.70)	1.568	(9.174)
50	6	34.057	(3.293)	4663.3	(1061.8)	95.33	(25.32)	11.1'	(2.05)	1.471	(0.130)

Figura 3. Farmacocinética de la doxorrubicina.

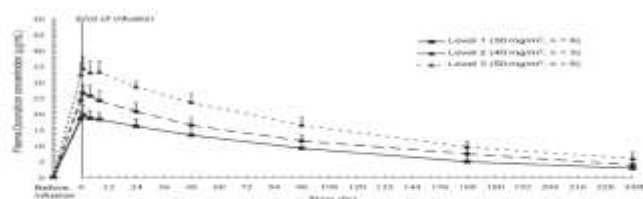


Figure 1. Mean plasma concentration-time curve for doxorubicin infused as PLD.

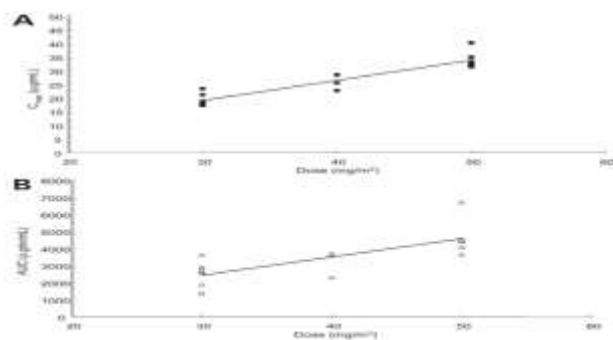


Figure 2. Relationships between (A) dose and C_{max} (r² = 0.861) and (B) dose and AUC (r² = 0.575) for doxorubicin infused as PLD.

Eng C et al realizaron un estudio fase 1 donde incluyeron pacientes con tumores sólidos avanzados que no hubieran recibido doxorrubicina. Los pacientes recibieron Paclitaxel (90mg/m² en la primera dosis escalando las dosis subsiguiente 135mg/m²), cisplatino (60mg/m²) y doxorrubicina pegilada liposomal a en dosis escaladas, administrada cada 21 días. Se incluyeron 23 pacientes, administraron un total de 73 ciclos. Se presentó neutropenia grado 4 después del primer ciclo en 2 de 8 pacientes cuando recibieron doxorrubicina pegilada a dosis de 30mg/m² y en 3 de 7 cuando la recibieron a dosis de 40mg/m². Dos pacientes más presentaron neutropenia grado 4 después del ciclo 2 y 5 (dosis de 40mg/m²). La disminución de la Fracción de eyección del ventrículo izquierdo después de 2 ciclos fue de 5% Concluyendo que se podía emplear esta combinación de medicamentos sin requerir soporte con factor estimulante de colonias de granulocitos.²⁴

Nielsen et al. En un estudio de cohorte con 28 pacientes con sarcoma determinaron la seguridad de la doxorubicina pegilada liposomal en combinación con ifosfamida en pacientes adultos con enfermedad avanzada o metastásica. Administraron doxorubicina a dosis de 30mg/m² (L1-4) o 40 mg/m² (L5) en infusión de 1 hora cada 3 semanas e ifosfamida con mesna, a dosis de (L1) 1.7, (L2) 2, (L3) 2.5 y (L4) 3 gr. 4 en L1, 8 en L2, 3 en L3, 6 en L4 y 7 en L5. La edad media fue de 60 años. No se observó toxicidad a dosis L1-4, 6 paciente presentaron toxicidad a dosis L5. No se observó eritrodisestesia palmo plantar mayor a grado. Dos pacientes tuvieron respuesta parcial y 13 enfermedad estable. La sobrevida global fue de 333 días y la sobrevida libre de progresión de 174 días. Concluyeron que era posible la combinación de doxorubicina pegilada e ifosfamida para pacientes con sarcomas avanzados, pudiendo administrar la ifosfamida a las mismas dosis que cuando se administran de manera independiente. Recomendaron la siguiente dosis doxorubicina pegilada 30mg/m² día 1 + Ifosfamida 3g/m² día 1-3 cada 3 semanas.²⁵

Halm U, et al emplearon doxorubicina pegilada liposomal para el tratamiento de pacientes con hepatocarcinoma avanzado, a quienes se administraron dosis de 30mg/m² cada tres semanas hasta la presencia de progresión; en 4 pacientes se reportó baja toxicidad por lo cual se escaló la dosis a 40mg/m². Se evaluó la respuesta en 16 pacientes, sin observar respuesta objetiva en ninguno de ellos; la supervivencia media fue de 140 días, 6 pacientes presentaron elevación de enzimas hepáticas, 5 toxicidad hematológica y 2 reacciones de hipersensibilidad. Los autores concluyeron que este medicamento no es efectivo en el tratamiento del carcinoma hepatocelular avanzado, con toxicidad limitada.²⁶

Di Lorenzo et al realizaron un estudio para valorar la eficacia y seguridad de la doxorubicina pegilada liposomal, 5- fluorouracilo (5FU) y ácido folínico (FA) en pacientes con carcinoma hepatocelular inoperable, donde se incluyeron 31 pacientes con dicha quimioterapia la cual se administraba cada 3 semanas hasta que existiera progresión o toxicidad intolerable.

La edad media fue de 65 años, 28 (90%) tenían serología positiva para Hepatitis C, 55 tenían una clasificación Child-Pugh B; Dos pacientes mostraron respuesta parcial y 16 enfermedad estable; con un seguimiento de 14 meses, el tiempo de progresión fue de 4 meses, no se presentó toxicidad grave y la sobrevida general fue de 9 meses, concluyendo así que este régimen de quimioterapia es bien tolerado.²⁷

También se han realizado estudios de farmacocinética de la doxorubicina pegilada liposomal (DPL) en pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado, donde se incluyeron 40 pacientes que recibieron DPL a 30mg/m² cada 3 semanas escalando hasta 45mg/m² a partir de un tercer curso o si la toxicidad era tolerable.

Se determinó el nivel sérico de doxorubicina en plasma mediante fluorometría y se reportó que 4 (10%) pacientes presentaron respuesta parcial; la duración media de la respuesta fue de 5.6 meses. El tiempo medio de progresión y supervivencia fueron de 2 y 3 meses respectivamente, 3 pacientes con cirrosis murieron de procesos infecciosos sin presentar neutropenia.

Los pacientes presentaron concentraciones séricas iniciales bajas, con grandes volúmenes de distribución y un aclaramiento más rápido que los pacientes con otras malignidades, sin embargo los parámetros farmacocinéticos no correlacionaron con la toxicidad o la respuesta, por lo cual los autores concluyen que la disponibilidad de la doxorubicina pegilada liposomal en pacientes con alteración hepática no se obstaculiza; pero no tiene mejor actividad comparada con la droga libre, y el riesgo de infección debe considerarse en pacientes con cirrosis.²⁸

Alexopoulos et al, realizaron un estudio en pacientes con cáncer de mama metastático empleando doxorubicina pegilada liposomal y docetaxel como tratamiento de primera línea. En el cual incluyeron 44 pacientes con un promedio de edad de 63 años a los cuales se les administró doxorubicina pegilada liposomal a dosis de 30mg/m² y docetaxel 75 mg/m² cada tres semanas por 6 ciclos y se observó respuesta en 64.3%; 6 (14.3%) pacientes presentaron respuesta completa, 21 (50%) pacientes respuesta parcial, 8 presentaron enfermedad estable y 7 enfermedad progresiva. Neutropenia mayor de grado 3 se presentó en 18.4% y neutropenia febril en 8%. La complicación de eritrodismestesia palmo plantar en 4 pacientes y no se presentaron muertes relacionadas al tratamiento; por lo cual los autores concluyeron que la combinación de doxorubicina pegilada liposomal y docataxel logra una buena respuesta con toxicidad limitada en el tratamiento de primera línea en estos pacientes.²⁹

Katsaros et al evaluaron la doxorubicina pegilada a dosis de 30mg/m² y vinorelbina a dosis de 30mg/m² cada 3 semanas por 6 ciclos, posterior al empleo de platino-paclitaxel en pacientes con cáncer de ovario recurrente. Se incluyeron 32 pacientes, en 10 pacientes se evaluó su farmacocinética; 30 pacientes, 37% presentaron respuesta completa y 10% enfermedad estable. La media de progresión y sobrevida global fue de 5.5 meses y 9 meses respectivamente, la toxicidad fue limitada. Los niveles plasmáticos fueron mayores cuando se administrando los medicamentos con la secuencia de doxorubicina pegilada liposomal-vinorelbina.³⁰

Otros estudios mostraron actividad tumoral a dosis de 40mg/m² administrados cada 3 a 4 semanas en pacientes con carcinomas de ovario avanzado.³¹

Pulini, et al. evaluaron la eficacia del uso de doxorubicina pegilada liposomal en pacientes con linfomas cutáneos de células T avanzados, a dosis de 20mg/m² cada cuatro semanas, observando respuesta completa en 84.2% para estadios I-IIA y 42.1% para estadios IIB-IV; 11% presentó toxicidad grado 3/4. La sobrevida global, libre de evento y libre de progresión fueron de 43, 18 y 19 meses respectivamente. Por lo que los autores concluyeron que la doxorubicina pegilada liposomal es efectiva y segura para el tratamiento de pacientes con linfomas cutáneos con múltiples recaídas.³²

Bafaloukos et al realizaron un estudio, en pacientes con diagnóstico de sarcoma de tejidos blandos donde evaluaron la eficacia y seguridad de la combinación de doxorubicina pegilada liposomal y paclitaxel como tratamiento de primera línea; se incluyeron 42 pacientes con enfermedad localmente avanzada o metastásica, de edad media de 54 años, y administraron doxorubicina pegilada liposomal 45mg/m² y paclitaxel 150mg/m² cada 28 días por un total de 6 cursos. La respuesta general fue del 16%, respuesta completa (2%), 6 (14%) pacientes con respuesta parcial y 14 pacientes (33%) presentaron enfermedad estable.

El seguimiento fue de 41.5 meses, donde el tiempo medio de progresión fue de 5.7 meses, con una supervivencia global de 13.2 meses.

Se presentaron toxicidades grado 3-4 incluyendo neutropenia (17%), anemia (15%), neurotoxicidad (5%), y eritrodismestesia palmo-plantar (9%). No se reportaron muertes relacionadas al tratamiento; finalmente los autores concluyen que la combinación de doxorubicina pegilada liposomal y paclitaxel es un régimen seguro y bien tolerado con modesta eficacia como tratamiento de primera línea en pacientes con sarcomas avanzados.³³

Judson et al realizaron un estudio clínico en el que se compararon la eficacia del uso de la doxorubicina pegilada liposomal vs. Doxorubicina convencional demostrando que su actividad era equivalente, reportando menor toxicidad hematológica, sin embargo no se realizó una comparación de la presencia de cardiotoxicidad.³⁴

Así mismo pacientes adultos que se han expuesto a dosis altas como 540 a 840 mg/m² no han desarrollado insuficiencia cardiaca congestiva aguda, lo que sugiere que es menos cardiotoxica que el esquema de base de doxorubicina convencional.³⁵

En paciente con cáncer de mama se realizó un estudio un estudio clínico aleatorio cuyo objetivo fue comparar la eficacia y la cardiotoxicidad de la doxorubicina pegilada liposomal vs. Doxorubicina convencional como primera línea de tratamiento, donde se aleatorizaron 509 pacientes en 2 grupos Grupo A: doxorubicina pegilada liposomal 50mg/m² cada 4 semanas y Grupo B: doxorubicina convencional 60mg/m² cada 3 semanas. La supervivencia libre de progresión fue 6.9 vs. 7.8 meses respectivamente a favor de la doxo pegilada (Figura 4).

El riesgo de cardiotoxicidad fue significativamente mayor con doxorubicina convencional OR= 3.16 (IC 95% 1.58-6.31; P<0.001).

La supervivencia general fue similar (21 y 22 meses respectivamente) (Figura 4). Las complicaciones secundarias como alopecia, nausea, vómito, y neutropenia se presentó con mayor frecuencia en pacientes con doxorubicina convencional; la eritrodiseestesia palmo-plantar (48% versus 2%), estomatitis (25% versus 15%) y mucositis (23% versus 13%) se asociaron más a doxorubicina pegilada liposomal.³⁶

Figura 4. Supervivencia libre de progresión y supervivencia global al comparar Doxorubicina pegilada vs. Convencional en pacientes con cáncer de mama.

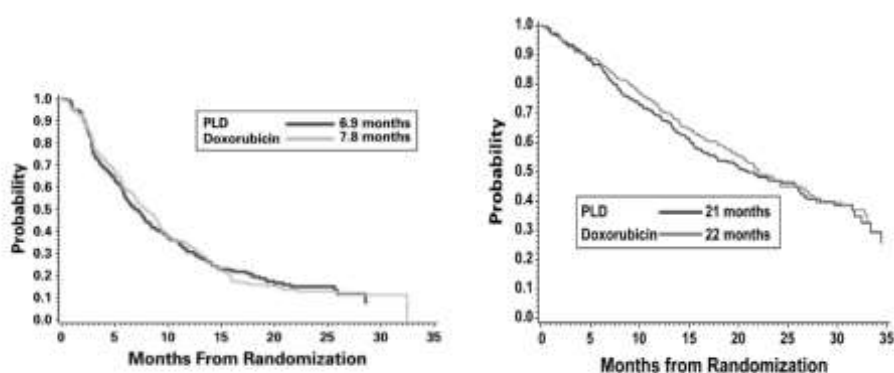


Figure 1. Progression-free survival [HR = 1.00 (95% CI for HR 0.82–1.22)].

Figure 4. Overall survival [HR = 0.94 (95% CI for HR 0.74–1.19)].

Marina et al, realizaron un estudio de farmacocinética de doxorubicina pegilada en niños con tumores sólidos refractarios que habían recibido antracíclicos a dosis <300mg/m². Los pacientes recibieron doxorubicina pegilada a dosis de 40mg/m² con intervalo de cada 4 semanas y se fue escalando la dosis con incrementos de 10mg/m²; el medicamento se administró en infusión de 1 a 4 horas. Los pacientes recibieron premedicación con dexametasona, ranitidina y difenhidramina 24 horas antes de la infusión y se obtuvieron muestras de sangre previo a la infusión, al finalizarla y 1, 2, 4,24 y 48 horas después de la infusión, para caracterizar la farmacocinética del medicamento.

Se incluyeron 22 niños de enero de 1997 a junio de 2000, con edades de 4-21 años. Solo 5 pacientes no habían recibido radioterapia. La dosis de doxorubicina pegilada liposomal se escaló hasta 70mg/m². La toxicidad limitada por dosis a 70mg/m² en 2 de 6 pacientes fue mucositis grado 3 durante el primer ciclo de quimioterapia. La eritrodiseestecia planto–palmar se presento en 6 pacientes; en 2 inició como grado 1 y progresó a grado 2 durante los cursos subsecuentes. El volumen estimado de distribución, aclaración y vida media de eliminación fue de 1.45litros/m², 0.03litros/h/m² y 36.4 horas respectivamente (Figura 5). La dosis máxima tolerada 60mg/m² cada 4 semanas. La toxicidad fue similar a la reportada en estudios en población adulta correspondiendo principalmente en mucositis. La eritrodiseestecia palmo-plantar se

presentó en 20% de los niños, sin embargo no fue severa como en población adulta. (Figura 5). El medicamento fue bien tolerado, sin embargo no hubo respuesta objetiva en este estudio, debido a que el 70% de los pacientes habían recibido previamente doxorubicina, sugiriendo resistencia cruzada entre la doxorubicina convencional y la doxorubicina pegilada liposomal, limitando su uso en pacientes previamente tratados. ³⁷

Figura 5. Farmacocinética y toxicidad de la Doxorubicina pegilada liposomal en niños.

Table 4 Statistics of Bayesian PK parameter estimates for pediatric patients

Parameter	Mean (CV%)	Range
K_{10} (h^{-1})	0.020 (28)	0.013–0.032
V_1 (liters/ m^2)	1.45 (19)	1.02–2.01
CL_1^a (liters/ $h \cdot m^2$)	0.03 (38)	0.02–0.05
Half-life ^b (h)	36.4 (27)	21.5–55.2

^a $CL_1 = K_{10} * V_1$.

^b Half-life = $0.693/K_{10}$.

Figura 6. Toxicidad grado 3 y 4 en pacientes que recibieron Doxorubicina Pegilada.

Table 5 Grade 3–4 toxicities by dose level during the first cycle of therapy in assessable patients treated with Doxil

Level (mg/m^2)	No.	Neutropenia (n/assessable)	Mucositis (n/assessable)	Infusion reactions (n/assessable)	PPE (n/assessable) ^a	Other skin reactions (n/assessable)
1 (40)	3 ^b	1/1	0/3	1/3 (grade 3)	0/3	0/3
2 (50)	3	0/3	0/3	1/3 (grade 3)	0/3 (grade 1, 2)	0/3
3 (60)	7 ^c	5/5 (4 grade 3, 1 grade 4)	1/7 (grade 3)	0/7	0/7 (grade 1, 2)	0/7
4 (70)	6	3/6 (1 grade 3, 2 grade 4)	2/6 (grade 3)	0/6	0/6 (grade 2)	0/6
Total	19	9/15	3/19	2/19	0/19	0/19
1 (50)	3 ^d	2/2 (1 grade 3, 1 grade 4)	1/2 (grade 3)	0/2	0/2	0/2
Total	22	11/17	4/21	2/21	0/21	0/21

^a Six patients had grade 1–2 PPE (not all during the first cycle).

^b Two patients unassessable for hematologic toxicity.

^c One patient did not have pharmacokinetics, so an extra patient was accrued at this dosage level.

^d One patient unassessable because he received concomitant radiotherapy.

En 2004 Muñoz et al describieron la eficacia y la toxicidad de la doxorubicina pegilada liposomal en 8 niños con sarcomas refractarios o recurrentes, cuya edad media fue de 14 años (5-17 años), todos habían recibido antracíclicos previamente.

El medicamento fue administrado a 50mg/m² diluido en 250 ml de solución glucosada al 5%, en infusión de 60 minutos cada 4 semanas. Tres pacientes recibieron 6 ciclos de tratamiento y el resto solo 1 a 4 ciclos por progresión de la enfermedad.

Se observó una adecuada tolerancia, no se presentaron reacciones durante la infusión. La única reacción adversa durante la administración de 29 ciclos fue un caso de eritrodisestecia palmo-plantar que resolvió de manera espontánea, no se presentaron efectos adversos cardiacos; en 3 de los pacientes por lo que recibieron un total de 6 ciclos, presentaron remisión completa de la enfermedad, con progresión después de 5, 10 y 34 meses. En los 5 pacientes restantes no se observó respuesta. No se observó resistencia cruzada con la doxorubicina convencional. ³⁸

Wagner en 2008 realizó un estudio retrospectivo para analizar la eficacia en la reducción tumoral de la combinación doxorubicina pegilada liposomal y topotecan vía oral en 8 niños con tumores de sistema nervioso central de alto grado con recaída.

La doxorubicina se administró a dosis de 30-40 mg/m² en infusión de 4 horas cada 4 semanas y el topotecan a 0.6mg/m². La toxicidad después de tres ciclos fue la siguiente: toxicidad hematológica grado IV (n =3), grado III (n=2), mucositis grado III (n=1), infección grado III (n=2), diarrea grado III (n=1), y dermatitis grado II (n=1). Cuatro pacientes presentaron enfermedad estable por 9, 23, 24 y 48 semanas (Cuadro 11).³⁹

Cuadro 11. Toxicidad y respuesta de la doxorubicina pegilada liposomal.

Table 4 Toxicity and response by cumulative dosage of pegylated liposomal doxorubicin

Patient	Histologic category	Cumulative dosage (mg/m ²)	Tumor site	Maximum toxicity during treatment ^a						Response	Duration of best response
				Hematotoxicity	Stomatitis/Dermatitis	Diarrhea/Vomiting	Hand-Foot Syndrome	Infection	Cardiotoxicity		
3	GBM	210	Cortex	II	0/0	0/0	0	0	0	SD	23 w
8	Pons	200	Pons	IV	II/0	0/1	0	I	0	SD	>48 w
6 ^b	GBM	120	Cortex	III	II/0	I/0	0	0	0	PD	8
5	GBM	120	Cortex	III	III/0	0/II	0	III	0	SD	9
1	Pons	115	Pons	IV	I/II	III/I	0	I	0	SD	>24 w
7	PC	90	Supratentorial	II	II/I	0/1	I	0	0	PD	2
4	GBM	80	Cortex	II	I/n.i.	0/II	0	I	0	PD	4
2	GBM	40	Thalamus	IV	I/0	0/1	0	III	0	PD	7

GBM: glioblastoma multiforme; SD: stable disease; PD: progressive disease; PC: plexus carcinoma; n.i.: no information available

^a According to the Common Toxicity Criteria of the National Cancer Institute, version 2.0

^b Glioblastoma as a secondary malignancy after acute lymphocytic leukemia

Efectos adversos de la doxorubicina pegilada liposomal

En los estudios que se han realizado hasta la fecha se ha observado que los efectos adversos que se presentan con el empleo de la DPL son principalmente a nivel hematológico, piel y mucosas, la cual se clasifica en los siguientes grados para su evaluación (Cuadro 12,13).

Cuadro 12. Toxicidad hematológica.

Toxicidad	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Hematológica					
Leucocitos (x10 ³ /L)	4	3.0 – 3.9	2.0 - 2.9	1.0 - 1.9	< 1.0
Neutrófilos totales (x10 ³ /L)	< 2	2.0-1.5	1.0 – 1.5	0.5 – 1.0	< 0.5
Plaquetas (x10 ³ /L)	> 100	75 -100	50 – 74.9	25 – 49.9	<25
Hemoglobina (g/dl)	> 10.5	10 – 10.49	8.0 – 9.9	6.5 – 7.9	< 6.5

Cuadro 13. Toxicidad en mucosas

Mucositis	
Grado 1	Presencia de eritema sin úlceras, no impide la alimentación.
Grado 2	Presencia de úlceras lineales no confluentes. No impide la alimentación.
Grado 3	Presencia de úlceras confluentes. Impide de manera moderada la alimentación.
Grado 4	Presencia de necrosis. El paciente requiere de nutrición parenteral.

La eritrodisestesia palmo-plantar (EPP), también se conoce como síndrome mano-pie, es una reacción asociada a la aplicación de ciertos agentes de quimioterapia. La incidencia de EPP es mayor con doxorubicina pegilada liposomal que con doxorubicina convencional; comúnmente se presentan disestecias, dolor de las manos y los pies; aparece de 2 a 12 días después de la administración de la quimioterapia.

Los síntomas pueden progresar en 3 a 4 días en un edema simétrico, eritema de las palmas y las plantas; hay placas eritematosas con parches violáceos y edematosos, usualmente resuelve en 1 a 2 semanas.

En casos severos se presenta descamación, ulceración y necrosis epidérmica; una biopsia demuestra marcada hiperqueratosis y paraqueratosis en el estrato corneo de la epidermis y espongiosis con numerosas células picnóticas sin presencia de linfocitos en el estrato de malpighi. La capa basal muestra áreas focales de vacuolización y un infiltrado perivascular de linfocitos con depósitos de melanina. Los grados de la eritrodisestecia plamo-plantar son: ⁴⁰

Cuadro 14. Eritrodisestecia plamo-plantar.

Eritrodisestecia plamo-plantar.	
Grado 1	Eritema, edema o descamación que no intervienen con las actividades diarias
Grado 2	Eritema, descamación o edema que interfiere pero no disminuye las actividades físicas normales, con pequeñas ulceraciones menores de 2 cm de diámetro.
Grado 3	Ulceraciones o edema que interfieren con la deambulacion o las actividades diarias, impide el uso de ropa regularmente
Grado 4	Complicaciones infecciosas locales o difusas, secundarias a las ulceraciones que requieren hospitalización.

El tratamiento consiste en la administración de Piridoxina.

*** PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los sarcomas en edad pediátrica es una patología rara con una incidencia baja de 4.6 a 8.7 casos por millón de niños; en los últimos años la supervivencia de estos pacientes ha aumentando considerablemente logrando hasta 70% supervivencia libre de enfermedad a 5 años gracias a los esquemas de quimioterapia; sin embargo se ha reportado que desde el 1 al 65% desarrolla toxicidad cardiaca secundario a los efectos colaterales del tratamiento con doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane lo cual afecta en gran medida la calidad de vida de estos pacientes.

Esto ha motivado que los investigadores hayan diseñado nuevos esquemas terapéuticos, entre ellos el uso de antracíclicos con tamaño molecular menor (doxorubicina pegilada liposomal), con la finalidad de concentrar la mayor cantidad del fármaco en la masa tumoral y reducir al máximo los efectos colaterales de toxicidad cardiaca como son: Insuficiencia Cardiaca, dilatación ventricular entre otros; sin embargo hasta este momento solo se ha reportado que disminuye de manera significativa los efectos tóxicos generales en el paciente como son: aplasia medular, lesión en mucosas y renales en un tamaño de muestra reducido; motivo por el cual se pretende comparar la eficacia de dicho tratamiento con respecto al tratamiento convencional y determinar su seguridad lo cual nos permitiría generar nuevos esquemas de tratamiento que limiten las complicaciones, mejoren la calidad y condiciones de vida de nuestros pacientes, reduciendo costos de atención hospitalaria.

*** JUSTIFICACIÓN:**

Se han buscado diferentes alternativas de tratamiento para los sarcomas a lo largo del tiempo con la finalidad de disminuir los efectos tóxicos de la quimioterapia y mejorar la eficacia en la reducción y eliminación de la carga tumoral en los pacientes con dicha patología, sin embargo existe poca evidencia que demuestre que tratamiento es el más eficaz y seguro, debido a que los estudios que se han realizado solo analizan la supervivencia a corto plazo, y los efectos tóxicos generales, sin olvidar que contaron con un tamaño de muestra pequeño en población adulta.

Nuestro servicio por ser un centro de referencia nacional de pacientes oncológicos pediátricos del país cuenta aproximadamente con una tasa de ingreso anual de 35 pacientes por dicha patología a nuestro servicio, lo cual favorece el desarrollo de un ensayo clínico con el que se podría generar la evidencia suficiente y de esta manera proponer nuevos esquemas terapéuticos con la finalidad de mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes, reducir el número de internamientos secundarios a las complicaciones y por lo tanto disminuir en el costo de atención hospitalaria.

*** PREGUNTAS DE INVESTIGACION:**

1. ¿El tratamiento con doxorubicina pegilada liposomal es igual de eficaz para la reducción de la masa tumoral en los pacientes pediátricos con sarcoma en comparación con el esquema de quimioterapia utilizado con doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane en el servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría en el periodo de Marzo de 2010 a Febrero 2013?
2. ¿El tratamiento con doxorubicina pegilada liposomal es el esquema de quimioterapia más seguro a nivel cardiaco en los pacientes pediátricos con sarcoma en comparación con la quimioterapia utilizada con doxorubicina convencional combinada más dexrazoxane en el servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría en el periodo de Marzo de 2010 a Febrero 2013?
3. ¿El tratamiento con doxorubicina pegilada liposomal es un esquema de quimioterapia igual de eficaz para la supervivencia libre de evento y supervivencia global en los pacientes pediátricos con sarcoma en comparación con el esquema de quimioterapia con doxorubicina convencional combinada más dexrazoxane en el servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría en el periodo de Marzo de 2010 a Febrero 2013?

*** HIPOTESIS:**

1. El tratamiento con doxorubicina pegilada liposomal y el esquema de quimioterapia con doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane serán igual de eficaces para la reducción del 90% de la masa tumoral en los pacientes pediátricos con sarcoma en el Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría en el periodo de Marzo de 2010 a Febrero 2013.
2. El tratamiento con doxorubicina pegilada liposomal será el esquema de quimioterapia 50% más seguro a nivel cardiaco en los pacientes pediátricos con sarcoma en comparación con el esquema de quimioterapia con doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane en el Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría en el periodo de Marzo de 2010 a Febrero 2013.
3. El tratamiento con doxorubicina pegilada liposomal y el esquema de quimioterapia con doxorubicina convencional con dexrazoxane serán igual de eficaces para la sobrevida libre de evento y supervivencia global en los pacientes pediátricos con sarcoma atendidos en el Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría en el periodo de Marzo de 2010 a Febrero 2013.

*** OBJETIVOS GENERALES:**

1. Comparar la eficacia con base a la reducción de la masa tumoral entre la administración de los 2 esquemas de tratamiento quimioterápico: doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada más dexrazoxane en los pacientes pediátricos con sarcoma.
2. Evaluar y comparar la seguridad a nivel cardiaco con base a parámetros bioquímicos y de gabinete (EKG, troponina T, Función ventricular) entre los 2 esquemas de tratamiento quimioterápico: doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane en los pacientes pediátricos con sarcoma.

*** OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1. Comparar la eficacia con base a la supervivencia libre de evento y supervivencia global entre la administración de los 2 esquemas de tratamiento quimioterápico: doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane en los pacientes pediátricos con sarcoma.

*** CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:**

Experimental: Ensayo clínico controlado aleatorizado ciego, concurrente, fase III

*** MATERIAL Y METODOS:**

- POBLACIÓN OBJETIVO:

Pacientes pediátricos con diagnóstico reciente de sarcoma (rabdomyosarcoma, sarcomas no rabdo de alto grado, osteosarcoma y sarcoma de Ewing), internados en el servicio de Oncología de un hospital de 3er nivel de atención

- **POBLACIÓN ELEGIBLE:**

Pacientes pediátricos con diagnóstico reciente de sarcoma (rabdiosarcoma, sarcomas no rabdo de alto grado, osteosarcoma y sarcoma de Ewing), internados en el servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría entre el periodo comprendido del 01 marzo del 2010 al 28 febrero 2013.

- **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Pacientes de cualquier sexo con edad menor a los 18 años con diagnóstico reciente de rabdiosarcoma, sarcomas no rabdiosarcoma de alto grado, osteosarcoma o sarcoma de Ewing
- Pacientes hospitalizados en el servicio de Oncología del INP.
- Pacientes que previo al estudio no hayan recibido tratamiento con quimioterapia o radioterapia.
- Pacientes con diagnóstico de segunda neoplasia que no hayan recibido tratamiento con antracíclicos ni radioterapia.
- Ecocardiograma con : fracción de eyección > 50% y fracción de acortamiento > 27%
- EKG de 12 derivaciones sin alteraciones patológicas (arritmias, bloqueos, hipertrofia o dilatación)
- Biometría Hemática con: neutrófilos totales > 1000 células/uL, cuenta plaquetaria > 100 000 células/uL, y hemoglobina > 10 g/dl.
- Depuración de creatinina : > 50 ml/min
- Bilirrubinas totales : < 1.5 mg/dl
- Concentración de ALT < 90 IU/L, AST < 100IU/L, GGT <70IU/L
- Estudios de extensión completa (Tomografía axial computada, TAC de Pulmón, Resonancia Magnética, Gamagrama óseo y biopsia de médula ósea) dependiendo de cada tumor (rabdiosarcoma, sarcomas no rabdiosarcoma de alto grado, osteosarcoma y sarcoma de Ewing)
- Firma de consentimiento y/o asentimiento informado.

- **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes que padezcan cardiopatías adquiridas o congénitas diagnosticado previo al inicio del estudio. (Comunicación interauricular, Comunicación interventricular, Persistencia del conducto arterioso, canal AV., valvulopatías, Hipertensión pulmonar, cardiomegalia)
- Pacientes con Insuficiencia renal.
- Pacientes con error innato del metabolismo
- Pacientes con Síndrome de Down

- **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Pacientes que fallezcan antes de la primera evaluación (antes de las primeras 6 semanas de tratamiento).
- Pacientes transferidos a otra unidad hospitalaria
- Pacientes que solicitan alta voluntaria
- Pacientes con abandono al tratamiento antes de la primera evaluación
- Pacientes con reacción alérgica al tratamiento de quimioterapia.
- Pacientes que desarrollen insuficiencia cardiaca irreversible.
- Pacientes que desarrollen insuficiencia renal irreversible.
- Pacientes que desarrollen insuficiencia hepática irreversible.

Estos pacientes serán eliminados de la maniobra para asegurar la salud del paciente; pero serán analizados por intención a tratar.

* VARIABLES DE ESTUDIO

Dependientes:

- De Eficacia

Respuesta al tratamiento

1. **Respuesta completa:** Sin presencia de tumor
2. **Muy buena respuesta parcial:** Reducción del tamaño tumoral entre 90-99%. Sin presencia de lesiones nuevas
3. **Respuesta parcial:** Reducción del tamaño tumoral > 50 y $< 90\%$, sin presencia de nuevas lesiones
4. **Respuesta Mixta:** Sin lesiones nuevas, reducción mayor o menor del 50% en algunas lesiones, pero aumento menor del 25% en lesiones existentes
5. **Sin respuesta:** Sin nuevas lesiones, $< 50\%$ de reducción, pero menos de 25% de aumento en lesiones existentes
6. **Progresión tumoral:** Cualquier lesión nueva o aumento $> 25\%$ en cualquier lesión pre-existente.

- De Seguridad :

Parámetros Clínicos:

Cardiacos

EKG: Sin presencia de arritmias de cualquier índole, bloqueos o cualquier característica patológica.

Ecocardiograma: Sin alteración morfológica o estructural, con fracción de eyección de ventrículo izquierdo mayor de 50%.

Troponina T: Concentración sérica menor a 0.01 ng/ml

Dermatológicos

Superficie planto-palmar: Sin presencia de eritema, edema, descamación o ulceración en palmas y plantas.

Signos y Síntomas

Nauseas: Sin presencia de dicha sintomatología

Vomito: Frecuencia menor de 2 vómitos al día

Fiebre: Temperatura menor a 38° Centígrados

Parámetros Bioquímicos:

Bimetría Hemática:

- **Leucocitos:** $>$ de $4 \times 10^3/L$
- **Neutrófilos:** $>$ $2 \times 10^3/L$
- **Hemoglobina:** $>$ 10.5 g/dl
- **Plaquetas:** $>$ $100 \times 10^3/L$

Pruebas de función hepáticas:

- **Aspartato Aminotransferasa (AST):** 10-40 IU/L
- **Alanino Aminotransferasa (ALT):** 10-30 IU/L

- **Gama Glutamil Transferasa (GGT):** 14-23 IU/L
- **Bilirrubina Total (BT):** 0.3-2 mg/dl

Pruebas de función renal:

- **Creatinina sérica:** 0.2 a 1 mg/dl
- **Depuración de Creatinina:** 50-150ml/min

Independientes

- Sexo
- Edad
- Superficie Corporal
- Tipo de sarcoma

Maniobra (2 brazos):

Tratamiento A: Administración de doxorubicina pegilada liposomal con intervalo de 21 días con una dosis inicial de 40mg/m² con aumento de 10mg/m² por curso, hasta una dosis máxima de 60mg/m².

Tratamiento B: Administración de doxorubicina convencional con cardioxane (20:1) cada 21 días, a dosis de entre 45 a 90 mgm², dependiendo del tipo de neoplasia.

La combinación de quimioterapia para el grupo A o B dependerá del protocolo Nacional al cual sea asignado el paciente por su diagnóstico y estadio.

El esquema de quimioterapia no puede ser enmascarado, debido a que la forma de administración presenta diferentes cantidades de volumen para ser infundidos, por lo cual tanto la enfermera como el observador que aplica la maniobra identifican el fármaco administrado; sin embargo los observadores que permanecen ciegos son : el cardiólogo, el radiólogo y el tercer observador.

- *Tiempo de estudio:* 01 marzo del 2010 al 28 febrero 2013.

*** DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES:**

Variable	Definición	Categoría	Escala	Unidad Medición
Sexo	Genero biológico del paciente	Cualitativa Nominal dicotómica	-	Masculino / femenino
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo	Cuantitativa discreta	calendario	Meses
Superficie Corporal	Es la medida antropométrica o cálculo de la superficie del cuerpo humano	Cuantitativa continua	= peso + 7 / peso - 10 para mayores de 10 Kg. = peso x 4 +9 /90 para menores de 10 Kg.	Metro cuadrado de superficie corporal
Nauseas	Sensación que indica la proximidad del vómito y esfuerzos que acompañan a la necesidad de vomitar	Cualitativa nominal dicotómica	-	Ausente / Presente
Vomito	Expulsión violenta y espasmódica del	Cualitativa nominal	-	Ausente / Presente

	contenido del estómago a través de la boca	dicotómica		
Fiebre	Aumento en la temperatura corporal por encima de 38° centígrados	Cualitativa nominal dicotómica	Termómetro	Ausente / Presente
Sarcoma	Neoplasia maligna que se origina en un tejido conjuntivo; se originan del tejido mesenquimal, poseen poco tejido conectivo y son de aspecto carnoso	Cualitativa nominal politémica		<ul style="list-style-type: none"> • Rbdomiosarcoma • sarcomas no rabdo de alto grado • osteosarcoma • sarcoma de Ewing
Quimioterapia	Fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas que tienen como función el impedir la reproducción de las células cancerosas.	Cualitativa nominal dicotómica	Esquema nacional de salud	1.- doxorubicina pegilada liposomal 2.- doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane
Reducción tumoral	Disminución del tamaño de la masa tumoral comparado por TAC	Cuantitativa continua	TAC , IRM, gamagrama óseo comparativa entre la masa tumoral inicial y los seguimientos; cuyo diámetro mayor en cm corresponderá al 100% y se medirá la reducción en cm de dicho diámetro en los estudios de imagen subsec.	porcentual
Eficacia	Reducción del tamaño tumoral del 90%, Sin presencia de lesiones nuevas	Cuantitativa continua	TAC, IRM, gamagrama óseo comparativa entre la masa tumoral inicial y los seguimientos	porcentual
Seguridad	La ausencia de complicaciones secundarias a la administración del esquema de quimioterapia en cualquiera de sus variantes; encontrándose en el intervalo normal	Cualitativa nominal dicotómica	Constructo : Clínicos (cardíaca, dermatológica) Signos y Síntomas (nausea, vomito, fiebre) Bioquímicos (BH, PFH, PFR)	Ausente / Presente
Toxicidad	Presencia de efectos secundarios a la administración de la quimioterapia a nivel sistémico que pueden comprometer la vida del paciente.	Cualitativa nominal dicotómica	Constructo : Clínicos (cardíaca, dermatológica) Signos y Síntomas (nausea, vomito, fiebre) Bioquímicos (BH, PFH, PFR)	Ausente / Presente
Cardiotoxicidad	Presencia de efectos cardíacos secundarios a la administración de la quimioterapia a nivel sistémico que pueden comprometer la vida del	Cualitativa nominal dicotómica	a) Alteraciones en el Electrocardiograma: Presencia de arritmias, bloqueos o cualquier anomalía en el electrocardiograma	Ausente / Presente

	paciente.		(Cardiógrafo PageWriter XII de Hewlett Packard modelo HP M1700A)	
			b) Alteraciones en el Ecocardiograma Disminución del 20% de la Fracción basal de eyección del ventrículo izquierdo (Equipo HP Sonos 5500)	
			c) Elevación de Troponina T Definición: Elevación de la concentración sérica mayor a 0.01 ng/ml.(Autoanal.)	
Cardiotoxicidad aguda	Se considera como la presencia de alteraciones electrocardiográficas, o ecocardiográficas, ocurridas durante el tratamiento con doxorubicina, no atribuibles a otras causas. Así mismo se considerará cardiotoxicidad si hay una disminución de la FeVi del 20% de la basal o si esta es menor del 50%, o FA menor del 30% o presencia clínica de insuficiencia cardiaca congestiva, a los 6 meses y al año de seguimiento.	Cualitativa nominal dicotómica	Ecocardiograma : Disminución de la Fracción de eyección del ventrículo izquierdo > 20% de la fracción con respecto a la basal. Disminución en la fracción de acortamiento >20%. EKG : Presencia de arritmias Troponina T : elevación > 0.01 ng/ml	Ausente / Presente
Cardiotoxicidad crónica	Se considerará cardiotoxicidad si hay una disminución de la FeVi del 20% de la basal o si esta es menor del 50%, o FA menor del 30% o presencia clínica de insuficiencia cardiaca congestiva, a los 6 meses y al año de seguimiento.	Cualitativa nominal dicotómica	Ecocardiograma : Disminución de la Fracción de eyección del ventrículo izquierdo > 20% de la fracción con respecto a la basal. Disminución en la fracción de acortamiento >20%. EKG : Presencia de arritmias Troponina T : elevación > 0.01 ng/ml	Ausente / Presente
Supervivencia libre de evento	Periodo transcurrido en meses desde el diagnóstico hasta la fecha de recaída	Cuantitativa discreta	Calendario	meses
Supervivencia global	Periodo transcurrido en meses desde el diagnóstico hasta la última cita o muerte	Cuantitativa discreta	Calendario	Meses
Seguridad cardiaca	Ausencia de efectos cardiacos secundarios a la	Cualitativa nominal	a) Ausencia de arritmias, bloqueo o	Ausente / Presente

<p>administración de la quimioterapia a nivel sistémico que pueden comprometer la vida del paciente.</p>	<p>dicotómica</p>	<p>cualquier anomalía en el EKG. (Cardiógrafo PageWriter XII de Hewlett Packard modelo HP M1700A)</p> <p>b) Fracción de eyección del ventrículo izquierdo sin disminución > del 20% con respecto a la basal medida por Ecocardiograma (Equipo HP Sonos 5500)</p> <p>c) Elevación de Troponina T no mayor a 0.01 ng/ml (Autoanalizador)</p>
--	-------------------	---

Constructo de Seguridad:

1.- Parámetros Clínicos normales:

Cardiacos

EKG: De 12 derivaciones, Ausencia de arritmias y bloqueo de cualquier índole, Cardiógrafo PageWriter XII de Hewlett Packard modelo HP M1700A

Ecocardiograma: 5500 Ausencia de alteraciones morfológicas o estructurales; y con fracción de eyección de ventrículo izquierdo mayor de 50%; dicha evaluada por Cardiólogo pediatra y Ecocardiograma Equipo HP Sonos

Troponina T: Concentración sérica menor de 0.01 ng/ml

Dermatológicos

Superficie planto-palmar: Ausencia de lesiones eritematosa, edema, descamación o ulceración en palmas y plantas, evaluado por Oncólogo y Dermatólogo pediatra; evaluada por grados (1 al 4)

Ausencia de Signos y Síntomas

Nauseas : sin presencia de dicha sintomatología posterior a la administración del esquema de quimioterapia, evaluado por oncólogo pediatra.

Vomito : Frecuencia menor de 2 vómitos al día posterior a la administración del esquema de quimioterapia, evaluado por oncólogo pediatra.

Fiebre : Temperatura menor a 38° Centígrados, medido con termómetro de mercurio.

Parámetros Bioquímicos:

Biometría Hemática:

- **Leucocitos:** > de $4 \times 10^3/L$
- **Neutrófilos:** > $2 \times 10^3/L$
- **Hemoglobina:** > 10.5 g/dl
- **Plaquetas:** > $100 \times 10^3/L$

Pruebas de función hepáticas:

- **Aspartato Aminotransferasa (AST):** 10-40 IU/L
- **Alanino Aminotransferasa (ALT):** 10-30 IU/L
- **Gama Glutamil Transferasa (GGT):** 14-23 IU/L
- **Bilirrubina Total (BT):** 0.3-2 mg/dl

Pruebas de función renal:

- **Creatinina sérica:** 0.2 a 1 mg/dl
- **Depuración de Creatinina:** 50-150ml/min

* DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

1) Cuando un paciente con sospecha diagnóstica de Sarcoma sea referido al servicio de oncología, este se evaluará clínicamente y se iniciará el abordaje diagnóstico estándar de acuerdo al tipo de neoplasia sospechada en el paciente el cual consiste en:

Osteosarcoma: Resonancia magnética o Tomografía computada del tumor primario, Tomografía computada de pulmón, Gamagrama óseo, toma de biopsia del primario.

Rabdomiosarcoma: Resonancia magnética o Tomografía computada del tumor primario, Tomografía computada de pulmón, Gamagrama óseo, biopsia bilateral de médula ósea, toma de biopsia del primario.

Sarcomas no Rabdomiosarcomas: Resonancia magnética o Tomografía computada del tumor primario, Tomografía computada de pulmón, Gamagrama óseo, toma de biopsia del primario.

Sarcoma de Ewing: Resonancia magnética o Tomografía computada del tumor primario, Tomografía computada de pulmón, Gamagrama óseo, biopsia bilateral de médula ósea, toma de biopsia del primario.

2) De acuerdo a los criterios de inclusión se elegirán a los pacientes a participar en el estudio contando con la confirmación histopatológica del diagnóstico de sarcoma.

3) Se solicitará la firma de consentimiento informado a los familiares y según sea el caso asentimiento bajo información. (Consentimiento informado se les solicitará al padre o padres responsables del paciente o tutor o tutores, dependiendo de las condiciones; mientras que el asentimiento informado se solicitará al paciente dependiendo de la edad que presente), donde se les dará a conocer los beneficios, complicaciones y efectos adversos que se presenten y que podría contraer el paciente. Y la posibilidad de supervivencia de acuerdo al diagnóstico y etapa de la neoplasia. (Anexo 1)

En caso de que los familiares prefirieran que su paciente sea manejado fuera del protocolo, se accederá a dicha petición y el paciente será excluido del estudio y recibirá tratamiento en base a los protocolos nacionales establecidos y empleados en el servicio de Oncología.

4) Se asignarán los pacientes a la rama de tratamiento de acuerdo a una tabla de números aleatorios, dividida por bloques balanceados y dicha elección se realizará, dependiendo del número obtenido de un sobre cerrado; esto es con la finalidad es de evitar que por azar la población al inicio del estudio, se acumule la mayor cantidad de casos en algún grupo específico, impidiendo con esto su análisis estadístico. (Anexo 2)

Administración de la Doxorrubicina

Grupo 1 Doxorrubicina + dexrazoxane. La dosis depende del protocolo establecido para cada tipo de sarcoma, se administra en infusión de 24 horas, siendo necesaria la colocación de un catéter puerto a permanencia. La droga se diluye en solución glucosada al 5% a 400mlm². El dexrazoxane se administra 30 minutos previos a la administración de doxorrubicina diluido con solución glucosada al 5% con una concentración de 200mlm². Las dosis totales acumuladas dependen del tipo de sarcoma sin embargo el límite es una dosis de 400mgm².

Grupo 2 Doxorrubicina pegilada liposomal. El paciente requiere premedicación con Ranitidina 3mgm², Dexametasona 0.3mgm² y difenhidramina 24 hrs previo al inicio de la quimioterapia.

La doxorrubicina pegilada liposomal se administra diluida en solución glucosada al 5% a 400mlm², el tiempo de infusión es de 3 hr, requiriendo la colocación de un catéter puerto. Las dosis equivalentes con la doxorrubicina convencional se han establecido en 40 a 60mgm² y se requiere escalar la dosis en cada curso iniciando en 40mgm² y aumentando 10mgm² por curso hasta la dosis máxima tolerable de 60mgm². La dosis total acumulada no rebasara más de 400mgm²

La maniobra será aplicada bajo indicación y vigilancia del observador Oncólogo pediatra, el cual no estará cegado a dicha intervención debido a que la forma de administración de cada esquema varía en cantidad de volumen y forma de aplicación por lo cual no puede ser enmascarado.

Evaluación y seguimiento

5) Para el seguimiento y evaluar la eficacia y seguridad se realizará lo siguiente:

Previo al inicio de quimioterapia se realizaran los siguientes estudios:

a) Valoración Clínica

- Pruebas de funcionamiento hepático que incluyan Bilirrubinas, AST, ALT, GGT
- Pruebas de funcionamiento renal que incluyan Creatinina y depuración de creatinina y/o gamagrama renal
- Biometría hemática completa
- Estudios de gabinete TAC, IRM

Toma de las muestras: Por veno-punción periférica con técnica de asepsia y antisepsia se extraerá 3ml de sangre en tubo con anticoagulante para la realización de Biometría Hemática, y 3 ml de sangre en tubo seco para la realización de Pruebas de función hepático.

Para las pruebas de función renal se realizará una recolección de orina de 12 horas para determinación de la depuración de creatinina, en caso de no ser posible la realización de la recolección se realizará gamagrama de dinámica renal.

Las muestras sanguíneas serán enviadas al laboratorio central del Instituto Nacional de Pediatría para su procesamiento en el autoanализador. Estas pruebas se tomarán previo a cada uno de los cursos de

quimioterapia, o si el paciente presenta toxicidad de acuerdo a las condiciones clínicas de este. La toma de muestras sanguíneas no provoca anemia en los pacientes.

Estos estudios se tomarán de manera basal a todos los pacientes antes del inicio de cualquier agente de quimioterapia y se tomarán controles cada 21 días previo al inicio del siguiente curso de quimioterapia en las consultas respectivas al servicio de Oncología, posterior a terminar el esquema de quimioterapia y presente ausencia de la enfermedad, se continuará el seguimiento del paciente por 2 años; sin embargo se continuará la vigilancia del paciente hasta completar 3 años desde su inclusión al estudio para determinar su supervivencia global y su supervivencia libre de evento.

Si el paciente presenta algún tipo de complicación los estudios se realizarán en el momento que lo requiera el paciente.

Durante las evaluaciones en el seguimiento de cada paciente en la consulta por el servicio de Oncología pediátrica se vigilará lo siguiente:

Toxicidad Hematológica: Se evaluará mediante la realización de biometría hemática completa de manera basal, durante cada consulta hasta completar 2 años de seguimiento; esto será realizado por Oncólogo Pediatra. Se reportarán valores de hemoglobina, leucocitos, neutrófilos totales y plaquetas. Se clasificará de acuerdo a los grados establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Toxicidad Hematológica	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Leucocitos (x10 ³ /L)	4	3.0 – 3.9	2.0 – 2.9	1.0 - 1.9	< 1.0
Neutrófilos totales (x10 ³ /L)	< 2	2.0-1.5	1.0 – 1.5	0.5 – 1.0	< 0.5
Plaquetas (x10 ³ /L)	> 100	75 -100	50 – 74.9	25 – 49.9	<25
Hemoglobina (g/dl)	> 10.5	10 – 10.49	8.0 – 9.9	6.5 – 7.9	< 6.5

Toxicidad Hepática: Se evaluará con la realización de PFH completas de manera basal durante cada consulta hasta completar 2 años de seguimiento; esto será realizado por Oncólogo Pediatra. Se clasificará de acuerdo a los grados establecidos por la OMS. Para este análisis se excluirán a los pacientes con metástasis hepáticas o que presente choque séptico.

Toxicidad Hepática	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Bilirrubinas (umol/L)	NL	-----	< 1.5	1.5 – 3.0	> 3.0
Transaminasas	NL	> 2.5 la NI	2.6 – 5 veces la NL	5.1 – 20 veces la NL	> 20 veces la NL

Toxicidad Renal: Se evaluará mediante la determinación de valores de creatinina y depuración de creatinina y/o gamagrama renal de manera basal y a las tres semanas de la administración de la quimioterapia. Se clasificará de acuerdo a los grados establecidos por la OMS.

Toxicidad Renal	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Creatinina (mg/dl)	NL	<1.5	1.5 – 3	3.1 – 6.0	> 6.0

Toxicidad gastrointestinal: Se reportarán los eventos de náusea y vómitos que presente el paciente en las 24 horas posteriores a la aplicación de quimioterapia, y durante cada consulta hasta completar 2 años de seguimiento; esto será realizado por Oncólogo Pediatra; se clasificará la toxicidad de acuerdo a los grados establecidos por la OMS. Todos los pacientes como parte de los protocolos nacionales reciben tratamiento antiemético con ondasetrón 5mg/m² iniciando 30 minutos antes de la aplicación de quimioterapia y cada 8 horas.

Toxicidad	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Gastrointestinal					
Nausea	No presentes	Come razonablemente	Disminución significativa pero come	No come	--
Vómito	No presentes	1 episodio en 24 hrs	2 – 5 episodios en 24 hrs	6 – 10 episodios en 24 horas	Más de 10 episodios en 24 hrs o requiere NPT

Complicaciones Infecciosas: Se evaluarán con el número total de eventos de neutropenia y fiebre, sepsis grave y choque séptico por curso de tratamiento durante cada consulta hasta completar 2 años de seguimiento; esto será realizado por Oncólogo e Infectólogo Pediatra

Toxicidad Dermatológica: Se evaluará la presencia de lesiones en piel y mucosas a través de médico Oncólogo pediatra con ayuda de médico Dermatólogo pediatra, para la determinación de lesiones a nivel palmar, plantar, utilizando el siguiente constructo :

Eritrodisestecia plamo-plantar.	
Grado 1	Eritema, edema o descamación que no interviene con las actividades diarias
Grado 2	Eritema, descamación o edema que interfiere pero no disminuye las actividades físicas normales, con pequeñas ulceraciones menores de 2 cm de diámetro.
Grado 3	Ulceraciones o edema que interfieren con la deambulación o las actividades diarias, impide el uso de ropa regularmente
Grado 4	Complicaciones infecciosas locales o difusas, secundarias a las ulceraciones que requieren hospitalización.

Toxicidad cardíaca : Se realizará por un cardiólogo pediatra del servicio de cardiología de INP, este estará cegado al grupo de tratamiento al que pertenece el paciente.

- **Ecocardiograma** Se realizará con el equipo HP Sonos 5500 con transductores multifrecuencia S12 y S4. El estudio se realizará en modo M bidimensional Doppler pulsado, continuo y codificado en color en proyecciones subcostal, paraesternal largo, apical cuatro cámaras, paraesternal corto y supraesternal.

Las fracciones de eyección y expulsión fueron tomadas en modo bidimensional utilizando el método de Cubos.

$$FE = (DdVi^3 - DsVI^3 / DdVI^3)$$

$$FA = (DdVI - DsVI / DdVI)$$

DdVI = Diámetro diastólico final del ventrículo izquierdo

DsVI = Diámetro sistólico del ventrículo izquierdo

El ecocardiograma se realizará de manera basal y cada que se alcance una dosis acumulada de 100mgm² de doxorubicina convencional o pegilada. Realizándose evaluaciones a los 100, 200, 300 y 400mgm². Así mismo se realizaran a los 6, 12, 18 y 24 meses después de la suspensión de doxorubicina.

- **Electrocardiograma:** Se realizará con el cardiógrafo PageWriter XII de Hewlett Packard modelo HP M1700A

Se registrarán los del voltaje del complejo QRS (mvolt), la amplitud del segmento ST (mseg), la duración de la onda T (mseg) y su voltaje (mvolt), así como la presencia de disritmias.

El electrocardiograma se realizará de manera basal, antes y después de la infusión de cualquier tipo de doxorubicina y a los 6, 12, 18 y 24 meses después de la suspensión de doxorubicina.

- **Troponina T:** Realizado por Oncólogo Pediatra, el cual mediante punción periférica realizada con técnica de asepsia y antisepsia, se obtendrán 3 ml de sangre en un tubo seco el cual será enviado al laboratorio de Oncología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría para su procesamiento. La troponina T se determinará de manera basal, 24 hrs después de la administración de cualquier tipo de doxorubicina a los 6 y 12 meses de seguimiento. Se considerará elevación de la Troponina T si se encuentran niveles mayores de 0.01ng/ml

Toxicidad Cardiaca	Ausente	Presente
Ecocardiograma	Ausencia de anomalías	Arritmias, bloqueos o cualquier arteración en el trazo electrocardiográfico de cualquier índole
Electrocardiograma	Disminución < 20% de la Fracción basal de eyección del ventrículo izquierdo	Disminución > 20% de la Fracción basal de eyección del ventrículo izquierdo
Concentración Troponina T	Concentración sérica < 0.01 ng/ml	Concentración sérica > 0.01 ng/ml

* La presencia de 1 componente de Toxicidad Cardiaca se considerará como complicación cardiaca

b) Evaluación de la respuesta a quimioterapia

Se realizará Tomografía axial computada o Resonancia Magnética por medico radiólogo del servicio de radiología del Instituto Nacional de Pediatría quien se mantendrá cegado a las maniobras del estudio, quien analizará el porcentaje de reducción del tumor (midiendo el diámetro de la lesión y obteniendo el área comprendida por el mismo) de acuerdo con la evaluación inicial y los reportes subsecuentes de cada tipo de Sarcoma en cada una de las consultas que acuda el paciente durante los 2 años de su seguimiento. (Anexo 3)

Se le analizará previamente su consistencia y reproducibilidad con un estudio piloto de 15 estudios radiográficos donde se determinará el diagnóstico y 10 días después en forma aleatoria se le volverá a solicitar el diagnóstico de los mismos estudios en diferente orden; sin conocer nombre, registro ni diagnóstico previo del paciente su concordancia será evaluada con índice de concordancia Kappa.

*** RECURSOS MATERIALES Y HUMANOS:**

MATERIALES:

- 1 Tubo seco de 3ml por toma de Pruebas de función hepática
- 1 Tubo con EDTA 9mg de 3ml por toma de Biometría hemática
- 1 Tubo seco de 3 ml por toma de Troponina T
- Equipo HP Sonos 5500 para realización de ecocardiograma
- Cardiógrafo PageWriter XII de Hewlett Packard modelo HP M1700A
- Doxorubicina Pegilada Liposomal
- Doxorubicina convencional
- Dexrazoxane

HUMANOS:

El responsable del estudio será un médico oncólogo pediatra capacitado para la administración de quimioterapia y tratamiento de las posibles complicaciones. Se estandarizará a un observador ciego el cual será un cardiólogo pediatra para la realización e interpretación de EKG y Ecocardiograma, un observador ciego que será un medico radiólogo pediatra para la interpretación de los estudios radiológicos y el responsable del estudio vaciará los resultados en la hoja de recolección de datos.

Las muestras sanguíneas serán tomadas por personal médico entrenado y se enviaran las muestras a los laboratorios respectivos dentro del INP, para su posterior análisis.

FINANCIAMIENTO:

El protocolo de quimioterapia y los estudios de valoración y seguimiento de laboratorio y gabinete serán financiados por el Programa de Seguro Popular el cual cubre el costo total del tratamiento, complicaciones, efectos adversos y colaterales de los pacientes menores de 18 años con diagnóstico de cáncer, durante el tiempo de seguimiento de los mismos (3 años). Las muestras sanguíneas se enviarán al autoanalizador del INP, cuyos gastos serán cubiertos por el Programa de Seguro Popular al igual que los estudios de gabinete en el servicio de radiología de este Instituto, generados en el seguimiento a 3 años de estos pacientes.

El estudio contará con un financiamiento parcial externo para la determinación sérica de la troponina T por parte del Laboratorio ASOFARMA

CONFLICTO DE INTERESES:

Los investigadores responsables y el laboratorio colaborador señalan que no existe conflicto de interés para la realización de este estudio ni para su publicación.

*** CÁLCULO DE LA MUESTRA:**

El tamaño de la muestra fue calculado en base a:

Tomando en cuenta los datos reportados por Lipshultzse (20), quien reporta la frecuencia de complicaciones cardiológicas durante el tratamiento con doxorubicina sola y en combinación con dexrazoxane (cardioprotector sitio específico) se observa lo siguiente:

Complicaciones cardiológicas usando Doxorubicina sola: 46%

Complicaciones cardiológicas utilizando Doxorubina + dexrazoxane: 15%

Utilizando la fórmula para proporciones, tomando un error alfa de 0.05 y un poder del 80% se obtiene un tamaño de muestra:

$$n = \frac{(0.15 * 0.85) (1.96 + 0.84 \sqrt{(0.46 * 0.54)}) / (0.15 * 0.85)^2}{(0.46 - 0.15)^2}$$

$$n = \frac{(0.127) (9.81)}{0.096}$$

$$n = 13 \text{ pacientes} + 20\%$$

n = 16 pacientes por grupo

El mismo autor reporta complicaciones cardiológicas con los mismos fármacos después de su administración a los pacientes con sarcoma observando las siguientes frecuencias:

Complicaciones cardiológicas usando Doxorubicina sola: 38%

Complicaciones cardiológicas utilizando Doxorubicina + dexrazoxane: 17%

Utilizando la fórmula para proporciones, tomando un error alfa de 0.05 y un poder del 80% se obtiene un tamaño de muestra:

$$n = \frac{(0.17 * 0.83) (1.96 + 0.84 \sqrt{(0.38 * 0.62)}) / (0.17 * 0.83)^2}{(0.38 - 0.17)^2}$$

$$n = \frac{(0.14) (9.27)}{0.044}$$

$$n = 30 \text{ pacientes} + 20\%$$

n = 36 pacientes por grupo

En base a lo anterior, y debido a que el servicio de Oncología reporta anualmente 35 pacientes con diagnóstico de Sarcoma y la factibilidad para obtener resultados concluyentes al término de 2 años, se pretende estudiar una muestra de 107 pacientes; con un análisis interim al año de estudio por observador externo, calculando el poder y continuar el protocolo hasta llegar a su finalización.

* ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizará un análisis univariado por medio de pruebas de tendencia central para conocer las características de la muestra estudiada, y así establecer el tipo de distribución de cada variable; tratándose de variables numéricas continuas se realizará el cálculo de la media y desviación estándar o mediana con mínimos y máximos dependiendo del tipo de distribución. (Edad, Superficie Corporal, Reducción tumoral, Fracción de eyección del ventrículo izquierdo, concentración de Troponina T, cuenta leucocitaria, plaquetaria, neutrófilos); mientras que para las variables categóricas se obtendrá proporciones (Sexo, Tipo de sarcoma, Nauseas, vomito, fiebre, cardiotoxicidad, toxicidad hematológica, renal, gastrointestinal)

La comparación de las medias se realizará mediante pruebas de T de Student o U de Mann Whitney dependiendo del tipo de distribución de los datos; mientras que para comparar las proporciones se utilizará la prueba de ji cuadrada.

Se ajustarán los covariados y se identificará si existe colinealidad o modificación de efecto mediante el análisis bi-variado de cada una de las variables con el desenlace.

Para evaluar los parámetros de seguridad, se analizará a través de un análisis de muestras repetidas la función ventricular, concentración de Troponina T, toxicidad hematológica, hepática, renal medido durante las diferentes mediciones requeridas para la vigilancia de los pacientes; mientras que se analizará a través de una prueba de regresión lineal simple la concentración de Troponina T con respecto a la cardiotoxicidad presentada en el paciente.

Para evaluar la supervivencia de la enfermedad y la supervivencia libre de evento se analizará el tiempo transcurrido desde el momento final de la administración del esquema de quimioterapia hasta cumplir 1 año de seguimiento, identificando recaídas, toxicidad cardiaca crónica y muerte (fracaso) a través de la prueba de Kaplan Meyer y posteriormente se comparará la supervivencia entre los 2 grupos de tratamiento a través de Cox.

Finalmente aquellos pacientes que sean eliminados del estudio se realizará un análisis de Intención a Tratar.

***ASPECTOS ÉTICOS:**

En acuerdo con los principios y las directrices que establece las buenas prácticas clínicas (BCP) de conformidad con los principios enunciados en la Declaración de Helsinki de 1964, y cuyo objetivo es la investigación en Farmacología Clínica, y con apoyo en lo previsto en la Ley General de Salud, en el reglamento de la ley General de Salud en Materia de prestación de Servicios de Atención Médica, y de acuerdo a la declaración de Helsinki, Adoptada por la 18°deg; Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964), revisada por la 29°deg; Asamblea Médica Mundial (Tokio, 1975) y enmendada por la 35°deg; Asamblea Médica Mundial (Venecia, 1983) y la 41°deg; Asamblea Médica Mundial (Hong Kong,1989), donde debe prevalecer el bienestar individual de los sujetos sometidos a estudio, por sobre los intereses de la ciencia y de la comunidad, este protocolo se llevara a cabo con la estricta observación de los principios científicos reconocidos y respeto por la integridad física de los pacientes involucrados para la obtención de resultados validos y aplicables a nuestra población de estudio, para ello se implementaran las medidas de seguridad debido a la maniobra que se realizará en la administración de quimioterapia (doxorubicina con cardioxane o doxorubicina pegilada); por el tipo de población que se estudiará (pacientes pediátricos con sarcomas), y por las posibles complicaciones que pueden obtenerse con dicha maniobra, sin embargo con la revisión de la literatura, se ha observado que no incrementa el riesgo de presentar efectos adversos y si obtenemos un conocimiento importante para determinar la respuesta al tratamiento y la cardiotoxicidad, lo cual implica contar con diferentes estrategias de cardioprotección,y mejorar la calidad de vida de pacientes sobrevivientes de cáncer .

Estos mecanismos de seguridad consistirán en:

1. Informará a los padres o tutores de los pacientes sobre la maniobra a realizar, con el objeto de obtener el Consentimiento Informado debidamente firmado. (Anexa a este protocolo)
2. Comunicará a los comités de ética, de investigación y al jefe del servicio cualquier modificación al protocolo original, debidamente fundamentada.
3. Se archivará la información registrada del estudio durante un plazo mínimo de 5 años.
4. Se realizará un volcado riguroso de toda la información en la hoja de recolección de datos.
5. Se pondrá a disposición del comité de ética, de investigación, y del jefe de servicio toda la información que le sea requerida para el seguimiento de los pacientes.

6. Asegurará la confidencialidad de la información del estudio, así como la identidad de los pacientes incorporados al mismo.
7. Se tomarán las medidas adecuadas en caso de reacciones adversas o inesperadas, y se pondrán inmediatamente en conocimiento del comité de ética, de investigación, del jefe del servicio y los familiares o tutores del paciente.
8. Se presentará un informe final al comité de ética, de investigación y al jefe del servicio de dicho estudio, con resultados preliminares cada 6 meses, para que conozcan los avances del estudio.
9. Los parámetros de seguridad que se evaluarán en cada paciente son :

Toxicidad Hematológica: Se evaluará mediante la realización de biometría hemática completa de manera basal, durante cada consulta hasta completar 2 años de seguimiento; esto será realizado por Oncólogo Pediatra. Se reportarán valores de hemoglobina, leucocitos, neutrófilos totales y plaquetas. Se clasificará de acuerdo a los grados establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Toxicidad Hematológica	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Leucocitos (x10 ³ /L)	4	3.0 – 3.9	2.0 – 2.9	1.0 - 1.9	< 1.0
Neutrófilos totales (x10 ³ /L)	< 2	2.0-1.5	1.0 – 1.5	0.5 – 1.0	< 0.5
Plaquetas (x10 ³ /L)	> 100	75 -100	50 – 74.9	25 – 49.9	<25
Hemoglobina (g/dl)	> 10.5	10 – 10.49	8.0 – 9.9	6.5 – 7.9	< 6.5

Toxicidad Hepática: Se evaluará con la realización de PFH completas de manera basal durante cada consulta hasta completar 2 años de seguimiento; esto será realizado por Oncólogo Pediatra. Se clasificará de acuerdo a los grados establecidos por la OMS. Para este análisis se excluirán a los pacientes con metástasis hepáticas o que presente choque séptico.

Toxicidad Hepática	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Bilirrubinas (umol/L)	NL	-----	< 1.5	1.5 – 3.0	> 3.0
Transaminasas	NL	> 2.5 la NI	2.6 – 5 veces la NL	5.1 – 20 veces la NL	> 20 veces la NL

Toxicidad Renal: Se evaluará mediante la determinación de valores de creatinina y depuración de creatinina y/o gamagrama renal de manera basal y a las tres semanas de la administración de la quimioterapia. Se clasificará de acuerdo a los grados establecidos por la OMS.

Toxicidad Renal	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Creatinina (mg/dl)	NL	<1.5	1.5 – 3	3.1 – 6.0	> 6.0

Toxicidad gastrointestinal: Se reportarán los eventos de náusea y vómitos que presente el paciente en las 24 horas posteriores a la aplicación de quimioterapia, y durante cada consulta hasta completar 2 años de seguimiento; esto será realizado por Oncólogo Pediatra; se clasificará la toxicidad de acuerdo a los grados establecidos por la OMS. Todos los pacientes como parte de los protocolos nacionales reciben tratamiento antiemético con ondasetrón 5mg/m² iniciando 30 minutos antes de la aplicación de quimioterapia y cada 8 horas.

Toxicidad Gastrointestinal	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Nausea	No presentes	Come razonablemente	Disminución significativa pero come	No come	--
Vómito	No presentes	1 episodio en 24 hrs	2 – 5 episodios en 24 hrs	6 – 10 episodios en 24 horas	Más de 10 episodios en 24 hrs o requiere NPT

Complicaciones Infecciosas: Se evaluarán con el número total de eventos de neutropenia y fiebre, sepsis grave y choque séptico por curso de tratamiento durante cada consulta hasta completar 2 años de seguimiento; esto será realizado por Oncólogo e Infectólogo Pediatra

Toxicidad Cardíaca: Se realizará por un cardiólogo pediatra del servicio de cardiología de INP, este estará cegado al grupo de tratamiento al que pertenece el paciente.

- **Ecocardiograma** Se realizará de manera basal y cada que se alcance una dosis acumulada de 100mg/m² de doxorubicina convencional o pegilada. Realizándose evaluaciones a los 100, 200, 300 y 400mg/m². Así mismo se realizarán a los 6, 12, 18 y 24 meses después de la suspensión de doxorubicina.

- **Electrocardiograma** Se registrarán los del voltaje del complejo QRS (mvolt), la amplitud del segmento ST (mseg), la duración de la onda T (mseg) y su voltaje (mvolt), así como la presencia de disritmias.

El electrocardiograma se realizará de manera basal, antes y después de la infusión de cualquier tipo de doxorubicina y a los 6, 12, 18 y 24 meses después de la suspensión de doxorubicina.

- **Troponina T.** Se determinará de manera basal, 24 hrs después de la administración de cualquier tipo de doxorubicina a los 6 y 12 meses de seguimiento. Se considerará elevación de la Troponina T si se encuentran niveles mayores de 0.01ng/ml

Toxicidad Cardíaca	Ausente	Presente
Ecocardiograma	Ausencia de anomalías	Arritmias, bloqueos o cualquier alteración en el trazo electrocardiográfico de cualquier índole
Electrocardiograma	Disminución < 20% de la Fracción basal de eyección del ventrículo izquierdo	Disminución > 20% de la Fracción basal de eyección del ventrículo izquierdo
Concentración Troponina T	Concentración sérica < 0.01 ng/ml	Concentración sérica > 0.01 ng/ml

* La presencia de 1 componente de Toxicidad Cardíaca se considerará como complicación cardíaca

Toxicidad Dermatológica: Se evaluará la presencia de lesiones en piel y mucosas a través de médico Oncólogo pediatra con ayuda de médico Dermatólogo pediatra, para la determinación de lesiones a nivel palmar, plantar, utilizando el siguiente constructo :

Eritrodisestecia plamo-plantar.	
Grado 1	Eritema, edema o descamación que no interviene con las actividades diarias
Grado 2	Eritema, descamación o edema que interfiere pero no disminuye las actividades físicas normales, con pequeñas ulceraciones menores de 2 cm de diámetro.
Grado 3	Ulceraciones o edema que interfieren con la deambulación o las actividades diarias, impide el uso de ropa regularmente
Grado 4	Complicaciones infecciosas locales o difusas, secundarias a las ulceraciones que requieren hospitalización.

Dichos resultados serán comunicados a los residentes de subespecialidad del servicio, al médico adscrito encargado de la sala, al investigador responsable, familiar o tutor del paciente y al Comité de Investigación y de Ética.

*** LÍMITES DEL ESTUDIO**

Los principales limitantes de este estudio serán los siguientes:

1.- Tiempo para completar el estudio: En el Instituto Nacional de Pediatría se reciben por año un promedio de 30 pacientes con diagnóstico de Sarcoma por lo que se calcula que la muestra se reunirá en un periodo de tres años.

2.- Financiamiento parcial: El proyecto contará con un financiamiento parcial para la determinación de Troponina T siendo esto el único aspecto del tratamiento y seguimiento que es incluido en el financiamiento del Seguro Popular para pacientes pediátricos con cáncer.

RESULTADOS (GRADUACION POR PRODUCTIVIDAD CIENTIFICA)

Archivo 2

Evaluación del tratamiento con VAMP más radioterapia a campos involucrados, en pacientes pediátricos mexicanos con estadio temprano de linfoma de Hodgkin

Olaya-Vargas A, Velasco-Hidalgo L, Rivera-Luna R, Suastegui F, Zarco A. Bol Med Hosp Infant Mex 2009;66:60-67

El Linfoma de Hodgkin (LH) es una neoplasia maligna con diseminación por contigüidad ganglionar, su origen está relacionado con la línea linfocítica B. De acuerdo a los factores de riesgo, se divide a los pacientes en tres grupos: Alto, intermedio y bajo riesgo. Los pacientes con enfermedad en estadio III y IV se encuentran en el grupo de alto riesgo. Los pacientes en estadio I y II corresponden al grupo de bajo riesgo siempre que no presenten alguna de las siguientes características: Adenomegalia cervical mayor de 6 cm, masa mediastinal que ocupe por lo menos un tercio del volumen total del mediastino y la presencia de síntomas B. Si los pacientes con estadios I y II presentan alguno de estos factores se consideran de riesgo intermedio.

El tratamiento ha evolucionado con el uso de terapia combinada, con menos cursos de quimioterapia e irradiación de dosis reducida a las áreas afectadas. El objetivo del tratamiento en el grupo de pacientes de bajo riesgo es mantener una alta tasa de curación y al mismo tiempo reducir los efectos tardíos.

El objetivo del estudio fue evaluar la supervivencia global y libre de evento de un grupo de pacientes con LH de bajo riesgo, con un esquema de quimioterapia que combina el uso de bajas dosis de quimioterapia y disminución de la dosis de radioterapia solo a campos comprometidos, sin que esto afecte la expectativa de curación, permitiendo disminuir la toxicidad.

Métodos: Se incluyeron pacientes con LHN estadio IA, IB y IIA, fueron tratados a base de VAMP (Vinblastina 6mg/m² días 1 y 15, Adriamicina 25mg/m² día 1 y 15, Metotrexate 20mg/m² día 1 y 15 y Prednisona 40mg/m² día 1 a 14), con un total de 4 cursos. La radioterapia se aplicó después de dos ciclos a campos comprometidos 21.6Gy. La evaluación se realizó con tomografía después del segundo curso de quimioterapia y al final de todo el esquema de tratamiento y con rastreo con gammagrafía con galio. La toxicidad se evaluó de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Se realizó una descripción de las variedades epidemiológicas y una descripción de frecuencias de las variables categóricas y nominales, así como resumen de las mismas a través de medidas de tendencia central y de dispersión con mediana y valores mínimo y máximo. La supervivencia se determinó a través de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.

Resultados: Se incluyeron 17 pacientes, de los cuales 14 eran de sexo masculino. El rango de edad fue de 3 a 15 años con una media de 7 años. En todos los pacientes el sitio primario de presentación fue el cuello. 8 pacientes fueron estadio IA y 9 IIA. La variedad histológica fue en 10 esclerosis nodular y en 7 celularidad mixta. Dos pacientes presentaron recaída a los 4 y 16 meses respectivamente. 7 pacientes presentaron hipotiroidismo y 1 paciente tiroiditis y bocio. Por lo que recibieron tratamiento hormonal sustitutivo. El Virus de Epstein-Barr se encontró en 8 pacientes (dos por serología, 5 por biopsia y 2 por ambos métodos). La supervivencia global fue de 94.12% con una media de seguimiento de 66 meses. La supervivencia libre de evento fue de 88.24% con una media de seguimiento de 63 meses. Para pacientes en estadio IA la supervivencia global fue de 100% y la libre de evento de 87.5%. En los pacientes con estadio IIA ambas fueron de 89%. No hubo diferencia estadísticamente significativa.

Discusión: Las estrategias de tratamiento para LH han cambiado radicalmente, Donaldson en 2002 reportó 15 pacientes con estadios tempranos (I-II) y ganglios menores de 4 cm, que recibieron tratamiento con MOPP, con una supervivencia libre de evento de 100% con un seguimiento de 25 a 132 meses. Behrendt et al., reportó que en pacientes con ganglios mayores de 4 cm tratados con MOPP y radioterapia una supervivencia libre de evento fue de 92%.

En el estudio de Santoro se comparó el tratamiento con MOPP con ABVD, además de radioterapia. Observaron que la presencia de recaída en el grupo de pacientes que fueron tratados con MOPP fue del 22.6% comparado de 9.5% del grupo tratado con ABDV. La supervivencia a 7 años con MOPP fue de 67.9% y con ABVD 77.4%.

En un estudio realizado en St. Jude, se analizó la combinación de 5 ciclos de vincristina y procarbina alterando con 4 ciclos de ABVD y radioterapia a dosis bajas (20Gy), reportaron una supervivencia a 5 años de 96% y supervivencia libre de evento de 93%. Como efectos secundarios se observó cardiotoxicidad, disfunción tiroidea, desarrollo de segundas neoplasias y esterilidad.

A pesar de los excelentes resultados con los esquemas tradicionales (MOPP y ABVD) y dosis convencionales de radioterapia, los efectos secundarios son elevados sobre todo en el grupo de pacientes de bajo riesgo, por lo que desde mediados de la década de los años noventa, el objetivo a nivel internacional ha sido disminuir la dosis de quimioterapia y radioterapia sin afectar la supervivencia global y libre de evento, con la finalidad de limitar los efectos secundarios. Se ha reportado una supervivencia libre de evento de 90% a 7.5 años en pacientes tratados con quimioterapia y dosis bajas de radioterapia.

En el Instituto Nacional de Pediatría hasta 1998 el tratamiento con para pacientes con estadios favorables incluía exclusivamente el uso de radioterapia a 35 Gy con técnicas tradicionales, sin embargo la supervivencia global era del 88%. Encontrando efectos secundarios del empleo de Radioterapia en más del 30% de los pacientes siendo principalmente la disfunción tiroidea y deformidad del tórax. Así como morbilidad asociada a la hemiesplenectomía diagnóstica. El empleo de este esquema de tratamiento a base de la combinación de dosis bajas de quimioterapia VAMP combinada con radioterapia a 26.1 Gy solo a campos comprometidos demostró ser eficaz ya que la supervivencia global de este grupo de pacientes fue de 94.1% y una supervivencia libre de evento de 88.2%. La toxicidad hematológica secundaria fue mínima. Sin embargo la toxicidad a mediano plazo secundaria a radioterapia aun es elevada, por lo que se investiga la posibilidad de disminuir la dosis de radioterapia para aquello con respuesta competente después del segundo curso de quimioterapia a 15 Gy.

Consort

Área	Item	Calificación
Título y Resumen	Se identifica el trabajo como ECA	0
	Formato estructurado	1
Introducción	Información científica y racional del tópico.	1
	Objetivos e hipótesis son específicos	1
Métodos	Descripción del diseño del Ensayo.	1
	Cambios importantes en los métodos después de iniciado el Ensayo y sus razones.	0
Participantes	Criterios de selección	1
	Características y sitio de donde fue recolectada la información	1
Intervenciones	Detalla de forma suficiente las intervenciones en cada grupo para su replicación	1
Resultados a esperar	Especifica la forma de medición de los desenlaces primarios y secundarios	1
	Especifica los cambios en los resultados del Ensayo posterior a su comienzo y las justifica.	0
Tamaño de muestra	Describe como se determinó el tamaño de muestra	0
	Explica cuando aplicar análisis interim y su consecuencia	0
Aleatorización	Describe el método utilizado para generar la secuencia aleatoria	0
	Describe el tipo de aleatorización y sus restricciones.	0
	Mecanismos usados para implementar la secuencia de aleatorización, y los pasos tomados para asignar la intervención	0
	Describe quien generó la secuencia de aleatorización, quien incluyó a los participantes y quien los asignó a las intervenciones	0
	Describe quien y en que forma estuvo cegado a las intervenciones	0
Aleatorización	Describe la similitud de las intervenciones	1
	Describe los métodos estadísticos utilizados para comparar los grupos en los resultados primarios y secundarios	1
	Describe métodos adicionales de análisis, subgrupos y ajustados	0
Resultados obtenidos	Diagrama de flujo de los incluidos, aleatorización y analizados	0
	Descripción de los perdidos y su razonamiento	0
	Define el periodo de reclutamiento	1
	Define causas por las cuales el ensayo debe ser detenido	0

	Muestra cuadro basal de las características clínicas y demográficas por cada grupo	1
	Menciona en cada análisis el número de participantes	1
	Se estima la precisión del efecto en cada resultado primario y secundario (IC95%)	0
	Para resultados binarios : tamaño del efecto ante eventos absolutos o relativos	0
	Resultados de análisis de subgrupos y ajustados.	0
	Menciona efectos indeterminados en cada grupo	0
Discusión	Limitaciones del estudio, potenciales sesgos	1
	Generalización de los resultados del Ensayo	1
	Interpretación consistente de los resultados	1
Otros	Número de registro del ensayo	0
	Lugar donde puede ser revisado todo el protocolo en su totalidad	0
	Financiamiento	1
Total		49 (%)

Este es un estudio donde solo se incluye un brazo de pacientes con Linfoma de Hodgkin en estadios tempranos tratados con el protocolo VAMP, con la herramienta Consort su calificación es de 49% debido principalmente a que no se trata de un ensayo clínico, sin embargo no hay herramientas específicas para estudios cuasi experimentales. Existen áreas en las cuales se debe de trabajar más para disminuir la presencia de sesgo, sobre todo en la aleatorización y cegamiento, así mismo no hay maniobras para asignar el tratamiento debido a que todos los individuos recibieron los mismos medicamentos. Además que el número de pacientes incluidos fue reducido, se observa una supervivencia libre de evento adecuada, sin embargo por los puntos mencionados previamente no se pueden emitir conclusiones con alta evidencia del empleo de este esquema en este grupo de pacientes.

Archivo 3

Consolidation treatment for high risk solid tumors in children with myeloablative chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor stem cell transplantation

Olaya-Vargas A, Rivera-Luna R, Pérez-García M, Cárdenas-Cardós R, Velasco-Hidalgo L, LordMéndez Jacome D, Campos-Gutiérrez M. Rev Hematol Hemoter 2013;35:343-348

La supervivencia libre de evento (SLE) de pacientes pediátricos con tumores sólidos ha aumentado considerablemente, hasta el 70% a 5 años. Sin embargo existe un grupo de pacientes con algunas características clínicas y biológicas que conllevan un pobre pronóstico. Los factores no favorables se asocian con una alta frecuencia de falla al tratamiento convencional; por lo que requieren nuevas estrategias terapéuticas en este grupo de pacientes.

En estudios clínicos y preclínicos se ha estudiado que el efecto de los agentes alquilantes tiene una relación logarítmica lineal entre la dosis de quimioterapia y la citotoxicidad. Por lo que incremento en la dosis de quimioterapia 3 a 10 veces conlleva un incremento logarítmico en la destrucción de células malignas. Sin embargo el principal limitante es la mielotoxicidad que pone en riesgo la vida del paciente. La reconstitución del sistema hematopoyético después de dosis mieloablativas de quimioterapia e irradiación corporal total puede inducir complicaciones severas y fatales si los pacientes no son rescatados con células progenitoras hematopoyéticas CD34 obtenidas de la médula ósea o de sangre periférica. Esta ha sido una de las estrategias más exitosas para limitar la mielotoxicidad secundaria.

Se ha demostrado la importancia del uso de dosis mieloablativas de diversos regímenes de quimioterapia seguidos del soporte con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Este abordaje se usa como tratamiento de consolidación en pacientes pediátricos con tumores sólidos de alto riesgo. Sin embargo aún hay controversia sobre la mejor combinación de quimioterapia mieloablativa, así como la eliminación del uso de la radiación corporal total; sin que afecte la respuesta de los pacientes. El objetivo de este estudio fue evaluar la seguridad y eficacia de la quimioterapia mieloablativa sin radiación corporal total, empleando melfalan, ciclofosfamida y etoposido seguido de rescate con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas autólogas.

Métodos: Se realizó un estudio fase II, aprobado por el comité de ética institucional y por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Los criterios de inclusión fueron: paciente menor de 18 años, diagnóstico de tumor sólido de alto riesgo o en estadio avanzado, de enero de 1998 a octubre de 2004, con un seguimiento de 121 meses después de trasplante. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado. En base a estos criterios se espera una supervivencia libre de enfermedad de menos del 25% con tratamiento convencional al momento del diagnóstico o posterior a la primera recaída. Todos los pacientes recibieron tratamiento convencional con cirugía, radioterapia y quimioterapia previo a ser elegidos para el programa de trasplante autólogo. Los pacientes que presentaron respuesta mayor del 90% en el diámetro tumoral valorado por estudios de imagen, fueron incluidos. Todos los pacientes fueron evaluados después de su ingreso al programa de trasplante. Aquello con evidencia de disfunción orgánica fueron excluidos.

Criopreservación de células progenitoras: Las células progenitoras hematopoyéticas fueron obtenidas de médula ósea en quirófano bajo anestesia general mediante punciones en ambas crestas iliacas o de sangre periférica mediante aféresis usando el separador celular Baxter modelo CS300a través de un catéter de doble lumen. La movilización de células progenitoras se obtuvo usando factor estimulante de colonias de granulocitos 10mcg/kg/día por 5 días, previo a la recolección. Las células se criopreservaron hasta su re infusión intravenosa. Se obtuvieron 3.5 a 4.5×10^8 células mononucleares por kilogramo por

peso del paciente. A través de citología la dosis celular para garantizar el injerto se estableció en $3-5 \times 10^6$ células CD34/kg. La criopreservación se realizó mediante una unidad programable que permite la disminución gradual de temperatura de $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ en 90 minutos, como agente de criopreservación se empleó dimetil sulfoxido al 10% (DMSO). Las células progenitoras se almacenaron en nitrógeno líquido a -190°C hasta el día de la infusión. Para pacientes que presentaron afección en médula ósea se realizó una purga in vitro con metilprednisolona y etoposido. Para valorar la viabilidad de la células se empleó la prueba de exclusión con tripan azul al 0.4%.

Régimen Mieloablativo: Después de que las células progenitoras hematopoyéticas fueron obtenidas, los pacientes iniciaron hidratación a $3000\text{ml}/\text{m}^2/\text{día}$ del día -10 al día 0. El régimen mieloablativo consistió en Melfalan oral $200\text{mg}/\text{m}^2$ por 4 días del día -9 al día -6, ciclofosfamida intravenosa a $120\text{mg}/\text{kg}$ los días -5 y -4, y etoposido intravenoso a $1200\text{mg}/\text{m}^2$ en infusión intravenosa de 24 horas el día -3. Los días -2 y -1 los pacientes solo recibieron hidratación.

Infusión de Progenitores Hematopoyéticos: La infusión se realizó el día 0. La bolsas se transportaron directamente a la unidad de trasplante a temperatura de 4°C . Se infundieron con un sistema cerrado, mediante una línea vascular central durante un periodo de 10 minutos. Todos los pacientes recibieron una dosis de furosemide intravenoso ($1\text{mg}/\text{Kg}$), una dosis de ondasetron ($5\text{mg}/\text{m}^2$) y una dosis de metilprednisolona ($2\text{mg}/\text{m}^2$) antes de la infusión.

Tratamiento Profiláctico y Soporte: Todos los niños recibieron tratamiento profiláctico con fluconazol $10\text{mg}/\text{kg}/\text{día}/\text{dosis}$ y Aciclovir $10\text{mg}/\text{kg}/\text{día}/\text{dosis}$. No se utilizó inmunoglobulina de manera rutinaria, se monitorizaron los niveles de inmunoglobulina y se administró a los pacientes con niveles bajos durante o después del trasplante. Se administró factor estimulante de colonias de granulocitos IV 10mcg cada 24 horas a partir del día +3, hasta que la cuenta de neutrófilos fuera 1×10^9 células/l. Los pacientes recibieron transfusión de glóbulos rojos a $10-20\text{ml}/\text{kg}$ cuando los niveles de hemoglobina eran por debajo de $8\text{g}/\text{dl}$ y aféresis de plaquetas si la cifra era menor de $20 \times 10^3/\text{ul}$.

Evaluación de la respuesta: Se consideró que había injerto cuando la cuenta de neutrófilos era mayor de 0.5×10^9 células y reticulocitos mayor de 2% en los primeros 30 días después del trasplante. El análisis estadístico se realizó con el programa STATA 11. Se utilizó el método actuarial de Kaplan Meier para determinar la supervivencia global (SG) y SLE. Los parámetros de seguridad fueron definidos acuerdo a los criterios de toxicidad de acuerdo a la OMS.

Resultados: Se incluyeron 19 pacientes, 52.6% fueron hombres. El rango de edad fue de 27 a 192 meses, con una mediana de 52 meses. EL diagnóstico más frecuente fue neuroblastoma 47.4% de los cuales 89% fueron estadio IV y 11% estadio III. Se incluyeron 5 pacientes con Sarcoma de Ewing (26.3%), de los cuales 40% tenían infiltración en médula ósea y 1 metástasis en hígado. EL 10.5% de los pacientes ($n=2$) tenían tumor de Wilms en primera recaída. Tres pacientes (15.7%) tenían tumores germinales del tipo senos endodérmicos en segunda remisión completa. La médula ósea fue la fuente de células progenitoras en 6 pacientes (31.6%) y 13 en sangre periférica (68.4%). Se requirieron 2 aféresis para tener una dosis adecuada de células mononucleares, la mediana de la dosis fue de $4 \times 10^8/\text{kg}$ de peso del paciente. Se empleó purga in vitro con metilprednisolona y etoposido en 2 casos. La mediana de tiempo de injerto de neutrófilos fue de 22 días (intervalo 19 a 26 días) para los que recibieron trasplante de fuente de médula ósea y 14 días (intervalo 10 a 19 días) para aquello que recibieron trasplante de sangre periférica ($P=0.002$). La mediana de tiempo de injerto de plaquetas fue de 45 días (intervalo 32-68 días) para pacientes con trasplante de fuente de médula ósea y 36 días (29-58 días) para los de trasplante de sangre periférica. La media de tiempo de estancia hospitalaria fue de 30 días (intervalo 22-42 días). La SG a 100 días fue de 79% y la SLE de 63% con un periodo de seguimiento de

3 años. 11 pacientes se encuentran vivos sin evidencia de actividad tumoral. 8 paciente fallecieron 5 (26%) por choque séptico y 3 (15%) por recaída del tumor después del trasplante. Se presentó neutropenia grado IV en el 100% de los pacientes. Se presentó mucositis en 12 pacientes 63% en 2 pacientes fue grado IV, en 4 grado III y en 6 pacientes grado II. Se presentó colitis neutropénica en 7 pacientes (36.8%). Se presentaron complicaciones infecciosas en 11 pacientes (57.9%). Se observó que la histología tumoral fue importante en la supervivencia; la SG de los pacientes con Sarcoma de Ewing fue de 20% con un seguimiento de entre 3 y 18 meses, con una SLE de 0%. Para neuroblastoma la SG fue de 88.8% y la SLE de 77.8%.

Discusión: Se ha demostrado la efectividad del incremento de la dosis de quimioterapia para aumentar la destrucción de células tumorales. En un estudio previo con 15 pacientes la supervivencia global fue de 40%. El estudio actual muestra que un régimen específico de quimioterapia puede ofrecer resultados estandarizados. Una selección estricta de los pacientes puede ofrecer mejores resultados. El presente estudio evalúa los resultados con un régimen de quimioterapia a base de melfalan, ciclofosfamida y etoposido, sin irradiación corporal total. La SLE fue de 63%, estos resultados exceden la probabilidad de supervivencia de los pacientes con regímenes convencionales de tratamiento. El régimen de quimioterapia se seleccionó ya que ha probado ser eficiente en el tratamiento de múltiples tumores sólidos en niños, además de ser accesible en México. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros grupos. En pacientes con Sarcoma de Ewing el esquema de quimioterapia no tuvo impacto en la SLE por lo que se deben considerar otros regímenes mieloablativos. La frecuencia de complicaciones infecciosas en nuestra serie así como la mortalidad asociada al protocolo de trasplante es alta en comparación con la literatura internacional, sin embargo esto ha disminuido al incrementar la experiencia en este tipo de tratamiento. Se ha observado que la sangre periférica como fuente de células progenitoras es una opción más viable en población pediátrica.

Consort

Área	Item	Calificación
Título y Resumen	Se identifica el trabajo como ECA	0
	Formato estructurado	1
Introducción	Información científica y racional del tópico.	1
	Objetivos e hipótesis son específicos	1
Métodos	Descripción del diseño del Ensayo.	1
	Cambios importantes en los métodos después de iniciado el Ensayo y sus razones.	1
Participantes	Criterios de selección	1
	Características y sitio de donde fue recolectada la información	1
Intervenciones	Detalla de forma suficiente las intervenciones en cada grupo para su replicación	1
Resultados a esperar	Especifica la forma de medición de los desenlaces primarios y secundarios	1
	Especifica los cambios en los resultados del Ensayo posterior a su comienzo y las justifica.	0
Tamaño de muestra	Describe como se determinó el tamaño de muestra	0
	Explica cuando aplicar análisis interim y su consecuencia	0
Aleatorización	Describe el método utilizado para generar la secuencia aleatoria	0
	Describe el tipo de aleatorización y sus restricciones.	0
	Mecanismos usados para implementar la secuencia de aleatorización, y los pasos tomados para asignar la intervención	0
	Describe quien generó la secuencia de aleatorización, quien incluyó a los participantes y quien los asignó a las intervenciones	0
	Describe quien y en que forma estuvo cegado a las intervenciones	0
Aleatorización	Describe la similitud de las intervenciones	1
	Describe los métodos estadísticos utilizados para comparar los grupos en los resultados primarios y secundarios	1
	Describe métodos adicionales de análisis, subgrupos y ajustados	1
Resultados obtenidos	Diagrama de flujo de los incluidos, aleatorización y analizados	0
	Descripción de los perdidos y su razonamiento	0
	Define el periodo de reclutamiento	1
	Define causas por las cuales el ensayo debe ser detenido	0

	Muestra cuadro basal de las características clínicas y demográficas por cada grupo	1
	Menciona en cada análisis el número de participantes	1
	Se estima la precisión del efecto en cada resultado primario y secundario (IC95%)	1
	Para resultados binarios : tamaño del efecto ante eventos absolutos o relativos	0
	Resultados de análisis de subgrupos y ajustados.	1
	Menciona efectos indeterminados en cada grupo	0
Discusión	Limitaciones del estudio, potenciales sesgos	1
	Generalización de los resultados del Ensayo	1
	Interpretación consistente de los resultados	1
Otros	Número de registro del ensayo	0
	Lugar donde puede ser revisado todo el protocolo en su totalidad	0
	Financiamiento	0
Total		56.7 (%)

Este es un estudio cuasi experimental, donde solo se incluyó un grupo de pacientes a los cuales se les realizó la maniobra estudiada (trasplante autólogo de médula ósea), por lo que existen varios puntos evaluados en la herramienta Consort, que no se cumplen en el artículo, y que pueden ser causa de sesgo, entre las que se encuentran la falta de un grupo de comparación concurrente, asignación aleatoria del tratamiento, ocultación de la secuencia aleatoria y cegamiento tanto de los pacientes como del personal médico. Por el tipo de maniobra y por la n de pacientes que se incluyen en este tipo de estudios es complicado tener estas características ya que son pacientes con enfermedades oncológicas poco frecuentes y con características de alto riesgo. Solo se realizó análisis descriptivo al ser un estudio de un solo grupo, lo que también hace que disminuya el puntaje con la herramienta que se emplea para su evaluación. Dada que la prevalencia de la patología es menor del 5% es complicado realizar un ensayo clínico aleatorio, sin embargo estudios como este aporta información importante en cuanto a la eficacia y seguridad de este procedimiento, a partir de esta información se puedan diseñar estudios clínicos de mayor calidad metodológica.

Archivo 4

Ambroxol for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory distress syndrome (Protocol).

Gonzalez Garay AG, Reveiz L, Velasco-Hidalgo L, Solis-Galicia C. The Cochrane Library 2012; Issue 3:1-11

El síndrome de dificultad respiratoria es causado por la deficiencia o por la disfunción del surfactante pulmonar. El surfactante pulmonar es un agente activo que mantiene abiertos los alveolos pulmonares y facilita la entrada de aire a los pulmones, mejorando la oxigenación en el recién nacido. Esta enfermedad se presenta principalmente en recién nacido prematuros (antes de las 37 semanas de gestación) y se caracteriza por un incremento progresivo en el esfuerzo respiratorio y disminución en la cantidad de aire que ingresa a los pulmones favoreciendo hipoxia. Radiológicamente se observa un patrón difuso granular. Afecta más del 60% de los recién nacidos con un peso menor de 2500g y es la primera causa de hospitalización en una terapia intensiva neonatal. Pueden desarrollar múltiples complicaciones como hipertensión pulmonar, conducto arterioso persistente, hemorragia intraventricular, asfixia y muerte. El tratamiento requiere la administración de surfactante exógeno (natural o sintético), ventilación mecánica y terapia electrolítica. El Surfactante pulmonar es un agente activo formado por lípidos, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, es necesario para disminuir la fuerza de atracción de las paredes de los alveolos que favorece el colapso. Cuando es deficiente o disfuncional, el alveolo tiende a colapsarse disminuyendo el volumen pulmonar y promoviendo la formación de atelectasias que altera la oxigenación. Los factores de riesgo para el desarrollo de Síndrome de dificultad respiratoria (SDR) son: Recién Nacido pre termino menor de 37 semanas de gestación, recién nacido con peso menor de 2500g al nacimiento, nacimiento por cesarí, diabetes gestacional, madre diabética sin tratamiento, aspiración de meconio al nacimiento, hermano mayor con SDR, gestaciones múltiples y asfixia neonatal.

Descripción de la Intervención: Se han evaluada varios tratamientos para prevenir el desarrollo del SDR, entre los que se encuentran los siguientes: Agentes tocolíticos, cerclaje cervical, evitar alcoholismo y tabaquismo durante el embarazo, administración de digoxina, administración nasal de oxígeno después del nacimiento, empleo de en la madre antes del nacimiento que acelera la maduración pulmonar. Los esteroides prenatales se adoptaron como y tratamiento convencional hasta 1987. Otros estudios han identificado que el uso de ambroxol administrado a la mujer antes del nacimiento puede prevenir el desarrollo de SDR. El ambroxol es un metabolito de la bromhexina que se utiliza como agente mucolítico, facilita la remoción de las secreciones bronquiales. Incrementa la movilidad ciliar en el epitelio del tracto respiratorio. Puede ser administrado por vía oral o intravenosa, su vida media es de 10 horas, su máxima concentración en plasma ocurre entre las dos a cuatro horas, 90% de su eliminación es vía renal. Tanto el administrado vía oral como el intravenoso cruza la barrera placentaria y alcanza concentraciones adecuadas en el feto sin efectos secundarios en mayores de 28 semanas de gestación. La dosis óptima no está establecida, pero en niños de 2 a 5 años se emplea a dosis de 15 a 30 mg/kg en tres dosis. Los principales efectos adversos son diarrea, irritación gástrica, náusea, vómito y cefalea. Otros estudios han encontrado que el ambroxol incrementa la producción de surfactante pulmonar por los neumocitos tipo II, por lo que puede tener un rol en la prevención del SDR.

Eficacia del ambroxol in vitro: Algunos estudios han mostrado que el ambroxol inhibe la actividad de la enzima responsable de la degradación del factor surfactante (Fosfolipasa lisosomal) resultando en el incremento de este agente en los alveolos. Eficacia del uso de ambroxol en humanos: Algunos estudios han evaluado la efectividad de la administración del ambroxol en humanos, particularmente en recién nacidos. Marini en 1987 realizó un ensayo clínico controlado doble ciego en el que se comparó ambroxol

vs. Placebo. Se incluyeron 28 pacientes menores de 2000 g con SDR que requirieron ventilación mecánica. EL grupo experimental tuvo una reducción significativa de la mortalidad (39% comparada con 53% del grupo placebo $P < 0.05$). Marini en 1987 observó que la duración de la ventilación mecánica fue significativamente menor en el grupo de pacientes que recibieron ambroxol (270 horas) en comparación de los que reciben ambroxol (396 horas) ($P < 0.05$) sin efectos adversos.

Una revisión sistemática publicada por Zhang 2010 que incluyó 6 artículos comparó la eficacia del ambroxol en la primeras horas de vida comparado con tratamiento convencional (terapia de ventilación mecánica) en pacientes de menos de 36 semanas de gestación con peso menor de 1500 g reportando lo siguiente: Reducción del riesgo de desarrollar SDR OR 0.24 IC 95% 0.15 a 0.64 en pacientes tratados con ambroxol vs. El tratamiento convencional, reducción en la incidencia de hemorragia ventricular (OR 0.46, IC 95% 0.26-0.82), reducción de incidencia de infecciones pulmonares (OR 0.24, IC 95% 0.14-0.38), y reducción de la incidencia de conducto arterioso persistente (OR 0.33, IC 95% 0.17-0.67). Sin embargo Zhang en 2010 recomendó que los datos debieran ser interpretados con precaución dada la heterogeneidad entre los estudios y por la presencia de sesgo de publicación. Otros estudios han evaluado la eficacia del ambroxol en mujeres embarazadas en labor pretermino para prevenir la dificultad respiratoria neonatal. Laoang-Fernandez 2000 realizó un estudio en mujeres embarazadas con trabajo de parto pretermino o ruptura prematura de membranas, con una edad gestacional entre 27 y 34 semanas. Se administró ambroxol a 39 mujeres con una dosis de 1000mmg diluido en 500ml de 5% de solución glucosada, por vía intravenosa en infusión de 4 horas cada 24 horas por 3 días. El grupo de control fueron 41 mujeres. Se observó una disminución en la incidencia de SDR, así como la morbilidad y mortalidad en el grupo que recibió el ambroxol ($P < 0.01$). En otro ensayo clínico Molina en 2004, evaluó la eficacia del ambroxol en mujeres en el tercer trimestre del embarazo. El ambroxol se administró vía oral (30mg cada 8 horas de la semana 28 a la 32 de gestación en el grupo A, y en el grupo B 10 mujeres no recibieron la droga. Se tomaron muestras de 3m-4ml de líquido amniótico por amniocentesis a la semanas 32 de gestación y se midió la concentración de cuerpos lamelares (medida indirecta del factor surfactante) e identificaron que fue mayor en las mujeres tratadas con el ambroxol ($P = 0.01$).

Porque es importante realizar esta revisión: La mayoría de los estudios se han realizado en recién nacidos, sin embargo hay poca información para evaluar la acción del ambroxol en mujeres embarazadas en riesgo de parto pretermino para prevenir el SDR en los recién nacidos. El objetivo de esta revisión es evaluar la eficacia de administrar ambroxol en madres durante labor pretermino para reducir la incidencia de SDR y subsecuentemente disminuir la morbilidad y mortalidad neonatal.

Objetivo: Evaluar la eficacia y seguridad del ambroxol administrado en mujeres embarazadas en riesgo de parto pretermino para prevenir el SDR neonatal.

Métodos: Criterios para considerar estudios en esta revisión.- Tipos de estudio: Ensayos clínicos aleatorizados que comparen la administración de ambroxol en mujeres embarazadas con riesgo de parto pretermino con placebo o administración prenatal de esteroides (betametasona y dexametasona). No se incluyeron estudios quasi experimentales.

Tipo de participantes: Mujeres embarazadas, de cualquier etnia, en riesgo de parto pretermino, con menos de 37 semanas de gestación, productos de cualquier sexo, sin evidencia de malformaciones congénitas (sistema nervioso central, tracto gastrointestinal y respiratorio)

Tipo de intervención: Ambroxol versus placebo o no tratamiento, ambroxol versus esteroides prenatales, ambroxol + esteroides versus esteroides prenatales.

Desenlaces: Desenlace primario.- Neonatales: Incidencia de SDR, mortalidad prenatal. Maternos: Incidencia de efectos adversos (diarrea, irritación gástrica, náusea, vómito y cefalea)

Desenlaces secundarios.- Neonatales: Incidencia de displasia broncopulmonar (dependencia de oxígeno a las 36 semanas de edad gestacional corregida), necesidad de ventilación mecánica, administración de surfactante pulmonar, incidencia de hemorragia ventricular, incidencia de enterocolitis necrotizante. Maternos: Mortalidad materna.

Método de búsqueda para identificación de estudios: Búsqueda Electrónica.- Mediante el grupo Cochrane Pregnancy and Children Group trial se identificaron estudios en: The Cochrane central register for Controlled Trials (CENTRAL), Medline, Embase, búsqueda manual de 30 revistas y BioMed Central. Además se buscó en LILACS (1982 al fecha) y la plataforma de la Organización Mundial de la Salud (International Clinical Trials Registry Platform).

Otras búsquedas: Se buscó en lista de referencia de estudios recuperados, para identificar estudios no publicados, los autores de la revisión contactaron algunos autores para conocer de otros estudios. No se aplicó ninguna restricción de lenguaje.

Recolección de datos y análisis: Selección de estudio.- Dos autores revisaron de manera independiente cada referencia identificada para evaluar los criterios de inclusión. Cualquier desacuerdo se resolvió mediante discusión. Los artículos que cumplían todos los criterios de inclusión se revisaron de manera independiente por dos revisores. Si era necesario se consultó con una tercera persona.

Extracción de datos y manejo.- Para estudios elegibles, dos autores independientemente extrajeron los datos utilizando una herramienta estandarizada. Se extrajeron los siguientes datos: Criterios de elegibilidad, características demográficas, comorbilidades y dosis de tratamiento. Se revisó cualquier discrepancia entre los revisores y se llegó a un consenso. Se ingresaron los datos en el Software Review Manager, y se revisó su precisión.

Evaluación del riesgo de sesgo en los estudios incluidos.- Cada revisor evaluó de forma independiente el riesgo de sesgo de cada artículo de acuerdo al manual Cochrane para Revisiones Sistemáticas de Intervención. Se revisaron para posible sesgo las siguientes características: Generación de secuencia aleatoria, ocultación de la secuencia aleatoria, cegamiento, cegamiento del desenlace, datos incompletos del desenlace, reporte selectivo, otros sesgos, riesgo global de sesgo.

Medida de efecto del tratamiento.- Se realizó el análisis estadístico usando el programa RevMan 2011. Se utilizó metanálisis de efectos fijos para datos en ausencia de heterogeneidad. Si se encontró heterogeneidad, se hizo un análisis de sensibilidad, seguido por análisis con efectos aleatorios. Datos dicotómicos.- Se analizó riesgo relativo con intervalos de confianza al 95% Datos continuos.-Se emplearon diferencias de medias si las variables eran medidas de la misma forma en los artículos. Se empleó diferencia de medias estandarizadas para estudios donde la medida del desenlace era la misma, pero era diferente el método, si había evidencia de que los datos estaban sesgados. Datos Perdidos.- Se exploró el impacto de incluir artículos con datos perdidos, evaluando el efecto del tratamiento empleando análisis de sensibilidad. Si los datos no fueron reportados, se trató de contactar a los autores para obtener la información.

Evaluación de heterogeneidad.- Se evaluó empleando la prueba T^2 , I^2 y Chi^2 . Se consideró heterogeneidad cuando la I^2 era mayor del 50% y la T^2 mayor de 0, o había un valor de $P < 0.10$ en la Chi^2 de heterogeneidad. También se evaluó la heterogeneidad en el análisis de subgrupos.

Evaluación para reporte de sesgos.- si se sospechaba de sesgo de publicación, se trató de contactar a los autores para obtener la información de datos perdidos. Cuando no fue posible y los datos perdidos provocaban sesgo de publicación se realizó un análisis de sensibilidad. Se exploró el sesgo de publicación mediante el empleo de Gráfica de embudo. Análisis de sensibilidad.- si se identificaron suficientes estudios, se planeó realizar un análisis de sensibilidad. Se analizaron los siguientes desenlaces: Desenlaces neonatales (incidencia de SDR y mortalidad perinatal). Desenlaces maternos (Incidencia de efectos adversos).

Resultados.- En 18 estudios se estudiaron 1047 mujeres con 1077 recién nacidos. No se identificó diferencia significativa en la proporción de recién nacidos de mujeres que recibieron ambroxol comparados con las que recibieron betametasona. Se encontraron resultados similares en la mortalidad de los recién nacidos de madres que recibieron ambroxol en comparación con las que recibieron betametasona. No se encontró diferencia en la frecuencia de eventos adversos.

Conclusiones.- En los estudios incluidos existió un riesgo de sesgo no claro, por faltar la descripción de la secuencia de asignación, el cegamientos de los participantes, el personal y la evaluación. La evidencia científica es insuficiente para el uso de ambroxol en mujeres en riesgo de parto pretermino para prevenir síndrome de dificultad respiratoria neonatal.

Quorom

Área	Ítem	Calificación
Título	Se identifica el trabajo como RS o Meta de ECC	1
Resumen	Formato estructurado	1
	Objetivos claros	1
	Fuente de los datos	1
	Métodos de revisión : (validez interna, síntesis de datos cuantitativos)	1
	Resultados de ECA : incluidos, excluidos, IC y análisis por subgrupo	1
	Conclusión :	
Introducción	Fundamentos biológicos	1
Métodos	Búsqueda : algoritmo de búsqueda	1
	Selección : inclusión, exclusión de artículos; tipo de población y diseños de estudio.	1
	Evaluación validez : criterios utilizados para calificar calidad, enmascaramiento.	1
	Análisis de datos : Procesos duplicados, completados, independientes	1
	Características del estudio : tipo diseño, participantes, intervención, resultados, subgrupos	1
	Síntesis de datos : RR, IC, datos perdidos, evaluación de heterogeneidad, subgrupos	1
Resultados	Flujo de resultados : figura	1
	Características del estudio : diseño, edad, tamaño muestra, intervención, dosis, seguimiento, resultados	1
	Síntesis datos cuantitativos : tamaño efecto, IC, cuadros 2 x 2, DE	1
Discusión	Resumen de hallazgos clave, inferencias clínicas, sesgos y sugerir plan a futuro.	1
Total		100 (%)

Esta es una revisión sistemática de la literatura, la cual se realizó de acuerdo a las especificaciones del MECIR, por lo que están claramente especificados los puntos evaluados con la herramienta Quorum que se emplea para la evaluación de revisiones sistemáticas de ensayos clínicos. Se incluyeron únicamente ensayos clínicos aleatorios con alta calidad metodológica, los cuales fueron evaluados por dos investigadores; al momento del análisis no se encontró sesgo de publicación y el análisis se pudo realizar mediante metaanálisis de efectos fijos, además de evaluar en cada artículo las posibles fuentes de sesgo. Se encontró un efecto significativo en favor del empleo del ambroxol para la prevención de dificultad respiratoria en el recién nacido prematuro. Sin embargo aún faltan más estudios para poder establecer el papel definitivo de este medicamento.

Archivo 5

Significance of CASP8AP2 and H2AFZ expression in survival and risk of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia

Rocío Juárez-Velázquez, Adriana Reyes-León, Salas-Labadía C, Roberto Rivera-Luna, Liliana Velasco-Hidalgo, Gerardo López-Hernández, Norma López-Santiago, Rogelio Paredes-Aguilera, Aarón Domínguez-López, Roberto Bernáldez, Patricia Pérez-Vera *Leukemia & Lymphoma* 2014;early Online 1-7

La Leucemia Aguda Linfoblástica es el cáncer más común en la infancia. En México se reporta una incidencia de 62.5 casos por millón por año. La supervivencia ha aumentado de 10% en 1960 hasta 76-86% actualmente en países desarrollados. En algunos centros especializados en México se reporta una supervivencia global de leucemia aguda linfoblástica (LAL) pre B del 75%. El riesgo que tienen los pacientes de recaída se determina por características de alto riesgo ya sean clínicas, de laboratorio o por la respuesta al tratamiento. Sin embargo estos parámetros no son suficientes para establecer la estratificación de riesgo de todos los pacientes. Ya que existen pacientes con factores de bajo riesgo que presentan recaídas. Se han realizado estudios usando métodos genómicos de alta resolución en los que se han identificado nuevos marcadores moleculares para riesgo, que pueden eventualmente emplearse como blancos terapéuticos, entre estos se han encontrado Caspasa 8 asociado a la proteína 2 (CASP8AP2), Miembro de la familia de histona 2 (H2AFZ), Ikaron familia de dedos de zinc 1 (IKZF1) Kinasa Janus 2 (JAK2) y CRLF2. El gen CASP8AP2 también es conocido como FLICE o FLSH se localiza en el cromosoma 6q15. Este gen codifica una proteína con múltiples funciones que es reconocida como mediador en el proceso de apoptosis interaccionando con el domino efector de muerte de Caspasa 8. Diversos estudios han mostrado su participación en la división celular, en la señalización del factor nuclear KB (NF-KB), en activación de c-Myb, en la progresión de la fase S del ciclo celular y en la transcripción y maduración de la porción 3' del RNAm de histonas. Así mismo H2AFZ (también conocido como H2AZ, H2A/Z o H2A.Z localizado en 4q24) es altamente conservado en las histonas y se expresa independientemente de la replicación del DNA y está involucrado en diversos procesos biológicos, incluyendo la actividad transcripcional de genes, estabilidad y segregación de cromosomas y progresión del ciclo celular.

La significancia clínica de las CASP8AP2 in niños con LAL se reportó por Flotho et al, quien asocio diferencias en la expresión de genes con la respuesta a agentes de quimioterapia in vitro y con supervivencia libre de evento en pacientes. Niveles bajos de la expresión de CASP8AP2 predicen menor supervivencia libre de evento y mayor probabilidad de recaída. Flotho identificó otros 14 genes cuya expresión se asocia a enfermedad mínima residual positiva y baja expresión de CASP8AP2. H2AFZ fue uno de estos genes con baja expresión en pacientes con recaída. Los pacientes que tenían expresión baja de ambos, tenían respuesta sub óptima al tratamiento y eventualmente recaída. La utilidad de la expresión de CASP8AP2 en la identificación de pacientes con pronóstico adverso de LAL es controversial. Yang et al, no observaron asociación entre la expresión baja de CASP8AP2 y la presencia de recaída en pacientes con LAL. En contraste Jiao et al encontró que CASP8AP2 es un potencial marcador pronóstico. La expresión de H2AFZ no se ha evaluado en otras poblaciones de pacientes con LAL, debido a esto es importante comprender el comportamiento de CASP8AP2 y H2AFZ en pacientes pediátricos mexicanos con LAL. El objetivo de este estudio es evaluar el valor pronóstico de nivel de expresión de los genes de CASP8AP2 y H2AFZ y asociar estas características con la presencia de recaída, Supervivencia libre de evento y parámetros de riesgo clínicos y de laboratorio en una cohorte de pacientes con LAL tratados en instituciones mexicanas.

Material y Métodos

Selección de pacientes.- Pacientes con LAL registrados en el Instituto Nacional de Pediatría y Hospital del niño Poblano se reclutaron consecutivamente de febrero de 2008 a diciembre de 2010. Se tomaron muestras de médula ósea al momento del diagnóstico y se siguió su progresión clínica. 86 muestra fueron disponibles para análisis molecular. Se excluyeron los pacientes en los que el RNA no pudo ser obtenido y recibieron tratamiento. El estudio fue aprobado por los comités de ética institucionales. La leucemia fue clasificada por inmunofenotipo. El tratamiento se basó en el propuesto por el seguro popular que incluye los siguientes medicamentos: prednisona, L-asparaginasa, vincristina, metotrexate, etoposido, arabinosido de citosina, 6 mercaptopurina y doxorubicina.

Extracción de RNA.- Las células mononucleares fueron obtenidas de muestras de médula ósea usando centrifugación por gradiente de densidad. Las células purificadas fueron suspendidas en un buffer y guardadas en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción. El RNA fue extraído usando el Kit RNeasy de acuerdo con las instrucciones de manufactura.

Determinación de la expresión de los genes CASP8AP2 y H2AFZ.- La cuantificación relativa del nivel de expresión de los transcritos de CASP8AP2, H2AFZ y ABL1 se determinaron por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) usando el instrumento LightCycler 2.0. cDNA fue obtenido por métodos estándar. Se realizó PCR para amplificación cuantitativa del cDNA mediante la prueba de expresión de genes TaqMan del Universal Probe Library System. La expresión de genes fue analizada por duplicado. Basado en la descripción de Flotho y Yang et al, se dividieron los pacientes en tres grupos por percentiles de acuerdo al nivel de expresión de cada gen en bajo, medio y alto. El análisis de supervivencia libre de evento (SLE) se realizó considerando cada categoría de expresión de genes. El grupo de baja expresión de CASP8AP2 presentó una SLE inferior y fue estadísticamente diferente comparado con aquellos con expresión media y alta ($p=0.002$ y 0.011 respectivamente), no existió diferencia entre los grupos de expresión alta y media ($p=0.354$). Cuando se comparó el nivel de expresión de CASP8AP2 y H2AFZ se obtuvieron resultados similares (alto vs. Bajo $p=0.007$, medio vs. Bajo $p=0.03$, Alto vs. Medio ($p=0.317$). El análisis aplicado a la expresión de H2AFZ mostró una tendencia a la significancia entre los grupos bajo y alto, no existió diferencia entre las otras comparaciones. El análisis de supervivencia que la expresión alta y media tienen un comportamiento similar y solo en el grupo de expresión baja persistió la significancia. Basados en estas observaciones se combinaron los grupos de expresión media y alta en un solo grupo para comparar con el grupo de expresión baja.

Análisis Estadístico.- Se realizó análisis univariado y multivariados usando pruebas de tendencia central para caracterizar el muestra del estudio, se estableció la distribución para cada variable. Se realizó prueba exacta de Fisher para determinar la diferencia entre los grupos de los pacientes con o sin recaída y la expresión de CASP8AP2 y H2AFZ y las características clínicas. Se aplicó el método de Kaplan Meier para obtener SLE. Esta fue definida como el tiempo entre el diagnóstico y la presencia de recaída. Se realizó una regresión logística para evaluar el riesgo de recaída con el nivel de expresión de CASP8AP2 y H2AFZ y las características clínicas y de laboratorio. Se emplearon intervalos de confianza al 95%, se consideró un significado significativo con un valor de $p<0.05$. Se calcularon sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo. Se usó prueba de X^2 para determinar la diferencia entre el VPP de la cuenta de leucocitos y la expresión de CASP8AP2 y entre la recaída (temprana y tardía) y la expresión de CASP8AP2.

Resultados.- De los 86 pacientes, 74 fueron diagnosticados con LAL B y 12 con LAL T, de la expresión de CASP8AP2 y H2AFZ en el grupo de baja expresión se encontraron 32 y 31 pacientes respectivamente y en el grupo de medio/alto 54 y 55 pacientes respectivamente. 21 de los 86 pacientes presentaron una recaída, 18 temprana (antes de los 30 meses de haber iniciado el tratamiento) y tres

recayeron a los 32, 36 y 37 meses respectivamente, 15/74 (20%) tenían LAL B y 6/12 (50%) LAL T. La influencia de factores convencionales (genero, edad, cuenta de leucocitos, inmunofenotipo y genes de fusión) y de diferentes expresión de los genes fue evaluada en la recaída. Se encontró diferencia significativa con respecto a una cuenta elevada de leucocitos ($>50 \times 10^9/L$) y expresión baja de CASP8AP2 ($p < 0.05$). La edad y la presencia de genes de fusión no fue significativa. La expresión baja de CASP8AP2 fue significativamente más frecuente en pacientes con recaída temprana ($p < 0.05$).

Riesgo de recaída por clínica y característica de expresión de genes.- El OR del riesgo de recaída fue analizado de acuerdo a la presencia de cada factor de riesgo convencional y con la baja expresión de genes. Se observó un incremento en el riesgo de recaída en pacientes con leucemia con inmunofenotipo T (OR 3.93 IC 95% 1.10-13.94), cuenta leucocitaria alta (OR 6.05 IC 95% 2.03-17.98) y baja expresión del gen CASP8AP2 (OR 3.93 IC 95% 1.40-11.02). En un análisis multivariado se estudiaron estos parámetros y se encontró diferencia significativa en la cuenta leucocitaria alta y la baja expresión del gen CASP8AP2 (OR 1.72 IC95% 0.004-5.35 y OR 1.14 IC95% 0.28-3.40 respectivamente).

Análisis de supervivencia para grupos de expresión de CASP8AP2 y H2AFZ.- Se emplearon curvas de Kaplan-Meier para estimar el impacto de la expresión de los genes CASP8AP2 y H2AFZ. Se observó mejor supervivencia libre de recaída (log-rank $p = 0.001$) en pacientes con expresión media/alta del gen CASP8AP2 en comparación con los de expresión baja. Se observó lo mismo en el análisis de la expresión del gen H2AFZ, sin embargo la diferencia no fue significativa. El grupo de pacientes con baja expresión de ambos genes mostraron menor supervivencia libre de recaída y libre de evento ($p < 0.001$) comparado con los que tenían expresión medio/alta o con baja expresión solo de un gen.

Valor predictivo de la cuenta de leucocitos, y expresión de CASP8AP2 y H2AFZ en recaída.- El valor predictivo para recaída para la expresión baja de los genes fue determinado. Para la comparación se usó como referencia la cuenta leucocitaria alta porque es un factor predictivo de recaída bien establecido. Este análisis mostró que el valor predictivo positivo y negativo del nivel bajo de expresión baja de ambos genes fue cercano al valor determinado de la cuenta de leucocitos $X^2 p = 0.15$.

Discusión.- Se han realizado estudios genómicos para encontrar marcadores de riesgo genéticos que permitan estratificar a los niños con LAL en grupos de riesgo al diagnóstico. De los genes asociados con respuesta adversa al tratamiento, bajos niveles de expresión de CASP8AP2 y H2AFZ se han asociado con una mayor incidencia de recaída. El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de estos dos genes al diagnóstico en un grupo de niños con LAL. La función proapoptótica de CASP8AP2, su baja expresión en blastos de pacientes con enfermedad residual mínima, y la resistencia celular a drogas observada cuando el promotor de CASP8AP2 es metilado, sugieren que este gen puede estar implicado en una respuesta subóptima al tratamiento. Nuestros resultados muestran que los pacientes con expresión baja de CASP8AP2 tienen menor supervivencia libre de recaída y supervivencia libre de evento, estos resultados concuerda con los publicados por Flotho et al. Sin embargo la utilidad de la CASP8AP2 como marcador de riesgo continua siendo controversial, Yang et al no encontró significancia biológica en un grupo de 90 pacientes con LAL de Taiwan. La base biológica de la variación de la expresión de CASP8AP2 puede estar asociada con la ocurrencia de una deleción en la región 6q15q16.1, que corresponde a la localización del gen. En pacientes con LAL T se ha demostrado que el resultado de esta deleción resulta en disminución de la expresión de CASP8AP2, estos resultados se han asociado a la presencia de enfermedad mínima residual. Se ha reportado una extensa variación en la incidencia de la deleción 6q15q16.1 que va del 11 al 32% de los niños con LAL de ambos linajes (16% en LAL B y 11% en LAL T). Esta deleción se ha asociado con características adversas como hiperleucocitosis. En adultos con LAL T esta deleción es particularmente frecuente (50%) y se asocia con una progresión clínica desfavorable.

Un nivel bajo de expresión de H2AFZ se ha asociado a resistencia a quimioterapia en estudios in vitro. Se ha observado que la inhibición de la expresión de CASP8AP2 afecta la transcripción y procesamiento de la familia de histonas H2A. Estos hallazgos sugieren que estos dos genes convergen en un proceso funcional, sin embargo el mecanismo de interacción no está bien establecido.

STROBE

	Recomendación	Puntaje
Título y resumen	1 (a) Indique, en el título o en el resumen, el diseño del estudio con un término habitual (b) Proporcione en el resumen una sinopsis informativa y equilibrada de lo que se ha hecho y lo que se ha encontrado Introducción	1 1
Contexto/fundamentos	2 Explique las razones y el fundamento científicos de la investigación que se comunica	1
Objetivos	3 Indique los objetivos específicos, incluida cualquier hipótesis pre especificada	1
Métodos		
Diseño del estudio	4 Presente al principio del documento los elementos clave del diseño del estudio	1
Contexto	5 Describa el marco, los lugares y las fechas relevantes, incluido los períodos de reclutamiento, exposición, seguimiento y recogida de datos	1
Participantes	6 (a) Estudios de cohortes: proporcione los criterios de elegibilidad, así como las fuentes y el método de selección de los participantes. Especifique los métodos de seguimiento (b) Estudios de cohortes: en los estudios apareados, proporcione los criterios para la formación de parejas y el número de participantes con y sin exposición	1 0
VARIABLES	7 Defina claramente todas las variables: de respuesta, exposiciones, predictoras, confusoras y modificadoras del efecto. Si procede, proporcione los criterios diagnósticos	1
Fuentes de datos/medidas	8* Para cada variable de interés, proporcione las fuentes de datos y los detalles de los métodos de valoración (medida). Si hubiera más de un grupo, especifique la comparabilidad de los procesos de medida	1
Sesgos	9 Especifique todas las medidas adoptadas para afrontar fuentes potenciales de	

	sesgo	1
Tamaño muestral	10 Explique cómo se determinó el tamaño muestral	1
VARIABLES CUANTITATIVAS	11 Explique cómo se trataron las variables cuantitativas en el análisis. Si procede, explique qué grupos se definieron y por qué	1
MÉTODOS ESTADÍSTICOS	12 (a) Especifique todos los métodos estadísticos, incluidos los empleados para controlar los factores de confusión	1
	(b) Especifique todos los métodos utilizados para analizar subgrupos e interacciones	0
	(c) Explique el tratamiento de los datos ausentes (missing data)	1
	(d) Estudio de cohortes: si procede, explique cómo se afrontan las pérdidas en el seguimiento	0
Resultados	13* (a) Describa el número de participantes en cada fase del estudio; por ejemplo: cifras de los participantes potencialmente elegibles, los analizados para ser incluidos, los confirmados elegibles, los incluidos en el estudio, los que tuvieron un seguimiento	1
Participantes		
Datos descriptivos	completo y los analizados	
	(b) Describa las razones de la pérdida de participantes en cada fase	1
	(c) Considere el uso de un diagrama de flujo	0
	14* (a) Describa las características de los participantes en el estudio (p. ej., demográficas, clínicas, sociales) y la información sobre las exposiciones y los posibles factores de confusión	1
	(b) Indique el número de participantes con datos ausentes en cada variable de interés	1
	(c) Estudios de cohortes: resuma el período de seguimiento (p. ej., promedio y total)	

Datos de las variables	<p>15* Estudios de cohortes: describa el número de eventos resultado, o bien proporcione medidas resumen a lo largo del tiempo de resultado</p> <p>16 (a) Proporcione estimaciones no ajustadas y, si procede, ajustadas por factores de confusión, así como su precisión</p> <p>(p. ej., intervalos de confianza del 95%). Especifique los factores de confusión por los que se ajusta y las razones para incluirlos</p> <p>(b) Si categoriza variables continuas, describa los límites de los intervalos</p> <p>(c) Si fuera pertinente, valore acompañar las estimaciones del riesgo relativo con estimaciones del riesgo absoluto para un período de tiempo relevante</p>	<p>1</p> <p>1</p> <p>1</p> <p>1</p>
Resultados principales	17 Describa otros análisis efectuados (de subgrupos, interacciones o sensibilidad)	1
Discusión		
Resultados clave	18 Resuma los resultados principales de los objetivos del estudio	1
Limitaciones	19 Discuta las limitaciones del estudio, teniendo en cuenta posibles fuentes de sesgo o de imprecisión. Razone tanto sobre la dirección como sobre la magnitud de cualquier posible sesgo	1
Interpretación	20 Proporcione una interpretación global prudente de los resultados considerando objetivos, limitaciones, multiplicidad de análisis, resultados de estudios similares y otras pruebas empíricas relevantes	1
Generabilidad	21 Discuta la posibilidad de generalizar los resultados (validez externa)	1
Otra información	22 Especifique la financiación y el papel de los patrocinadores del estudio y, si procede, del estudio previo en el que se basa el presente artículo	1
Financiación		
TOTAL		87%

Este es un estudio de Cohorte, donde se evaluaron pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica, respecto a la expresión de dos genes CASP8AP2 y H2AFZ y su relación con factores de riesgo y el pronóstico que tiene estos pacientes. Su principal sesgo es que los valores de corte de la expresión de los genes de determinaron de acuerdo a lo establecido en otros estudios como alta/media y baja expresión. Se observó que el grupo de pacientes con expresión baja del gen tenían mayor frecuencia de factores de alto riesgo, así como menor supervivencia libre de evento. Con la herramienta STROBE la calificación de este artículo es del 87%, ya que cumple con la mayoría de los criterios evaluados, por lo que los resultados de este estudio son confiables en cuanto a su calidad metodológica, permitiendo generalizar los datos a la población pediátrica mexicana con leucemia aguda linfoblástica.

ANEXO 1.

CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN

Por este medio y en acuerdo a las Buenas Prácticas Clínicas, en este acto otorgo el consentimiento bajo forma voluntaria como padre, madre o tutor, directamente responsable del cuidado y atención del paciente, formar parte del estudio que se realiza en el Servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría, llamado **“Eficacia y seguridad cardiaca de la doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane para el tratamiento de los pacientes pediátricos con diagnóstico de sarcoma. Ensayo Clínico Controlado”**

Se me ha informado que mi hijo (a) tiene el diagnóstico de _____ el cual es un tumor canceroso, que se encuentra en una etapa _____, y ha afectado los siguientes sitios _____ . De acuerdo con la etapa en la que se encuentra el tumor la posibilidad de curarse de la enfermedad es de _____. Para poder alcanzar esta posibilidad de curación es necesario dar tratamiento con quimioterapia, para los que usamos varios medicamentos, uno de los cuales es la doxorubicina. La doxorubicina es un medicamento que destruye las células tumorales por diversas formas, sin embargo tiene efectos adversos diferentes como que baja las defensas, las plaquetas y la hemoglobina. Así mismo puede en algunos casos causar daño al corazón, por lo cual se han buscado métodos para prevenir este daño, hasta el momento se sabe que hay medicamentos que pueden proteger al corazón estos son: el dexrazoxane (cardioxane) o la doxorubicina pegilada (doxo peg).

1.- ¿En qué consiste este estudio? :

Dicho estudio consiste en la utilización de dos esquemas distintos de quimioterapia para proteger el corazón del paciente los cuales son: doxorubicina convencional con cardioxane o doxorubicina pegilada, en pacientes pediátricos con diagnóstico de Sarcomas óseos o de partes blandas; dicho estudio se realizará durante 2 años la vigilancia y 1 año de seguimiento

2.- ¿Cómo se realiza? :

El estudio consiste en emplear dos diferentes tipos de quimioterapia que sirven como protectores del corazón estos son la doxorubicina convencional más dexrazoxane o doxorubicina pegilada, esto como parte del esquema de quimioterapia que se debe emplear por el diagnóstico y estadio de los pacientes establecidos por los Protocolos Nacionales de Tratamiento, mi hijo se asignará al azar para recibir una u otra estrategia de tratamiento.

Se realizaran todos los estudios necesarios para tener el diagnóstico completo del paciente, y se realizaran estudios de sangre (Troponina T), así como ecocardiograma y electrocardiograma para monitorizar la función de su corazón de manera estrecha y con esto poder valorar si hay o no daño en su corazón.

3.- ¿Puede tener alguna complicación? :

El objetivo de la quimioterapia es destruir las células malignas sin embargo también afecta células buenas en el organismo principalmente las que se forman en la médula ósea, por lo que los pacientes después de el empleo de cualquier tipo de quimioterapia pueden presentar baja de plaquetas, de hemoglobina y de defensas (neutrófilos), por lo que pueden tener anemia, sangrados, complicaciones en el corazón, en la piel, afección renal o infecciones en cualquier lugar del cuerpo estos pueden ser leves o graves incluso llegando a poner en riesgo la vida del paciente. El emplear alguno de los dos tipos de medicamentos de estudio no conlleva un riesgo mayor del ya existente por el empleo de la quimioterapia necesaria para el tratamiento de los sarcomas.

Sin embargo en todos los pacientes que reciben quimioterapia se toman las medidas necesarias para tratar de prevenir estos efectos no deseados y en caso de presentarse tratarse de manera oportuna evitando complicaciones. En caso de presentar algún efecto no deseado, se notificará al médico encargado de la Terapia Intensiva, al investigador titular de este protocolo, al comité de investigación, de ética y a su familiar; se iniciará el tratamiento específico para el tipo de complicación, y se vigilarán las condiciones clínicas de paciente.

Los gastos que genere este protocolo serán cubiertos por el Seguro Popular, tanto en muestras de laboratorio, gabinete como las complicaciones, efectos colaterales y adversos que llegaran a presentarse para cualquier esquema de quimioterapia que le estén administrando a mi paciente.

Ante todo lo anterior estoy enterado y acepto que tal procedimiento forma parte del manejo que mi paciente requiere y de los beneficios que con ellos se pretende lograr, del mismo modo estoy consciente y se me ha explicado el procedimiento a realizar.

Al firmar esta carta hago constar que he sido informado de los riesgos que corre mi paciente, conozco el estado actual de su enfermedad y el procedimiento al que será sometido, y que en caso de complicaciones derivadas de factores propios de la enfermedad de mi paciente, como factores externos que pueden modificar el estado, así como situaciones de urgencia que pueden presentarse en cualquier momento durante y posterior al manejo de mi paciente y que no son previsibles; autorizo al personal de la Institución para que actúe con libertad prescriptiva bajo los principios científicos y éticos que orientan la práctica médica.

En caso de no aceptar que mi paciente ingrese al estudio, esto no modificará en forma alguna el tratamiento que se realice a mi paciente en las mejores condiciones posibles.

También se me ha aclarado que en caso de aceptar su inclusión en el estudio, puedo decidir no continuar con el estudio en cualquier momento y no habrá ninguna sanción por este motivo.

Cabe mencionar que la información que se obtenga de mi paciente se mantendrá en absoluta confidencialidad y respeto por parte de los investigadores de dicho protocolo; se me informarán los resultados obtenidos y su inclusión a dicho estudio no causará ningún costo para el paciente. Así mismo el paciente no recibirá ninguna remuneración económica por su participación en este estudio.

Se otorga el presente Consentimiento Bajo Información en la Ciudad de México, Distrito Federal a los _____ días del mes de _____ del año _____

Nombre completo y firma del padre: _____

Nombre completo y firma de la madre : _____

Dirección: _____

Nombre y firma de testigo: _____

Nombre y firma de testigo: _____

Nombre del investigador responsable : _____

Teléfono : _____

Firma : _____

Investigador responsable: Dr. Roberto Rivera Luna.

Av. Insurgentes Sur 3700, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, 04530

México, D.F. Tel: 10840900

*Se dará copia del consentimiento informado al familiar responsable y se guardará esta carta de consentimiento informado durante los próximos 5 años y se asegurará la confidencialidad de los pacientes.

c/copia al protocolo y al familiar

CARTA DE ASENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN

“Eficacia y seguridad cardiaca de la doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane para el tratamiento de los pacientes pediátricos con diagnostico de sarcoma. Ensayo Clínico Controlado”

Por este medio y en acuerdo con las Buenas Práctica Clínicas, en esta carta doy el permiso en forma voluntaria yo _____ (paciente) para participar en el estudio del servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría, llamado **“Eficacia y seguridad cardiaca de la doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane para el tratamiento de los pacientes pediátricos con diagnostico de sarcoma. Ensayo Clínico Controlado”**

¿En qué consiste el estudio?

Consiste en usar dos tipos diferentes de tratamiento que me protegen el corazón en diferente forma (doxorubicina pegilada y doxorubicina convencional con dexrazoxane); para que me puedan estudiar durante las consultas la disminución del tumor y si hay daño al corazón estudiándolo con 4 muestras de sangre o radiografías en 1 año.

¿Cómo se realiza?

Durante el tratamiento se me dará uno de los dos medicamentos, y para ver si hay daño en el corazón me tomaran sangre para ver si existe un componente (Troponina T) estas se tomaran antes de iniciar el primer el tratamiento, 1 día después de cada quimioterapia, a los 6 meses y al año de haberme curado del cáncer. Los otros estudios del corazón (ecocardiograma y electrocardiograma) me los realizarán conforme indique mi doctor.

¿Puedo tener alguna complicación?

El objetivo del tratamiento es matar el cáncer, sin embargo también afecta órganos buenos, por lo que los pacientes después de usar la quimioterapia pueden tener sangrado, anemia e infecciones en cualquier lugar del cuerpo; sin embargo a todos se les hace tratamientos necesarios para evitar estos efectos y el empleo de esta quimioterapia no trae otras complicaciones diferentes a la utilizada de forma rutinaria.

En caso de presentar algún efecto no deseado se le notificará al doctor titular de este protocolo, al comité de investigación, de ética y a mis padres; y se dará tratamiento de las complicaciones.

Ante todo lo anterior estoy enterado y acepto que este estudio es parte una investigación que ayudará a niños como yo para saber cual es el mejor método para proteger al corazón de la quimioterapia; del mismo modo estoy consciente y se me ha explicado el procedimiento a realizar.

Al firmar esta carta hago constar que he sido informado de los riesgos que puedo presentar, conozco el estado actual de mi padecimiento y el procedimiento al que seré sometido, y que en caso de complicaciones autorizo al personal de la Institución para que actúe con libertad prescriptiva bajo los principios científicos y éticos que orientan la práctica médica.

En caso de no aceptar mi participación en el estudio, no modificará en forma alguna el tratamiento que se me realice en las mejores condiciones posibles.

También se me ha aclarado que en caso de aceptar mi ingreso al estudio, puedo decidir no continuarlo en cualquier momento.

Cabe mencionar que mi información se mantendrá en absoluta confidencialidad y respeto por parte de los investigadores de dicho protocolo, en caso de duda; se me informarán los resultados obtenidos y mi ingreso a este estudio no causará costos a mis papas.

Se otorga el presente Consentimiento Bajo Información en la Ciudad de México, Distrito Federal a los _____ días del mes de _____ del año _____.

Nombre completo y firma: _____

Dirección: _____

*Nombre y firma del testigo: _____

Dirección del testigo: _____

Relación con el paciente: _____

*Nombre y firma del testigo: _____

Dirección del testigo: _____

Relación con el paciente: _____

Investigador responsable: Dr. Roberto Rivera Luna.

Av. Insurgentes Sur 3700, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, 04530

México, D.F. Tel: 10840900

*Se dará copia del consentimiento informado al familiar responsable y se guardará esta carta de consentimiento informado durante los próximos 5 años y se asegurará la confidencialidad de los pacientes.

ANEXO 2.

Tabla de números aleatorios

Doxorrubicina Pegilada	Doxorrubicina convencional con dexrazoxane
7	1
2	6
3	8
9	5
4	10
<hr/>	
	Bloque 1
2	1
8	4
5	3
7	9
6	10
<hr/>	
	Bloque 2
3	8
4	6
5	7
1	10
2	9
<hr/>	
	Bloque 3
10	7
1	2
9	5
8	3
6	4
<hr/>	
	Bloque 4
3	9
5	7
4	2
6	10
1	8
<hr/>	
	Bloque 5
6	4
8	3
9	1
7	2
10	5
<hr/>	
	Bloque 6
1	5
4	6
8	3
9	10
7	2
<hr/>	
	Bloque 7

ANEXO 3.

CARACTERÍSTICAS DE LA EVALUACIÓN

La evaluación de la respuesta a la quimioterapia se realizará conforme a lo establecido por los Protocolos Nacionales de Tratamiento de cada patología. Se muestra en las siguientes tablas.

OSTEOSARCOMA	
Tomografía de pulmón	Cada 4 semanas (Equivale a tres cursos de Quimioterapia)
Resonancia Magnética del Primario	Cada 4 semanas (Equivale a tres cursos de Quimioterapia)

SARCOMA DE EWING	
Tomografía de pulmón	Cada 9 semanas (Equivale a tres cursos de Quimioterapia)
Resonancia Magnética o Tomografía del Primario	Cada 9 semanas (Equivale a tres cursos de Quimioterapia)

RABDOMIOSARCOMA	
Tomografía de pulmón	Cada 9 semanas (Equivale a tres cursos de Quimioterapia)
Resonancia Magnética o Tomografía del Primario	Cada 9 semanas (Equivale a tres cursos de Quimioterapia)

SARCOMA NO RABDOMIOSARCOMA	
Tomografía de pulmón	Cada 9 semanas (Equivale a tres cursos de Quimioterapia)
Resonancia Magnética o Tomografía del Primario	Cada 9 semanas (Equivale a tres cursos de Quimioterapia)

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

SERVICIO DE ONCOLOGIA

“Eficacia y seguridad cardiaca de la doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane para el tratamiento de los pacientes pediátricos con diagnostico de sarcoma. Ensayo Clínico Controlado”.

Nombre: _____ Registro: _____

Edad en meses _____ Teléfono _____

Diagnóstico _____ Estadificación _____

Fecha del diagnóstico : __ / __ / __ (día/mes/año)

Fecha de Inicio de tratamiento: __ / __ / __ (día/mes/año)

Fecha de recaída : __ / __ / __ (día/mes/año)

Muerte : si no

Fecha de muerte : __ / __ / __ (día/mes/año)

Maniobra

Doxorubicina Pegilada

Doxorubicina convencional con dexrazoxane

Dosis de Doxorubicina

Variables	1er Curso	2do Curso	3er Curso	4to Curso	5to Curso	6to Curso	Curso
Peso (kg)							
Superficie Corporal (m2sc)							
Quimioterapia (dosis)							

“Eficacia y seguridad cardiaca de la doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane para el tratamiento de los pacientes pediátricos con diagnostico de sarcoma. Ensayo Clínico Controlado”.

Estudios Laboratorio

Variables	Basal	2do Curso	3er Curso	4to Curso	5to Curso	6to Curso	Curso
Hemoglobina (g/dl)							
Leucocitos							
Neutrófilos							
Plaquetas							
Creatinina (mg/dl)							
Bilis Totales (umol/l)							
Bilis Directa (umol/l)							
Bilis Indirecta (umol/l)							
AST							
ALT							
GGT							
DHL							
FA							
Depuración creat (ml/m2/d)							
EKG							

ECO y Troponina T

Dosis acumulada de Doxorrubina	Basal	100 mg/m2	200 mg/m2	300 mg/m2	400 mg/m2	6 meses	12 meses
Troponina (ng/dl)							
Fracción Eyección VI.							

Estudios de Gabinete

Variables	Basal	1ra Ev.	2da Ev.	3ra Ev.	4ta Ev.	5ta Ev.	Ev.
TAC primario							
IRM primario							
TAC pulmón							
Otras TAC							
Gamagrama óseo							

“Eficacia y seguridad cardiaca de la doxorubicina pegilada liposomal vs. doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane para el tratamiento de los pacientes pediátricos con diagnóstico de sarcoma. Ensayo Clínico Controlado”.

Valoración Toxicidad

Variables	Basal	1ra Ev.	2da Ev.	3ra Ev.	4ta Ev.	5ta Ev.	Ev.
Cardiaca							
Hematológica							
Renal							
Gastrointestinal							
Dermatológica							

* Nota : ausente / presente

Anexo 6. Aprobación Comité de Investigación y Ética Instituto Nacional de Pediatría

INP

Instituto Nacional de Pediatría

COMITÉ DE ÉTICA

"2010. Año de la Patria, Bicentenario del inicio de la Independencia y Centenario del inicio de la Revolución"

SECRETARÍA DE SALUD



México, D.F. 26 de noviembre de 2010

REF: CE/588/2010

DR. ROBERTO RIVERA LUNA
INVESTIGADOR RESPONSABLE
PRESENTE

Estimado Dr. Rivera:

El Comité de Ética del Instituto Nacional de Pediatría con fundamento en los conceptos éticos que atañen actualmente a la investigación biomédica en Pediatría se permite evaluar el Protocolo, Carta de Consentimiento informado, así como documentos adjuntos, en la sesión ordinaria del 23 de noviembre del presente año.

"EFICACIA Y SEGURIDAD CARDIACA DE LA DOXORRUBICINA PEGILADA LIPOSOMAL VS. DOXORRUBICINA CONVENCIONAL COMBINADA CON DEXRAZOXANE PARA EL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES PEDIÁTRICOS CON DIAGNÓSTICO DE SARCOMA, ENSAYO CLÍNICO CONTROLADO"

El Protocolo, la Carta de Consentimiento Informado y los documentos anexos, reúnen las consideraciones éticas previstas en las normas vigentes para tales fines. De tal manera que el Comité de Ética de este Instituto considera que no encuentra inconveniente para la realización de la investigación.

DICTAMEN: APROBADO

El Comité agradecerá se sirva presentar informe de los eventos adversos, así como un informe semestral referente al estado actual del desarrollo del proyecto y al finalizar el mismo.

ATENTAMENTE

DR. MARCO ANTONIO YAMAZAKI N.
PRESIDENTE



C.c.p. Dr. Pedro Gutiérrez Castellón.- Director de Investigación
Dra. Ariadna González del Ángel.-Subdirectora de Investigación Médica.
MAYN/mcc



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA



SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

México, D.F.; a 16 de Diciembre de 2013.
REF.: CI/MDCB/471/2013.

DR. ROBERTO RIVERA LUNA
INVESTIGADOR RESPONSABLE
P R E S E N T E:

Me dirijo a usted en forma atenta, enviándole un cordial saludo y con la finalidad de hacer de su conocimiento que en la pasada sesión ordinaria de este Comité, se dio lectura a su oficio sin referencia, fechado el 19 de Noviembre de 2013; en el cual, solicita prórroga por 36 meses para el proyecto: 035/2010 "Eficacia y Seguridad Cardíaca de la Doxorubicina Pegilada Liposomal vs. Doxorubicina convencional combinada con dexrazoxane para el tratamiento de los pacientes pediátricos con diagnóstico de Sarcoma. Ensayo Clínico Controlado", debido a que se han incluido 25 de 75 pacientes requeridos para el estudio.

El Comité autoriza la prórroga solicitada.

Sin más por el momento, quedo de usted.

Atentamente.


Dr. Silvestre García de la Puente.
Secretario Técnico del Comité de Investigación.

C.c.p.-Consecutivo.



REFERENCIAS

- ¹ Loeb DM, Thornton K, Shokek O. Pediatric Soft Tissue Sarcomas. *Surg Clin N AM*. 2008;88:615-62
- ² Spunt SL, Skapek SX, Coffin CM. Pediatric Nonrhabdomyosarcoma Soft Tissue Sarcomas. *The Oncologist*. 2008;13:668-678
- ³ Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. *The Oncologist* 2004;9:422-441
- ⁴ Rodríguez-Galindo C, Navid F, Khoury J, Krasin Ewing sarcoma family of tumors. Cap 9. En: Pappo A: *Pediatric Bone and Soft Tissue Sarcomas*. Springer, Berlin pp 181-217, 2006.
- ⁵ Oberlin O, Le Deley MC, N'Guyen Bui B, et al: Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumours: The third study of the French Society of Pediatric Oncology (EW88 study). *Br J Cancer* 85: 1646-1654, 2001.
- ⁶ Ruggiero A, Ridola V, Puma N, et al. Anthracycline cardiotoxicity in childhood. *Pediatric Hematology and Oncology*. 2008;25:261-281
- ⁷ Hernan E, Lipshultz S, Rifai N, et al. Use of cardiac troponin T levels as an indicator of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Can Res*. 1998 ;38:195-197
- ⁸ Myers C. Role of iron in anthracycline action. In: Hacker M, Jazo J, Tritton T eds. *Organ directed toxicities of anticancer drugs*. Boston : Martinus Nijhoff, 1988:153-158
- ⁹ Minow R, Benjamín R, Lee E, et al. Adriamycin cardiomyopathy risk factors. *Cancer*. 1977;39:1397-1402
- ¹⁰ Barry E, Lipshultz S, Sallan S. Anthracycline induced cardiotoxicity. *Current Pathophysiology, Prevention and Management*. Expert Opin Pharmacother. 2007;8:1039-1058
- ¹¹ Van Dalen EC, Van Der Pal HJ, Kok WE, et al. Clinical Heart failure in a cohort of children treated with anthracyclines: a long-term follow-up study. *Eur J Cancer*. 2006;42:3191-3198
- ¹² Lipshultz SE, Colan SD, Gelbert RD, et al. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med*. 1991;324:808-815
- ¹³ Hequet O, Le QH, Moullet I, et al. Subclinical late cardiomyopathy after doxorubicin therapy for lymphoma in adults. *J Clin Oncol*. 2004;22:1864-1871
- ¹⁴ Krischer JP, Epstein S, Cuthbertson DD, et al. Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer :The Pediatric Oncology Group experience. *J. Clin Oncol*. 1997;15:1544-1552
- ¹⁵ Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, et al. Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *N Engl J Med*. 1995; 332:1738-1743
- ¹⁶ Pein F, Sakiroglu O, Dahan M, et al. Cardiac abnormalities 15 years and more after adriamycin therapy in 229 childhood survivors of a solid tumor at the Institut Gustave Roussy. *Br J Cancer*. 2004;91:37-44
- ¹⁷ Theodoulou M, Hudis C. Cardiac profiles of liposomal anthracyclines: greater cardiac safety versus conventional doxorubicin? *Cancer* 2004;100:2052-2063
- ¹⁸ Legha SS, Benjamín SR, Mackay B, et al. Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med*. 1982;96:133-139
- ¹⁹ Van Dalen EC, Van Der Pal HJ, Caron HN, et al. Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in cancer patients receiving anthracycline chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;4:005-008

-
- ²⁰ Lipshultz SE, Rifai N, Dalton VM, et al. The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2004;351:145-153
- ²¹ Muñoz A, Maldonado M, Pardo N, Fernández JM, et al. Pegylated Liposomal Doxorubicin Hydrochloride (PLD) for Advanced Sarcomas in Children: Preliminary Results. *Pediatr Blood Cancer.* 2004;43:152-155
- ²² Huang SK, Stauffer PR, Hong K, Guo JW, Philips TL, et al. Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in spherically stabilized liposomes. *Cancer Res.* 1994;54:2186-2191
- ²³ Fujisaka Y, Horiike A, Shimizu T, et al. Phase I Clinical Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin (JNS002) in Japanese Patients with Solid Tumor. *Jpn J Clin Oncol.* 2006;36:768-774
- ²⁴ Eng C, Mauer AM, Fleming GF, et al. Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin, paclitaxel, and cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology.* 2001;12:1743-1747
- ²⁵ Nielsen OS, Peichardt P, Christensen TB, et al. Phase I European Organisation for research and treatment of cancer determining safety of pegylated liposomal doxorubicin (caelyx) in combination with ifosfamide in previously untreated adult patients with advanced or metastatic soft tissue sarcomas. *Eur J Can* 2006;42:2303-2309
- ²⁶ Halm U, Etzrodt I, Schifke I, et al. A phase II study of pegylated liposomal doxorubicin for treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Annals of Oncology* 2000;11:113-114
- ²⁷ Di Lorenzo G, Rea A, Carlomagno C, et al. Activity and safety of pegylated liposomal doxorubicin, 5-fluorouracil and folinic acid in inoperable hepatocellular carcinoma: A phase II study. *WJG* 2007; 13:6553-6557
- ²⁸ Hong RL, Tseng YL. A phase II and pharmacokinetic study of pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;51:433-438
- ²⁹ Alexopoulos A, Karamouzis MV, Stavrinides H, et al. Phase II study of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) and docetaxel as first-line treatment in metastatic breast cancer. *Annals of Oncology.* 2004;15:891-895
- ³⁰ Katsaros D, Oletti MV, Rigault de la Longrais IA, et al. Clinical and pharmacokinetic phase II of pegylated liposomal doxorubicin and vinorelbine in heavily pretreated recurrent ovarian carcinoma. *Annals of Oncology.* 2005;16:300-306
- ³¹ Cervantes A, García T, Martínez E, et al. Polyethylene glycol-liposomal doxorubicin (Caelyx) in relapses of cisplatin refractory ovarian carcinoma. *Eur J Cancer.* 1999;35:187
- ³² Pulini S, Rupoli S, Goteri G, et al. Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of primary cutaneous T-cell lymphomas. *Haematologica.* 2007;92:686-689
- ³³ Bafaloukos D, Papadimitriou C, Linardou H, et al. Combination of pegylated liposomal doxorubicin and paclitaxel in patients with advanced soft tissue sarcoma: a phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Br J Cancer.* 2004;91:1639-1644
- ³⁴ Judson I, Radford JA, Harris M, Blay JY, et al. Randomised phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil/Caelix) versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma: a study by the EORTC Soft Tissue and bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2001;37:870-877.
- ³⁵ Safra T, Muggia F, Jeffers S, Tsao-Wei DD, et al. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): Reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative dose of 500mg/m². *Annals of Oncology.* 2000;11:1029-1033

³⁶ O'Brien MER, Wigler N, Invar M et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2004;15:440-449

³⁷ Marina NM, Cochrane D, Harney E, Zomorodi K et al. Dose Escalation and Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin (Doxil) in Children with Solid Tumors: A Pediatric Oncology Group Study. *Clinical Cancer Research*. 2002;8:413-418

³⁸ Muñoz A, Maldonado M, Pardo N, et al. Pegylated Liposomal Doxorubicin Hydrochloride for Advanced Sarcoma in Children: Preliminary Results. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;43:152-155

³⁹ Wagner S, Peters O, Fels C, et al. Pegylated-liposomal doxorubicin and oral topotecan in eight children with relapsed high-grade malignant brain tumors. *J Neurooncol*. 2008; 86:175-181

⁴⁰ Lorusso D, Di Stefano A, Carone V, et al. Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia (hand-foot syndrome). *Annals of Oncology*. 2007;18:1159-1164

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación del tratamiento con VAMP más radioterapia a campos involucrados, en pacientes pediátricos mexicanos con estadio temprano de linfoma de Hodgkin

Evaluation of treatment with VAMP plus involved-field radiation in Mexican pediatric patients with early-stage Hodgkin lymphoma

Alberto Olaya-Vargas¹, Liliana Velasco-Hidalgo¹, Roberto Rivera-Luna³, Fabián Suastegui¹, Amador Zarco²

¹Servicio de Oncología, ²Servicio de Radioterapia, ³División de Hemato-Oncología del Instituto Nacional de Pediatría, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., México.

Resumen

Introducción. Objetivo: evaluar la supervivencia y toxicidad de pacientes con diagnóstico de linfoma de Hodgkin en etapa favorable tratados con quimioterapia con VAMP (vinblastina, doxorubicina, metotrexate, prednisona) y bajas dosis de radioterapia a campos comprometidos.

Métodos. Se incluyeron pacientes con etapas favorables tratados con 4 ciclos de VAMP (vinblastina 6 mg/m²sc, doxorubicina 25 mg/m²sc, metotrexate 20 mg/m²sc y prednisona 40 mg/m²sc). Administrándose en los días 1 y 15; más radioterapia a campos comprometidos (21.6 Gy). La supervivencia se determinó por curvas de Kaplan-Meier y se ajustaron con la prueba de Cox.

Resultados. Se incluyeron 17 pacientes, con media de edad de 7 años. Dos pacientes recayeron, uno a los 4 y otro a los 16 meses. La supervivencia global fue de 94.12%, con seguimiento de 66 meses (intervalo de confianza de 95% [IC95%]). La supervivencia libre de evento fue de 88.24% con seguimiento de 63 meses (IC 95%).

Summary

Introduction. Purpose: To evaluate outcome and assess toxicity of patients with early-stage Hodgkin lymphoma treated with VAMP and low-dose involved-field radiation.

Methods. Patients with clinical favorable stages Hodgkin lymphoma were treated with 4 cycles of VAMP (vinblastine 6 mg/m²sc, doxorubicin 25 mg/m²sc, methotrexate 20 mg/m²sc, and prednisone 40 mg/m²sc) administered on day 1 and day 15. And 21.6 Gy involved-field radiation. The overall survival was estimated using Kaplan-Meier and Cox methods.

Results. 17 patients were included, the median age was 7 years. Two patients present progressive disease at 4 and 16 months respectively. The overall survival were 94.12% with follow-up of 66 months (IC 95%), the event-free survival were 88.24% with follow up of 63 months (IC 95%).

Conclusions. The combined modality therapy with chemotherapy and involved-field radiation (21.6 Gy) shows a better

www.medigraphic.com

Solicitud de sobretiros: Dr. Alberto Olaya Vargas, Servicio de Oncología, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Deleg. Coyoacán, C.P. 04300, México, D. F., México.

Fecha de recepción: 10-05-2008.

Fecha de aprobación: 25-11-2008.

Conclusiones. El uso de este esquema de quimioterapia y radioterapia (21.6 Gy) a campos comprometidos, tuvo una supervivencia global mayor. La toxicidad a mediano plazo por radioterapia fue elevada, por lo que se debe considerar la disminución de la dosis a 15 Gy para pacientes con respuesta completa.

Palabras clave. Linfoma Hodgkin; VAMP; radioterapia a campos comprometidos.

overall survival. The radiation toxicity was elevated, for that reason we must try to reduce the dose of radiotherapy at 15 Gy in patients with complete response to treatment.

Key words. Hodgkin lymphoma; VAMP; involved-field radiation.

Introducción

El linfoma de Hodgkin (LH) se define como una neoplasia maligna con una diseminación por contigüidad ganglionar, su origen ha sido objeto de múltiples controversias; sin embargo, recientemente se ha relacionado con la línea linfoide B.^{1,2}

La supervivencia a largo plazo en el LH se ve afectada básicamente por cuatro factores que pueden determinar la evolución final de la enfermedad, la presencia o ausencia de estos factores nos ayudan a establecer la terapia más adecuada, con base a dividir a los enfermos con LH en tres grandes grupos: de alto riesgo, de riesgo intermedio y de bajo riesgo.

Evidentemente, el primer factor que nos ayuda a clasificar a los pacientes en alguno de estos grupos es el estadio clínico; mientras que la supervivencia global para los pacientes con LH estadio I y II es de 100 y 96%, respectivamente; ésta disminuye a 92 y 80% para los estadios III y IV. Es por esto que los pacientes con estadios III y IV se clasifican como el grupo de alto riesgo sin la necesidad de presentar otras características.

Por otro lado, el grupo de los pacientes con estadios I y II, habitualmente corresponden al grupo de bajo riesgo, siempre y cuando no presenten al menos una de las siguientes características: adenomegalia cervical única de más de 6 cm, presencia de una masa mediastinal que ocupe por lo menos un tercio del volumen total del mediastino y, finalmente, la presencia o ausencia de síntomas B. En el caso de presentar cualquiera de estas características, los pacientes con estadio I o II deben ser considerados como de riesgo intermedio.³

El tratamiento preferido para el LH infantil localizado o de bajo riesgo, ha evolucionado con el uso de terapia combinada, con menos cursos de quimioterapia e irradiación de dosis reducidas a las áreas afectadas por la enfermedad. El uso de quimioterapia sola se está evaluando actualmente.⁴ La meta ha sido mantener una alta tasa de curación, y al mismo tiempo reducir los efectos tardíos que se manifiestan, especialmente en los niños.⁵

El objetivo del presente estudio fue evaluar la supervivencia global y libre de evento de un grupo de pacientes con LH infantil de bajo riesgo con un esquema de quimioterapia diseñado originalmente por Donalson y col.,⁶ y adaptado por el grupo de colaboradores de este estudio, el cual combina el uso de quimioterapia a bajas dosis y la disminución de la dosis de radioterapia, sólo a campos comprometidos, sin que esto afecte la expectativa de curación de este grupo de pacientes, permitiendo que la toxicidad secundaria disminuya de manera importante.

Métodos

Se incluyeron a todos los pacientes con LH en estadio IA, IB, y IIA, que no presentaran al diagnóstico adenomegalias mayores de 6 cm, o masa en el mediastino detectada por radiografía simple del tórax que ocupara más de un tercio de la longitud total del mismo, y que no presentaran síntomas B al diagnóstico; estos pacientes fueron tratados con la combinación de la quimioterapia a base de VAMP (vinblastina 6 mg/m²sc, dosis intravenosa [IV], los días 1 y 15; adriamicina 25 mg/m²sc,

dosis IV, días 1 y 15; metotrexate 20 mg/m²sc, dosis IV, días 1 y 15; prednisona 40 mg/m²sc, dosis IV, días 1 al 14) (Fig. 1). Con ciclos cada 28 días; en un número total de cuatro ciclos. Evaluando con tomografía axial computada (TAC) del sitio primario después del segundo ciclo de quimioterapia. La radioterapia se aplicó después de dos ciclos completos de quimioterapia, a campos comprometidos, 21.6 Gy en todos los casos. Fraccionando en dosis de 150 Gy, cinco veces por semana.

Al finalizar el esquema completo de tratamiento, los pacientes fueron evaluados con TAC en sitios de enfermedad inicial y con rastreo con gammagrama con galio.

La toxicidad hematológica y no hematológica fue evaluada de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de Salud.

Se realizó una descripción de las variedades epidemiológicas, y una descripción de frecuencias de las variables categóricas y nominales, así como un resumen de las mismas a través de medidas de tendencia central, y de dispersión, con mediana y valores mayores y menores. La supervivencia se determinó a través de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y ajustadas con la prueba de Cox.

Resultados

Se incluyeron 17 pacientes, basándonos en los criterios de inclusión y exclusión para este estudio. Todos los pacientes fueron tratados con quimio-

terapia combinada con VAMP, recibiendo en total cuatro ciclos, así mismo, todos recibieron después del segundo ciclo de quimioterapia, radioterapia a dosis de 21.6 Gy a campos comprometidos.

Del género masculino fueron 14 pacientes y del femenino tres. El límite de edad fue de 3 a 15 años, con una media de siete años.

En todos los pacientes el sitio primario de presentación fue el cuello. El tiempo reportado de aparición de los síntomas tuvo una variación de 1 a 12 meses, siendo más frecuente a los tres meses, con un total de cinco pacientes. En los 17 pacientes el diagnóstico se realizó mediante TAC de la región involucrada.

No fue necesario realizar laparotomía estadificadora en ningún caso. La distribución por estadio clínico fue: ocho pacientes correspondieron al estadio IA, y 9 al IIA.

En cuanto a la variedad histológica, 10 de ellos tuvieron esclerosis nodular y siete pacientes celularidad mixta.

El intervalo de tiempo entre el diagnóstico y la última consulta tuvo una variación de 6 a 70 meses, con una media de 28 meses.

En cuanto a los pacientes con recaída, se observó que solamente dos recayeron, a los 4 y 16 meses, respectivamente.

Los sitios de recaída fueron: sitio primario en 5.9%, linfáticos proximales en 5.9%, hígado en 5.9%, páncreas en 5.9%, y en bazo 11.8%.

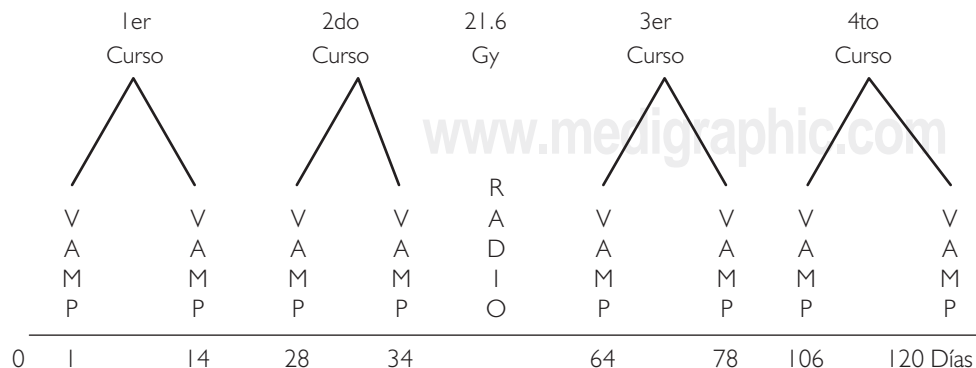


Figura 1. Esquema de tratamiento para pacientes con enfermedad de Hodgkin, estadio favorable con VAMP y radioterapia a dosis bajas.

De los pacientes que presentaron recaída, uno fue del estadio IA y el otro del estadio IIA. Al paciente con estadio IA se le dio como tratamiento de segunda línea, ABVD cuatro ciclos, un ciclo de MOPP (mostaza nitrogenada, oncovin, prednisona, procarbacin), y radioterapia a sitio primario (abdomen). Al otro paciente con estadio IIA, se le aplicaron cuatro ciclos de ABVD, uno de MOPP, uno de COP y radioterapia (abdominal). Es importante mencionar que dos pacientes abandonaron el tratamiento y fueron evaluados como falla terapéutica.

Se observaron siete pacientes con hipotiroidismo y un paciente con tiroiditis y bocio. Todos recibieron tratamiento hormonal sustitutivo.

Solamente en un paciente se encontró antecedente de mononucleosis. El virus de Epstein-Barr se encontró en ocho pacientes, y de éstos, en dos se realizó el diagnóstico por serología, en cinco pacientes por biopsia y en uno por ambos métodos.

La supervivencia global fue de 94.12%, con una media de seguimiento de 66 meses (intervalo de confianza del 95%). La supervivencia libre de evento fue de 88.24% con una media de seguimiento de 63 meses (intervalo de confianza del 95%).

En el estadio IA, la supervivencia global fue de 100%, y la libre de evento de 87.5%; y para el estadio IIA, de 89% en ambos casos, con una media de seguimiento de 55 meses. No hubo diferencia estadística significativa.

Discusión

A partir de 1975, las estrategias de tratamiento para el LH sufrieron un cambio radical, iniciándose en esa fecha el tratamiento combinado de quimioterapia y radioterapia sólo en pacientes con ganglios mayores de 4 cm, mientras que en ganglios menores de 4 cm se trató solamente con MOPP. En este estudio, en donde ya existía la intención de tratar con menos quimioterapia a los pacientes de pronóstico favorable, se reportó que

15 pacientes con estadios I-II con ganglios menores de 4 cm, tratados con MOPP,⁶ no presentaron recaída, con 100% de supervivencia libre de enfermedad, con un seguimiento de 25 a 132 meses (media 59.6 meses). Mientras que en pacientes con ganglios mayores de 4 cm, que recibieron MOPP más radioterapia (25 Gy),⁷ solamente un paciente presentó recaída, y después de 26 meses falleció; el resto de los pacientes del estudio presentó remisión completa, con supervivencia libre de enfermedad en 92%, con seguimiento de 26 a 100 meses (media 58.4 meses).⁷

En un estudio comparativo de MOPP más radioterapia vs ABVD más radioterapia, se dieron tres ciclos de quimioterapia seguido de radioterapia (35 Gy), y posteriormente tres ciclos más de quimioterapia; se observó que la remisión completa con ABVD más radioterapia fue de 92.4%, y con MOPP más radioterapia fue de 80.7%.⁸ En cuanto a la progresión de la enfermedad, en el grupo MOPP fue de 34.5%, y con ABVD de 16.2% en los primeros tres años. La recaída con MOPP fue de 22.6% y con ABVD de 9.5%. La supervivencia a siete años con MOPP fue de 67.9%, y con ABVD de 77.4%.

Las complicaciones que se encontraron fueron: retardo para la administración de la radioterapia, así como de la quimioterapia, con reducción a 50% de la dosis óptima por mielosupresión, presentándose en el grupo MOPP en 59.8% y con ABVD en 20.2%.⁸

En cuanto a los efectos colaterales, con la radioterapia se reportó retardo en el crecimiento, hipoplasia mamaria e hipotiroidismo. Cuando se administró quimioterapia, se desarrolló ginecomastia e incremento de LH y FSH, mientras que los varones presentaron hipogonadismo, esterilidad y azoospermia.⁷ Observándose insuficiencia cardíaca por dosis acumulada de adriamicina. También se describe el desarrollo de segundas neoplasias cuando se utilizó terapia combinada, tales como leucemia aguda, leucemia no linfoblástica y linfoma no Hodgkin de alto grado.⁸

En el hospital St Jude, se analizó la combinación de cinco ciclos de vincristina y procarbina, alternado con cuatro ciclos de ABVD, y dosis bajas de radioterapia (20 Gy) regional, reportando en pacientes con estadio II remisión completa continua a los dos años en 96%, estimando una supervivencia a los cinco años de 96%, y con supervivencia libre de enfermedad de 93% a los cinco años. La toxicidad cardiaca se observó en dos pacientes, con aumento del tamaño ventricular. Solamente un paciente no respondió al tratamiento, con recaída a los 12 meses. Entre otras alteraciones se mencionan disfunción tiroidea, desarrollo de segundas neoplasias y esterilidad.⁹

En un estudio realizado en dos centros médicos, con un total de 173 pacientes con estadio I (53) y II (118), se dio tratamiento con MOPP, alternando con ABVD más radioterapia.

La supervivencia global a los 10 años en los pacientes con estadio I-II fue similar de 91%; en cuanto a la supervivencia libre de evento, se reportó de 83% en el estadio I y en el IIA de 89% a los 10 años. La supervivencia más allá de los 15 años fue de 91%. Entre los efectos tóxicos de la quimioterapia y la radioterapia, se menciona que de 119 pacientes, 63% presentaron hipotiroidismo; otra complicación fue la esterilidad, y además se menciona que tres pacientes presentaron segundas neoplasias: leucemia aguda linfoblástica, carcinoma gástrico y carcinoma de tiroides.¹⁰

Constantine y col.¹¹ reportaron en un estudio de 119 pacientes que recibieron radioterapia a cuello que 24 de ellos recibieron una dosis de 2 600 rad o menos, cuatro presentaron incremento de TSH, y 95 pacientes recibieron más de 2 600 rad, de los cuales, 71 presentaron incremento de TSH. La edad, sexo y la quimioterapia no son factores predisponentes para disfunción tiroidea. Presentando disfunción tiroidea con dosis baja de radiación a los 18 meses y con dosis altas a los 31 meses.

Por estos motivos, a pesar de los excelentes resultados logrados con los esquemas tradicionales

de MOPP y ABVD, y dosis convencionales de radioterapia, los investigadores han concluido que los efectos secundarios a largo y corto plazo son muy graves, sobre todo para el grupo de pacientes de bajo riesgo; por lo que desde mediados de la década de los años noventa, el objetivo a nivel internacional ha sido el de disminuir las dosis de quimioterapia y radioterapia sin afectar los porcentajes de supervivencia global y supervivencia libre de evento, tratando de esta manera de disminuir los efectos secundarios.

Se reporta que la combinación de quimioterapia y dosis bajas de radioterapia, presentan excelentes resultados en cuanto a la supervivencia libre de recaída en 90% a los 7.5 años.¹²

Donaldson y col.,⁶ realizaron un estudio multicéntrico de septiembre de 1990 a febrero de 2000, donde se incluyeron pacientes menores de 21 años con LH estadio I y II, con la finalidad de mantener un índice de supervivencia igual o mayor a 90%. Además de disminuir la toxicidad por la quimioterapia y radioterapia con la utilización de drogas menos tóxicas y menores dosis de radiación.

El esquema terapéutico que se utilizó en estos pacientes fue de cuatro ciclos de quimioterapia con VAMP (vinblastina 6 mg/m²sc IV, adriamicina 25 mg/m²sc IV, metotrexate 20 mg/m²sc IV y prednisona 40 mg/m²sc vía oral) en dos brazos, con diferencia de cuatro semanas entre cada ciclo; así mismo, la aplicación de radioterapia a campos comprometidos, con dosis de 15 Gy a pacientes con remisión completa postquimioterapia, y con 25.5 Gy a pacientes con remisión parcial postquimioterapia, fraccionando la dosis a 1.5 Gy cinco veces por semana, utilizando un acelerador lineal, todo esto después de la aplicación de dos ciclos de quimioterapia. Se incluyeron a 110 pacientes, con una relación hombre:mujer de 2.1:1, con una edad media de 13 años (variación de 3 a 20 años); 34 pacientes estaban en el estadio I, y 74 en el estadio II. Después de dos ciclos de quimioterapia, 49 pacientes (45%) presentaron re-

misión completa, y 61 pacientes (55%) remisión parcial; de éstos, siete pacientes recayeron, seis al final de la terapia, y uno durante la quimioterapia; de éstos, tres fallecieron por progresión de la enfermedad. En cuanto a la supervivencia global y la supervivencia libre de evento a cinco años fue de 99 y 93%, respectivamente. Para los pacientes con estadio I a cinco años, la supervivencia global fue de 100%, mientras que para los de estadio II fue de 98.5%; en cuanto a la supervivencia libre de evento, en el estadio I fue de 96% y en el II de 91%. La supervivencia global a cinco años en varones fue de 99% y la supervivencia libre de evento de 93%. En mujeres, la global fue de 100% y la libre de evento de 91%.

A los cinco años, la supervivencia libre de evento en pacientes con remisión completa fue de 100%, mientras que con remisión parcial fue de 98%.

En cuanto a la toxicidad que se observó, en este estudio fue secundario a quimioterapia: alopecia parcial, náuseas, vómito, mialgias, neutropenia y fiebre.

Dos pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus*, y cinco casos con herpes zoster. La toxicidad ocasionada por la radioterapia, en 28 pacientes, fue de hipotiroidismo, detectados de uno a siete años después del diagnóstico; seis de ellos radiados con 15 Gy y el resto con 25.5 Gy, todos recibieron tratamiento sustitutivo. Sólo uno de ellos desarrolló bocio multinodular, y siete años después un adenoma folicular. A los pacientes detectados con hipotiroidismo se les realizaron estudios de anticuerpos para descartar la presencia de enfermedad tiroidea autoinmune asociada, siendo negativa en todos ellos. Por lo que se consideró que el efecto sobre el tiroides es debido al efecto de la radioterapia.

En comparación con otros estudios en pacientes con enfermedad de bajo riesgo, este estudio reportó a cinco años una supervivencia global de 99% y libre de evento de 93%, en comparación con el estudio francés MHD90, con global de 97%

y libre de evento de 91%, utilizando en éste vinblastina, bleomicina, etopósido y prednisona, donde dos de estos pacientes desarrollaron leucemia relacionada a etopósido.

Otro estudio con el cual se comparó fue el del *Children's Cancer Group* de 5 942 casos, en el cual se obtuvieron resultados muy similares con una supervivencia libre de evento a tres años de 97% después de cuatro ciclos de ciclofosfamida, vinblastina y bleomicina (COPP/ABV) y 21 Gy de radioterapia, a diferencia de 91% después de la quimioterapia sola, pero con una toxicidad mayor a la esperada con VAMP.

En cuanto al análisis histológico, se reportó mejores resultados a los pacientes donde se observaba predominio de linfocitos, y con peor pronóstico en la esclerosis nodular. Sin diferencias estadísticas en cuanto a la edad, sexo y estadio.^{12,13}

Como conclusiones podemos mencionar que en el Instituto Nacional de Pediatría (Ciudad de México), hasta 1998, el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin para estadios favorables, incluía exclusivamente el uso de radioterapia a dosis de 35 Gy con técnicas tradicionales de irradiación; sin embargo, la supervivencia global era de 88%, y el índice de recaída de 25%, observándose principalmente ésta en el lugar primario o con enfermedad infradiafragmática, a pesar del uso de laparotomía estadificadora de manera rutinaria en todos los pacientes y hemiesplenectomía. Los efectos secundarios asociados al uso de radioterapia, a tan altas dosis, se encontraban en más de 30% en los pacientes tratados, y consistía en disfunción tiroidea y deformidad del tórax en aquellos casos en los que se irradiaba éste; por otro lado, la morbilidad asociada a la laparotomía y la hemiesplenectomía, condicionaba a los pacientes a ingresar en múltiples ocasiones al hospital por diferentes causas infecciosas.

El uso de este nuevo esquema de tratamiento a base de la combinación a dosis bajas de quimioterapia con VAMP, combinada con la apli-

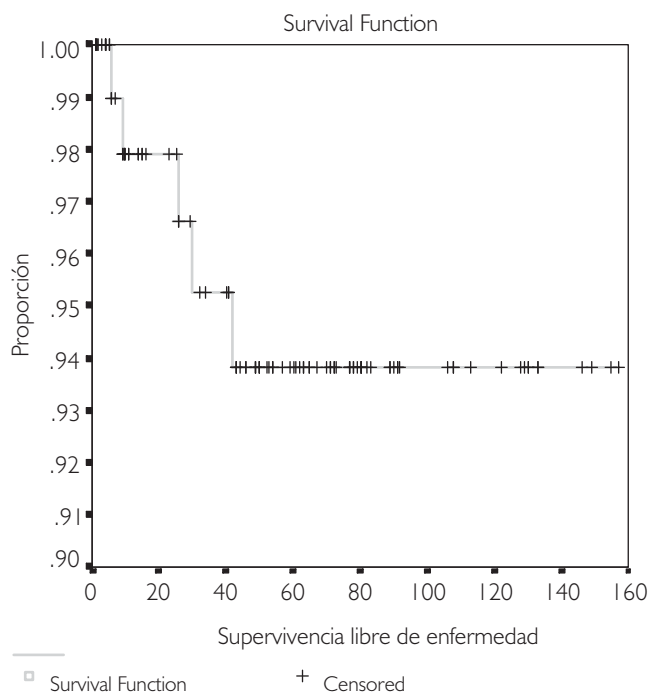


Figura 2. Supervivencia global de los pacientes con enfermedad de Hodgkin tratados con VAMP y radioterapia a dosis bajas.

cación de radioterapia a una dosis de 26.1 Gy, aplicada exclusivamente a campos comprometidos, demostró su eficacia, ya que la supervivencia global para este grupo de pacientes alcanzó 94.12% (Fig. 2), la cual se vio afectada por los dos pacientes que abandonaron el tratamiento; sin embargo, la recaída sólo se presentó en dos pacientes con una supervivencia libre de evento de 88.24% (Fig. 3), lo que supera lo alcanzado con anterioridad en nuestra institución.

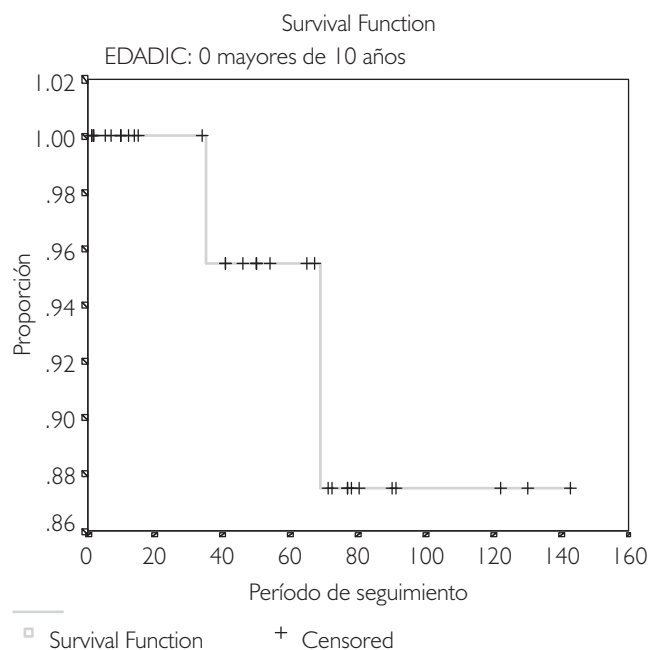


Figura 3. Curva de supervivencia libre de evento de los pacientes con enfermedad de Hodgkin, estadio favorable, tratados con VAMP y radioterapia a dosis bajas.

La toxicidad secundaria es mínima; en lo que se refiere a la toxicidad aguda hematológica y no-hematológica, ésta fue bien tolerada, y en ningún caso requirió de hospitalización en nuestros pacientes. Sin embargo, la toxicidad a mediano plazo, secundaria al uso de radioterapia, se encontró en un índice muy elevado, por lo que los investigadores consideran la posibilidad de disminuir la dosis de radioterapia para aquellos pacientes con respuesta completa después del segundo curso de quimioterapia a 15 Gy.

Referencias

1. Lanzkowky P. Pediatric hematologic oncology. Hodgkin's disease. New York: McGraw-Hill Book Company; 1980. p. 96.
2. Leventhal BG, Donalson SS. Hodgkin's disease. En: Pizzo PA, Poplack DG, editores. Principles and practice of pediatric oncology. 2nd ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1992. p. 577-95.
3. Olaya-Vargas A. Linfoma de Hodgkin. En: Rivera-Luna R, editor. El niño con cáncer; los padecimientos más comunes para el médico no especialista. México: Editores de Textos Mexicanos; 2007. p. 61-74.
4. Nachman JB, Children's Cancer Group. Phase III study of adjuvant low dose involved field radiotherapy vs no adjuvant therapy in children with Hodgkin's disease in CR following chemotherapy as-signed by clinical stage (Summary last Modified 02/1999), CCG-59442, clinical trial, closed, 12/11/1998.
5. Oberlin O. Present and future strategies of treatment in childhood Hodgkin's lymphomas. Ann Oncol. 1996; 7 Suppl 4: 73.

6. Donaldson SS, Hudson MM, Lamborn KR. AMP and now-dose, involved-field radiation for children and adolescents with favorable, early-stage Hodgkin's disease: Results of a prospective clinical trial. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 3081-7.
7. Behrendt H, van Bunningen FM, van Leeuwen EF. Treatment of Hodgkin's disease in children with or without radiotherapy. *Cancer.* 1987; 59: 1870.
8. Santoro A, Bonadonna G, Valagussa P. Long term results of combined chemotherapy radiotherapy approach in Hodgkin's disease: Superiority of ABVD plus radiotherapy versus MOPP plus radiotherapy. *J Clin Oncol.* 1987; 5: 27-37.
9. Hudson MM, Greenwald C, Thompson E, William J, Marina N, Fairclough D, et al. Efficacy and toxicity of multiagent chemotherapy and low dose involved field irradiation in children and adolescent with Hodgkin's disease. *J Clin Oncol.* 1993; 11: 100-8.
10. Donaldson SS, Whitaker SJ, Plowman PN, Link MP, Malpas JS. Stage I-II pediatric Hodgkin's disease: ingterm follow-up demonstrates equivalent survival rates following different management schemes. *J Clin Oncol.* 1990; 8: 1128.
11. Constantine LS, Donaldson SS, McDougall IR. Thyroid dysfunction after radiotherapy in children with Hodgkin's disease. *Cancer.* 1984; 53: 878.
12. Barrett A, Crennan E, Barnes J, Martin J, Radford M. Treatment of clinical stage I Hodgkin's disease by local radiation therapy alone. *Cancer.* 1990; 66: 670-4.
13. Smith RS, Chen Q, Hudson MM, Donaldson SS. Prognostic factors for children with Hodgkin's disease treated with combined modality therapy. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 2026-33.

Consolidation treatment for high risk solid tumors in children with myeloablative chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor stem cell transplantation

Alberto Olaya Vargas
Roberto Rivera Luna
Martin Perez Garcia
Rocio Cárdenas Cardos
Liliana Velasco Hidalgo
Doris LordMéndez Jácome
Mariana Campos Gutiérrez

National Institute of Pediatrics – INP, Mexico
City, AC, Mexico

Background: In childhood cancer, consolidation treatment with chemotherapy followed by autologous hematopoietic progenitor stem cell transplantation is currently an accepted treatment modality in patients with high-risk solid tumors or in patients who have relapsed after conventional treatment.

Objectives: The objective of this study was to describe the results of transplantation of a group of children who had high-risk solid tumors or relapsed after conventional chemotherapy regimens.

Methods: A retrospective analysis was conducted from January 1998 to October 2004 of all children with pathologic diagnoses of high-risk solid tumors or children that had previously relapsed after conventional chemotherapy and that were subsequently submitted to autologous hematopoietic progenitor stem cell transplantation. The analysis included overall survival rates, event-free survival rates, mortality rates and chemotherapy complications.

Results: Nineteen patients were submitted to this approach. The age range was from 27 to 196 months with a median age of 52 months. The overall survival rate at 100 days was observed in 79%, the three-year event-free survival rate was 63%. The mortality rate secondary to the myeloablative chemotherapy regimen was 21% (n = 4). Only three patients (15.8%) relapsed with tumor progression after transplant.

Conclusion: Autologous hematopoietic progenitor stem cell transplantation is still a successful procedure in patients with solid tumors refractory to conventional chemotherapy.

Keywords: Hematopoietic stem cell transplantation; Neoplasms; Child

Introduction

Recently, disease-free survival (DFS) for children with solid tumors has improved considerably; more than 70% of children achieve 5-year tumor-free survival. However, there is a group of patients who have some clinical and biological characteristics with poor prognostic factors at diagnosis.

Unfavorable factors are associated with a high failure rate to traditional treatment regimens including chemotherapy, surgery and radiotherapy. Therefore, children with solid tumors and adverse risk factors require new therapeutic strategies⁽¹⁾.

Preclinical studies and clinical correlations of the effect of alkylating agents have demonstrated that there is a linear-logarithmic relationship between the chemotherapy dose and cytotoxicity. Therefore, increases in chemotherapy of 3 to 10 times denote multiple-logarithmic increases in the destruction of malignant cells. However, the main limit of this principle is the extended myelotoxicity which puts the patient's life at risk⁽²⁻⁶⁾.

The reconstitution of the hematopoietic system after myeloablative doses of chemotherapy and/or total body irradiation (TBI) can induce severe or even fatal complications if the patient is not rescued with autologous CD34 hematopoietic progenitor cells obtained either from bone marrow or peripheral blood. This approach has been one of the most highly successful strategies to limit secondary myelotoxicity^(3,7).

Many investigators have demonstrated the importance of using myeloablative doses with different chemotherapeutic regimens including hematologic support with hematopoietic stem cell transplantation. This approach, widely used as consolidation therapy in high-risk solid tumor pediatric patients, has proved to be an excellent complement to conventional multidisciplinary approaches including surgery and chemotherapy^(4,8). However, there are many questions regarding the best combination of myeloablative chemotherapy for these types of tumors, how to eliminate TBI from myeloablative regimens without any significant change in response rates, as well as which of these strategies is the best to avoid further relapse in this group of children.

The aim of the current study was to evaluate the efficacy and safety of a myeloablative chemotherapy program without TBI using melphalan, cyclophosphamide and etoposide followed by consolidation-rescue with autologous hematopoietic progenitor stem cell transplantation (AHP SCT) as treatment for high-risk solid tumors in children. All these drugs, with demonstrated efficacy, are available in Mexico⁽⁶⁾.

Conflict-of-interest disclosure:
The authors declare no competing financial interest

Submitted: 11/21/2012
Accepted: 7/20/2013

Corresponding author:
Alberto Olaya Vargas
National Institute of Pediatrics – INP
Stem Cell Hematopoietic Transplant Program
Insurgentes Sur 3700-C
04530 Mexico City, AC, Mexico
olayavargasalberto@gmail.com

www.rbhh.org or www.scielo.br/rbhh

DOI: 10.5581/1516-8484.20130099

Methods

A phase II clinical protocol was carried out according to the best clinical practice guidelines. The protocol was approved by the Ethics Committee of the institution, guaranteed by the *Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios* (COFEPRIS). Inclusion criteria were an age of under 18 years old with high-risk solid tumors and advanced tumor stage from January 1998 to October 2004 and followed for up to 121 months after transplantation. All patients were registered in our institution. Parents of patients signed an informed consent form in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2008. Within these criteria, this population needed to have a disease-free life survival expectancy of less than 25% with conventional therapy at the time of diagnosis or advance disease after the first relapse.

All patients went through conventional treatment protocols, including surgery, radiotherapy and chemotherapy, prior to being considered eligible for the AHP SCT procedure. Patients who demonstrated a tumor response greater than 90% in diameter determined by image studies before entering the transplantation program were included. Children with partial response (< 90%) or relapse were excluded. All patients included in the study were fully evaluated before entering the AHP SCT program. Those with any evidence of organic dysfunction were excluded from this program.

Cryopreservation of progenitor cells

The hematopoietic progenitor cells were obtained from bone marrow in the operating room under general anesthesia through multiple punctures of both posterior-superior iliac crests or peripheral blood through apheresis⁽⁹⁾ using a Baxter cell separator model CS300 through a double lumen central catheter. Mobilization of progenitor cells was obtained using colony stimulating granulocyte factor at 10 mcg/kg/day for 5 days, prior to the collection⁽⁵⁾. Bone marrow or peripheral blood stem cells were preserved by cryopreservation as published elsewhere⁽¹⁰⁾ until they were re-infused intravenously. In both cases the collection of the progenitors was carried out to obtain from 3.5 to 4.5 x 10⁸ mononuclear cells per kilogram of patient's weight. Through flow cytology the cell dose was established to guarantee a graft in a range of 3-5 x 10⁶ CD34⁺ cells/kg^(11,12).

Cryopreservation was carried out through a programmable cryopreservation unit that allowed a gradual temperature decrease of -1°C/min over 90 minutes; 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a cryoprotective agent. Thus, the progenitor cells were stored in liquid nitrogen at -190°C⁽¹⁰⁾ until the day of the infusion. An *in vitro* purge using methylprednisolone and etoposide was carried out for patients who presented bone marrow tumor infiltration using the doses and methodology published elsewhere⁽¹³⁾. Subsequent 0.4% trypan blue exclusion test was performed to assess cell viability.

Myeloablation regimen

After the hematopoietic progenitor cells were obtained, children were initiated with a hydration program at 3000 mL/m²/day from Day -10 to Day 0. The myeloablation program

consisted of oral melphalan 200mg/m² split over four days commencing from Day -9 to Day -6, intravenous (IV) cyclophosphamide at 120 mg/kg split over two days (Day -5 and Day -4) and IV etoposide at 1200 mg/m² was administered as a 24-hour infusion on Day -3. On Days -2 and -1 the patients received only intravenous hydration.

Infusion of hematopoietic progenitors

The infusion was carried out on Day 0. The bags of thawed units were transported directly to the transplant unit at a temperature of 4°C. They were infused in a closed system, through a central line over an average time of ten minutes. All the patients were treated with a single IV dose of furosemide (1 mg/kg), a single IV dose of ondansetron (5 mg/m²) and a single IV dose of methylprednisolone (2 mg/m²) prior to the infusions.

Prophylactic therapy and hematopoietic support

All children had intravenous prophylactic treatment with fluconazole (10 mg/kg/day/dose) and acyclovir (10mg/kg/day/dose). Immunoglobulin was not routinely used in these patients because the cost is very high; it was preferred to monitor immunoglobulin levels with administration only to those with low levels during or after transplant. Granulocyte colony stimulating factor was administered intravenously at 10 mcg/kg every 24 hours from Day +3. These medications were administered when the neutrophil count was under 0.5 x 10⁹ cells/L and maintained until the count was above 1.0 x 10⁹ cells/L. At that time, children had their treatment changed to oral medications, which included fluconazole (10 mg/kg/day) and prophylaxis with trimethoprim-sulfamethoxazole (10 mg/kg/day) three times per week for 60 days.

Children were transfused packed red blood cells at 10-20 mL/kg when hemoglobin levels were below 8.0 g/dL; if the platelet count was below 20 x 10³/μL, apheresis platelet transfusion was administered. All blood transfusion products were previously irradiated.

Response assessment

A transplant graft was considered successful when the neutrophil count increased by more than 0.5 x 10⁹ cells/L and the reticulocyte count by more than 2% within the first 30 days after transplant.

Data was gathered on forms especially designed for the study. The STATA package version 11 was used for statistical analysis. Data on the overall survival (OS) and event-free survival (EFS) were analyzed as was the toxicity with central trends, spread, frequencies and means. An actuarial Kaplan Meier method was used to determinate the OS and EFS considering the period between the AHP SCT and the time of death, relapse or the last visit to the center.

Similarly, the parameters of efficiency were defined as EFS evaluated at 118 to 121 months. Safety parameters were defined as an OS at Day 100 post-transplant adjusted according to the hematologic and non-hematologic toxicity criteria established by the World Health Organization (WHO).

Results

A total of 19 consecutive patients (ten male - 52.6% and nine female - 47.4%) were enrolled in this study. The ages ranged from 27 to 192 months with a median age of 52 months (Table 1). The commonest diagnosis was neuroblastoma in nine cases (47.4%) of which 89% were stage IV and 11% stage III according to the International Neuroblastoma Staging System; three patients (33.3%) presented infiltration of the bone marrow at the time of diagnosis.

The Ewing sarcoma family of tumors (ES) was the second most common diagnosis in 26.3% of the cases (n = 5); all had metastatic disease in the bone at the time of diagnosis. Similarly, two patients (40%) presented infiltration of the bone marrow and one patient (20%) had metastasis to the liver. Two patients had Wilms tumors (10.5%) after the first relapse. Three patients were found to have germinal tumors-endodermal sinus tumor (15.7%) that, similar to the other patients with Wilms tumors, achieved a second complete remission.

The bone marrow was used as the source of hematopoietic progenitor cells in six patients (31.6%) and peripheral blood in 13 (68.4%). On average, two aphaereses were required to obtain an adequate dose of mononuclear cells.

The median dose of mononuclear cells was $4 \times 10^8/\text{kg}$ of the recipients weight with an interquartile range (IQR) of 0.6 (Range: $3.5\text{-}12.3 \times 10^8/\text{kg}$). The median quantity of CD 34⁺ cells was 3.16×10^6 (IQR 1.5) (Range: $1.2\text{-}6.4 \times 10^6/\text{kg}$). *In vitro* purges with methylprednisolone and etoposide were used in only three cases. Viability using the trypan blue exclusion test was higher than 90%. The median time to neutrophil engraftment was 22 days (Range: 19-

26 days) for patients transplanted with bone marrow while for those transplanted with peripheral blood, the median time to neutrophil engraftment was 14 days (Range: 10-19 days). There was a statistically significant difference between the groups (p-value = 0.002). Engraftment was not attained in only one case (5.3%).

The median time to platelet engraftment was 45 days (Range: 32-68 days) for patients transplanted with bone marrow while for those transplanted with peripheral blood the median time was 36 days (Range: 29-58 days). The median time of hospital stay within the transplant unit was 30 days (Range: 22-42 days).

The OS at 100 days was 79% and EFS was 63% in a 3-year follow-up period (Figure 1). Currently 11 patients are alive and without evidence of tumor activity. Eight patients died; for five patients (26%) death was associated to the myeloablative chemotherapy regimen with the secondary cause being septic shock. Only three patients (15%) relapsed with tumor progression after transplant.

The most common toxicity was neutropenia with all 19 patients (100%) presenting grade IV toxicity (WHO criteria). On average toxicity was present on Day +3 (Range: Day -3 to Day +5). As a whole, patients required an average of 5.8 transfusions of packed red blood cells (Range: 2-19). Platelets by aphaeresis transfusions were administered with a median of 11.6. Granulocyte stimulating factor was given for an average of 19 days (Range: 11-32 days; median: 24).

The second cause of toxicity was gastrointestinal with 12 patients presenting with mucositis (63%): two patients (16.7%) level IV, four children (33.3%) level III and six patients (50%) level II. Neutropenic colitis was presented by seven patients (36.8%) all of whom required parenteral nutrition.

Table 1 - Pediatric patients submitted to autologous hematopoietic progenitor stem cell transplantation (AHP SCT)

Patient number	Diagnosis	Gender	Stage	Age (months)	Status of remission prior to AHP SCT	Source of Stem cells	Current status	Last visit	Cause of death
1	Neuroblastoma	Male	IV	48	2 nd	BM	Alive	3/2008	
2	Ewing sarcoma	Female	Metastasis to Bone, bone marrow	192	1 st	BM	Dead	10/1998	Sepsis
3	Neuroblastoma	Female	IV	24	1 st	PB	Alive	6/2005	
4	Ewing sarcoma	Male	Metastasis to Bone, bone marrow	108	1 st	BM	Dead	9/1999	Sepsis
5	Neuroblastoma	Male	IV	52	1 st	BM	Alive	3/2011	
6	Germ cell tumor	Female	Metastasis to lung	132	2 nd	BM	Dead	1/2001	Relapsed
7	Neuroblastoma	Female	IV	24	1 st	PB	Alive	6/2006	
8	Germ cell tumor	Male	Metastasis to mediastinum	96	1 st	PB	Alive	1/2004	
9	Neuroblastoma	Female	IV	36	1 st	BM	Alive	11/2006	
10	Wilms tumor	Female	IV	52	2 nd	PB	Alive	8/2004	
11	Neuroblastoma	Male	IV	32	1 st	PB	Dead	5/2001	Sepsis
12	Neuroblastoma	Male	IV	48	1 st	PB	Alive	3/2006	
13	Wilms tumor	Male	IV	108	2 nd	PB	Alive	11/2006	
14	Neuroblastoma	Male	IV	54	1 st	PB	Dead	9/2004	Relapsed
15	Ewing sarcoma	Female	Metastasis to bone, bone marrow, liver	192	1 st	PB	Dead	3/2004	Relapsed
16	Germ cell tumor	Male	IV	84	1 st	PB	Alive	3/2010	
17	Ewing sarcoma	Female	Metastasis to bone	48	1 st	PB	Dead	4/2004	Sepsis
18	Neuroblastoma	Female	III	32	1 st	PB	Alive	2/2011	
19	Ewing sarcoma	Male	Metastasis to lung and bone	168	1 st	PB	Dead	11/2004	Sepsis

BM: bone marrow; PB: peripheral blood

Infectious complications were identified in 11 patients (57.9%). Four patients (36.3%) had bacteriologically isolated septicemia, three patients (27.3%) had pneumonia, two (18.2%) had rectal abscess and the other two patients had skin infections. The isolated germs were *enterobacteria* in 45.5% (n = 5) of the cases, *Staphylococcus epidermidis* in 27.3% (n = 3) and *Candida albicans* in 27.3% (n = 3). Hepatic toxicity was presented by four patients (21%); all cases were identified by liver function tests. Six patients (31.6%) required intensive care, four of whom died as previously mentioned. None of the patients had veno-occlusive disease.

We observed that the type of tumor histology was important because survival of patients with ES was 20% in a follow-up of between three and 18 months. However, the EFS in the same period was 0% in comparison to those with neuroblastoma, where the OS was 88.8% (p-value = 0.035) in a follow-up of from three to 89 months and the EFS was 77.8% (p-value =0.01). The median survival of all patients was between 118-121 months (Figure 1 & 2).

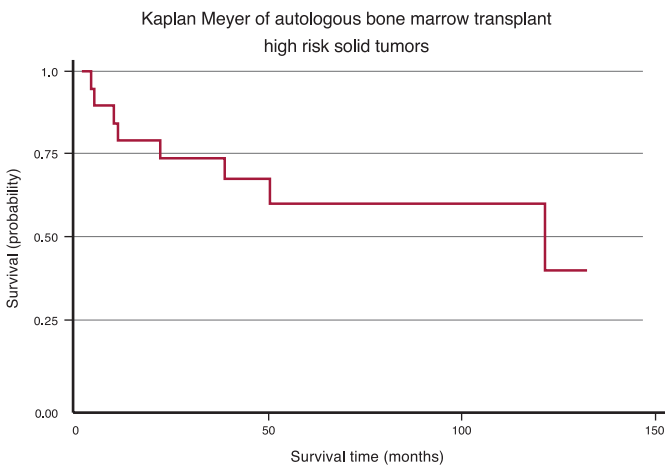


Figure 1 - Event-free survival of 19 pediatric patients with high-risk solid tumors conditioned with melphalan, cyclophosphamide and etoposide and autologous hematopoietic progenitor stem cell transplantation

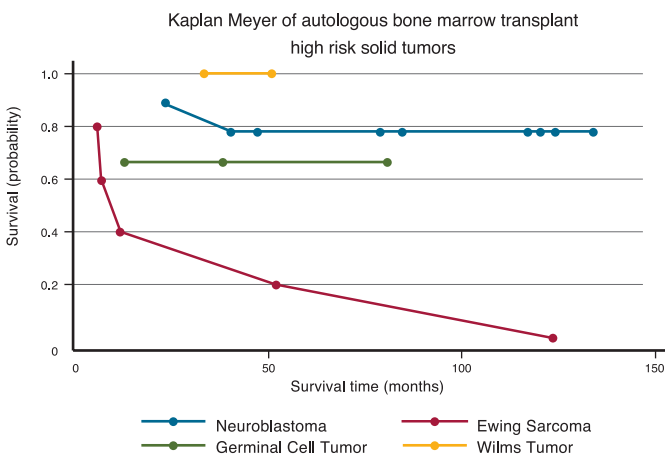


Figure 2 - Event-free survival by tumor type in 19 pediatric patients conditioned with melphalan, cyclophosphamide and etoposide and autologous hematopoietic progenitor stem cell transplantation

Another important factor was the time at onset of severe bone marrow aplasia. The patients were divided into two groups in respect to this variable. Group 1, patients presenting severe aplasia before Day 0 (n = 5) and Group 2, patients presenting aplasia after Day 0 (n = 14). The OS at Day 100 for Group 1 was 20% while for Group 2 it was 100% (p-value =0.02).

The presence of bacterial infections had an influence on the outcome with a survival of 20% at Day 100 compared with 100% for the patients who did not have bacterial infections.

The synergy between early severe myelotoxicity-bone marrow aplasia and infectious complications were the most unfavorable factors and documented in four patients that died.

Discussion

Clinical evidence has demonstrated the effectiveness of increasing chemotherapy doses to enhance the destruction of tumor cells. This is the most solid basis for myeloablative chemotherapy in AHP SCT as consolidation treatment for high-risk solid tumors. It can be achieved by alkylating agents alone or in combination with some other agents depending upon the type of tumor^(14,15).

In most cases the benefit has been complemented with the use of TBI⁽¹⁶⁾. However the short and long-term deleterious effects of radiation in children increase the morbidity and decrease, in many cases, the quality of life without an easily identifiable therapeutic benefit⁽¹⁷⁾.

In a previous work by our group of 15 consecutive children with advanced cancer submitted to three different myeloablative chemotherapy regimens and AHP SCT, the OS was 40% and the mean DFS was 19 months⁽⁶⁾. However the current study shows that single chemotherapy regimens can give more standardized results. Morbidity and a strict patient selection probably would offer better results. The present investigation evaluated the results of a single chemotherapy regimen based on melphalan, cyclophosphamide and etoposide without TBI. The EFS for the entire group was 63% in a three-year follow-up. Initially, these results exceeded the life probability for patients, as they had relapsed to first and/or second line conventional chemotherapy regimens.

A conditioning scheme with melphalan, cyclophosphamide and etoposide was selected, because it has proven to be efficient when treating multiple solid tumors in childhood, besides the fact of being accessible and affordable in Mexico.

The results obtained in this research are similar to those obtained by other groups. In 1998 Ozkaynak⁽¹⁸⁾ reported a similar experience in 27 pediatric patients with high-risk solid tumors using a combination of alkylating agents (cyclophosphamide, carboplatin, melphalan and etoposide) and AHP SCT. DFS at 3 years was 60%, patients presented engraftment by Day +12.5 and presented a 16% transplant-related mortality rate. All deaths were caused by secondary sepsis due to infections by candida. After surgery, patients were examined daily while in the hospital and then at one and six weeks after discharge. Follow-up evaluations were then conducted at 3- to 6-month intervals for the first year and thereafter yearly for the remainder of the patient's life.

Kletzel⁽¹⁹⁾ demonstrated the usefulness of myeloablative doses of chemotherapy followed by AHP SCT in a phase I/

II study of patients with high-risk neuroblastoma. They used the combination of thiotepa (300 mg/m²/day) for three days followed by cyclophosphamide (1500 mg/m²/day) for four days. In addition, an *in vitro* purge of bone marrow was carried out for 16 patients; the bone marrow was not purged for 23 patients. Peripheral blood was used in 13 patients with engraftment by Day 19 in patients with purged bone marrow and by Day 17.5 in patients with non-purged bone marrow and by Day 13 in patients that were given peripheral blood. Twenty-nine out of 51 patients that were included in the study presented progressive disease in a follow-up of 1140 days. There are multiple studies that have demonstrated the usefulness of melphalan in the myeloablation regimen^(20,21) for neuroblastoma; however, most of them include TBI. In these studies the OS did not exceed 40%. This was due to the elevated mortality rate secondary to TBI. Even so, these studies outline the usefulness of melphalan to treat neuroblastoma. This observation is substantiated by the current study, in which, analyzing the group of patients with neuroblastoma separately, the OS was 88.1% and the EFS was 77.8%.

The use of high dose chemotherapy followed by AHP SCT in patients with high-risk Wilms tumor and/or after relapse has been established as an efficient therapy as reported by Campbell et al.⁽²²⁾. These authors treated 13 patients after the first relapse. All patients were given different ablative regimens. The EFS was 60% and there was no transplant-related mortality.

The current study included patients with germ cell tumors after the first relapse. It is important to consider that the experience with high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplant in children is still limited. In adult patients the experience is broader. Recently, a study of adult patients showed that half of the patients submitted to this procedure had a favorable outcome⁽²³⁾.

We consider the results with ES in this study are not comparable with those obtained by other groups⁽²⁴⁾. The combination of chemotherapeutic agents used in our study did not have an impact on the EFS. Therefore, we must consider the use of a new regimen of myeloablation chemotherapy. Currently some groups have obtained promising results in ES with an OS of 53% to 86%⁽²⁵⁾. In these studies a combination of carboplatin, ifosfamide and etoposide was used⁽²⁶⁾. Other childhood solid tumors have been evaluated including osteosarcoma⁽²⁷⁾, medulloblastoma⁽²⁸⁾ and malignant astrocytoma⁽²⁹⁾.

The rate of infectious complications in our series, as well as mortality associated with the transplant protocol is higher than what has been reported in international literature. The rate of infectious complications in first transplant patients in our unit has decreased due to an increase in the experience of the group with this type of patients. This has enabled us to continue the autologous transplant program for solid tumors in an outpatient program with favorable results. AHP SCT can be harvested from bone marrow progenitor cells although peripheral blood is a more viable option especially in pediatric patients. However, cord blood is another realistic source given the potential contamination with tumor cells from the same patient and the risk of myelodysplastic syndrome post-transplant.

There is no question that this therapeutic approach is harmless not only in the acute phase of treatment but in the medium and long term follow up especially for children that received TBI as part of their treatment protocol^(30,31).

Conclusion

AHP SCT is still a successful procedure in patients with solid tumors refractory to conventional chemotherapy.

Novel conditioning regimens, primarily reduced intensity and non-myeloablative regimens, allow patients with significant co-morbidities to undergo transplantation with reduced morbidity and mortality. Combinations of immune-modulatory cytokines and monoclonal antibodies with autologous transplantation are among the advances being explored in contemporary hematopoietic stem cell transplantation. We should continue selecting children with advanced stage high-risk solid tumors, who may benefit from this treatment modality.

The challenge in the future will be to establish strategies that avoid subsequent relapses after AHP SCT using measures such as immunotherapy or target therapy.

References

- Ozkaynak MF, Sahdev I, Gross TG, Levine JE, Cheerva AC, Richards MK, et al. A pilot study of addition of amifostine to melphalan, carboplatin, etoposide, and cyclophosphamide with autologous hematopoietic stem cell transplantation in pediatric solid tumors-A pediatric blood and marrow transplant consortium study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30(3):204-9.
- Watanabe H, Watanabe T, Suzuya H, Wakata Y, Kaneko M, Onishi T, et al. 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(7):661-8.
- Shook DR, Triplett BM, Srinivasan A, Hartford C, Dallas MH, Pillai A, et al. Successful allogeneic hematopoietic cell engraftment after a minimal conditioning regimen in children with relapsed or refractory solid tumors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013;19(2):291-7.
- Avramova B, Jordanova M, Michailov G, Konstantinov D, Christosova I, Bobev D. Myeloablative chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with poor-prognosis solid tumors - Bulgarian experience. *J BUON.* 2006;11(4):433-8.
- Watanabe H, Watanabe T, Suzuya H, Wakata Y, Kaneko M, Onishi T, et al. 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(7):661-8.
- Rivera-Luna R, Olaya-Vargas A, Meza-Coria C, Cárdenas-Cardos R, Leal-Leal C, Amador-Zarco J. Is autologous bone marrow transplant (ABMT) and high-dose chemotherapy an approach that can rescue some children with advanced cancer disease? *Pediatr Hematol Oncol.* 2001;18(7):443-51.
- Gratwohl A. Activity survey and historical perspective of autologous stem cell transplantation in Europe. *Semin Hematol.* 2007;44(4):220-6.
- Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirer T, Dini G, Einsele H, Gratwohl A, Madrigal A, Niederwieser D, Passweg J, Rocha V, Saccardi R, Schouten H, Schmitz N, Socie G, Sureda A, Apperley J; European Group for Blood and Marrow. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(5):439-49.
- Alegre A, Díaz MA, Madero L, Granda A, de la Vega A, Villa M, et al. Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in children: a simplified single-apheresis approach. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17(6):923-7.

10. Meagher RC, Herzig RH. Techniques of harvesting and cryopreservation of stem cells. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1993;7(3):501-33.
11. Diaz MA, Villa M, Alegre A, Lamana ML, de la Vega A, Granda A, et al. 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.
12. Diaz MA, Alegre A, Villa M, Granda A, de la Vega A, Ramirez M, et al. Pediatric experience with autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: influence of CD34+ cell dose in engraftment kinetics. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18(4):699-703.
13. Chao NJ, Blume KG. Bone marrow transplantation. Part II--autologous. *West J Med.* 1990;152(1):46-51. Comment in: *West J Med.* 1989;151(6):658-9.
14. Pein F, Michon J, Valteau-Couanet D, Quintana E, Frappaz D, Vannier JP, et al. High-dose melphalan, etoposide, and carboplatin followed by autologous stem-cell rescue in pediatric high-risk recurrent Wilms' tumor: a French Society of Pediatric Oncology study. *J Clin Oncol.* 1998;16(10):3295-301.
15. Ozkaynak MF, Sahdev I, Gross TG, Levine JE, Cheerva AC, Richards MK, et al. A pilot study of addition of amifostine to melphalan, carboplatin, etoposide, and cyclophosphamide with autologous hematopoietic stem cell transplantation in pediatric solid tumors: a pediatric blood and marrow transplant consortium study. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30(3):204-9.
16. Philip T, Bernard JL, Zucker JM, Pinkerton R, Lutz P, Bordigoni P, et al. High-dose chemoradiotherapy with bone marrow transplantation as consolidation treatment in neuroblastoma: an unselected group of stage IV patients over 1 year of age. *J Clin Oncol.* 1987;5(2):266-71.
17. Kletzel M, Hewlett B. Pediatric transplantation: results in solid tumors. *Curr Hematol Rep.* 2005;4(4):260-9.
18. Ozkaynak MF, Matthay K, Cairo M, Harris RE, Feig S, Reynolds CP, et al. Double-alkylator non-total-body irradiation regimen with autologous hematopoietic stem-cell transplantation in pediatric solid tumors. *J Clin Oncol.* 1998;16(3):937-44.
19. Kletzel M, Abella EM, Sandler ES, Williams LL, Ogden AK, Pollock BH, et al. Thiotepa and cyclophosphamide with stem cell rescue for consolidation therapy for children with high-risk neuroblastoma: a phase I/II study of the Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1998;20(1):49-54.
20. Pritchard J, McElwain TJ, Graham-Pole J. High-dose melphalan with autologous marrow for treatment of advanced neuroblastoma. *Br J Cancer.* 1982;45(1):86-94.
21. Ladenstein R, Pötschger U, Hartman O, Pearson AD, Klingebiel T, Castel V, Yaniv I, Demirer T, Dini G; EBMT Paediatric Working Party. 28 years of high-dose therapy and SCT for neuroblastoma in Europe: lessons from more than 4000 procedures. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41(Suppl 2):S118-27.
22. Campbell AD, Cohn SL, Reynolds M, Seshadri R, Morgan E, Geissler G, et al. Treatment of relapsed Wilms' tumor with high-dose therapy and autologous hematopoietic stem-cell rescue: the experience at Children's Memorial Hospital. *J Clin Oncol.* 2004;22(14):2885-90.
23. Agarwal R, Dvorak CC, Stockerl-Goldstein KE, Johnston L, Srinivas S. High-dose chemotherapy followed by stem cell rescue for high-risk germ cell tumors: the Stanford experience. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(7):547-52.
24. Burke MJ, Walterhouse DO, Jacobsohn DA, Duerst RE, Kletzel M. Tandem high-dose chemotherapy with autologous peripheral hematopoietic progenitor cell rescue as consolidation therapy for patients with high-risk Ewing family tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(2):196-8. Comment in: *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(2):115-6.
25. Fraser CJ, Weigel BJ, Perentesis JP, Dusenbery KE, DeFor TE, Baker KS, et al. Autologous stem cell transplantation for high-risk Ewing's sarcoma and other pediatric solid tumors. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(2):175-81.
26. Tanaka K, Matsunobu T, Sakamoto A, Matsuda S, Iwamoto Y. High-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem-cell transfusion after conventional chemotherapy for patients with high-risk Ewing's tumors. *J Orthop Sci.* 2002;7(4):477-82.
27. Lee JW, Kim H, Kang HJ, Kim HS, Park SH, Kim IO, et al. Clinical characteristics and treatment results of pediatric osteosarcoma: the role of high dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Cancer Res Treat.* 2008;40(4):172-7.
28. Butturini AM, Jacob M, Aguajo J, Vander-Walde NA, Villablanca J, Jubran R, et al. High-dose chemotherapy and autologous hematopoietic progenitor cell rescue in children with recurrent medulloblastoma and supratentorial primitive neuroectodermal tumors: the impact of prior radiotherapy on outcome. *Cancer.* 2009;115(13):2956-63.
29. Finlay JL, Dhall G, Boyett JM, Dunkel IJ, Gardner SL, Goldman S, Yates AJ, Rosenblum MK, Stanley P, Zimmerman RA, Wallace D, Pollack IF, Packer RJ; Children's Cancer Group. Myeloablative chemotherapy with autologous bone marrow rescue in children and adolescents with recurrent malignant astrocytoma: outcome compared with conventional chemotherapy: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;51(6):806-11.
30. Sanders JE. Growth and development after bone marrow transplantation. In Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, editors. *Bone Marrow Transplant.* Boston, Blackwell Scientific Publications; 1994. pp. 527-537.
31. Sanders JE, Buckner CD, Sullivan KM, et al. Growth and development after bone marrow transplantation. *Horm Res.* 1988;30(2-3):92-7.

Ambroxol for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory distress syndrome (Protocol)

Gonzalez Garay AG, Reveiz L, Velasco Hidalgo L, Solis Galicia C



**THE COCHRANE
COLLABORATION®**

This is a reprint of a Cochrane protocol, prepared and maintained by The Cochrane Collaboration and published in *The Cochrane Library* 2012, Issue 3

<http://www.thecochranelibrary.com>



TABLE OF CONTENTS

HEADER	1
ABSTRACT	1
BACKGROUND	2
OBJECTIVES	4
METHODS	4
ACKNOWLEDGEMENTS	8
REFERENCES	8
APPENDICES	9
HISTORY	10
CONTRIBUTIONS OF AUTHORS	11
DECLARATIONS OF INTEREST	11
SOURCES OF SUPPORT	11

[Intervention Protocol]

Ambroxol for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory distress syndrome

Alejandro G Gonzalez Garay¹, Ludovic Reveiz², Liliana Velasco Hidalgo¹, Cecilia Solis Galicia³

¹Methodology Research Unit/Neonatology, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico. ²Research Promotion and Development Team, Health Systems Based on Primary Health Care (HSS), Pan American Health Organization, Washington DC, USA.

³Scientific Information and Documentation, Instituto Nacional de Pediatría (Cochrane Mexico), Mexico City, Mexico

Contact address: Alejandro G Gonzalez Garay, Methodology Research Unit/Neonatology, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700 - C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacan, Mexico City, Distrito Federal, 04530, Mexico. pegasso.100@hotmail.com.

Editorial group: Cochrane Pregnancy and Childbirth Group.

Publication status and date: New, published in Issue 3, 2012.

Citation: Gonzalez Garay AG, Reveiz L, Velasco Hidalgo L, Solis Galicia C. Ambroxol for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 3. Art. No.: CD009708. DOI: 10.1002/14651858.CD009708.

Copyright © 2012 The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

ABSTRACT

This is the protocol for a review and there is no abstract. The objectives are as follows:

To evaluate the efficacy and safety of ambroxol given to pregnant women at risk of preterm birth to prevent neonatal RDS.

BACKGROUND

Description of the condition

Respiratory distress syndrome (RDS) is a disease caused by a deficiency or dysfunction of pulmonary surfactant. Pulmonary surfactant is an active agent that keeps open the pulmonary alveoli and facilitates the entry of air to the lungs, thus improving the oxygenation of the newborn.

The disease is found mainly in preterm newborns (before 37 weeks gestation) and is characterized by a progressive increase in respiratory effort and a decrease in the amount of air entering the lungs favoring hypoxia (a condition in which the body is deprived of an adequate oxygen supply). The radiological images of the lungs of these newborns have a fine granular diffuse pattern (Roberts 2006).

RDS affects up to 60% of newborns below 2500 g (Roberts 2006) and is the first cause of hospitalization in the neonatal intensive care (up to 12.7%) (Sarasqueta 1996).

These infants may develop several complications including: pulmonary hypertension, persistent ductus arteriosus (Appendix 1), intraventricular hemorrhage (bleeding in the brain), asphyxia (Appendix 1) and death (up to 33% of cases) (Carbajal 1998; Udaeta 2004).

Treatment requires the administration of exogenous pulmonary surfactant (natural or synthetic) (Appendix 1), mechanical ventilation (Appendix 1) and electrolyte therapy. Although these interventions have resulted in decreased mortality in 18% of cases, the treatments can result in other complications such as, pneumothorax (Appendix 1), bronchopulmonary dysplasia (oxygen dependency at 36 weeks post-menstrual age) (Appendix 1) and retinopathy (an eye disease caused by disorganized growth of retinal blood vessels which may result in scarring and retinal detachment due to the administration of oxygen) (Appendix 1) (Udaeta 2004).

Pulmonary surfactant is an active agent formed by: lipids, apoproteins (A, B, C and D), dipalmitoyl phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol (Soll 1997), which is necessary to decrease the force of attraction of the walls of the alveolus that favor the collapse and which facilitates the entry of air with minor respiratory effort, thereby improving the oxygenation of the newborn. When it is deficient or dysfunctional, the alveolus tends to collapse decreasing lung volume and promoting the formation of atelectasis (collapse of lung tissue) which alters the oxygenation (Appendix 1) (Soll 1998; Stark 1986).

Diverse risk factors have been associated with the development of RDS and include:

- preterm newborns before 37 weeks of gestation;
- newborns weight below 3500 g at birth;
- delivery by cesarean section;
- gestational diabetes;
- pregnant diabetic without therapy;
- meconium aspiration at birth (Appendix 1);

- older brother with SDR;
- multiple gestation;
- neonatal asphyxia (severely deficient supply of oxygen at birth) (Hansen 2000).

Description of the intervention

Many researchers have evaluated varied alternative treatments to prevent the development of RDS (Khalaf 2001; Roberts 2006; Soll 2011) including the use of the following.

- Tocolytic agents (medications used to suppress premature labour).
 - Cervical cerclage in order to prevent cervical incompetence and therefore reduce the risk of preterm delivery (Appendix 1).
 - Avoiding alcohol and smoking during pregnancy, because they could increase the risk of preterm delivery.
 - Administration of digoxin (drug used to treat some heart problems) to the newborns, however, when Soll et al analyzed the efficacy of digoxin through meta-analysis, the authors showed that digoxin did not decrease the risk of mortality in newborns with RDS (risk ratio (RR) 1.27) (Soll 2011).
 - Nasal administration of compressed air after birth to keep this route open to the alveoli so that gas exchange can be carried out. This intervention showed a significant reduction of the risk of associated mortality of RDS (RR 0.52) in one study (Khalaf 2001).
 - Implementation of antenatal corticosteroids to the pregnant women, which accelerate fetal lung maturation. In another systematic review, Roberts et al reported a significant risk reduction of RDS on newborns (RR 0.69; 95% confidence interval 0.59 to 0.73) comparing women who receive and did not receive treatment (Roberts 2006).

In spite of the study by Liggins et al (Liggins 1972), which demonstrated the effectiveness of antenatal corticosteroids therapy to reduce the incidence of RDS, it was not until 1987 when such treatment was adopted conventionally by obstetricians to decrease the mortality of newborns by RDS (Roberts 2006).

Corticosteroids enter the cells lining the walls of the alveoli (type II pneumocytes) and reach the nucleus where they give a signal to increase the production of proteins necessary for the proper functioning of the surfactant (B and C). This increases the release of the pulmonary agent within the pulmonary alveoli, thus leading to a decline in the force of attraction of the walls of the alveoli, making air enter with minor respiratory effort to improve the oxygenation of the newborn (Appendix 1) (Crowther 2007).

However, other studies have identified that the use of ambroxol administered to pregnant women before the birth of the newborn could prevent the development of RDS (Seifart 2004).

Ambroxol [*trans*-4-(2-amino-3,5-dibromobenzylamino)-cyclohexanol hydrochloride] is a metabolite of bromhexine whose main use is as a mucolytic agent that facilitates the removal of bronchial

secretions and is widely used to treat to treat infections of the upper respiratory tract. Its effect is to increase the ciliary movement of the epithelium in the air via the respiratory tract encouraging the mucus to be transported outwards from the respiratory tract (Disse 1987).

Ambroxol can be administered either orally or intravenously; in its oral form it is quickly absorbed through the intestine. Ambroxol has a half-life of 10 hours and its maximum concentration in blood plasma occurs within two and a half hours; 10% of the active substance is discarded by the faeces while 90% is eliminated via the kidneys. Both the oral and intravenous forms administered to pregnant women cross the placenta and reach adequate concentrations in the fetus without side-effects on those over the age of 28 weeks.

The optimal dose of ambroxol has not been established, but trials have observed that the following doses have resulted in the expected effects:

- children two to five years: 15 to 30 mg/day in three doses;
- children five to 12 years: 30 to 45 mg/day in three doses;
- children 12 years old to 18 years: 60 to 90 mg/day in three doses;
- adults: 60 to 180 mg/day in three doses.

The main side-effects of ambroxol are diarrhea, gastric irritation, nausea, vomiting and headache (Chalumeau 2002).

Other studies have found that ambroxol increases the production of pulmonary surfactant in type II pneumocytes, suggesting a role for preventing the development of RDS, and improving the survival of pregnant women, although the specific mechanisms by which this effect is produced are unknown. However, researchers have investigated how ambroxol might work in vitro and in humans studies (Seifart 2004).

How the intervention might work

Efficacy of ambroxol in vitro

Some in vitro studies have shown that ambroxol inhibits the activity of an enzyme responsible for degrading the pulmonary surfactant (*Lysosomal phospholipase*) resulting in an increase of this agent in the alveoli. A number of researchers have conducted studies in rabbits to examine the effectiveness of intravenously administered ambroxol to treat RDS, and found that the lungs of rabbits improved in maturity and there was a decrease in the incidence of RDS (Disse 1987).

Seifart 2004 conducted many studies in rats to identify other possible mechanisms by which ambroxol could reduce the destruction of surfactant and stimulate the activity of the agent. In one study, researchers administered intraperitoneal ambroxol in rabbits and noted that after 20 hours there was an increase in the concentration of protein B in the clear cells of the lung in the pulmonary alveoli

and a significant decrease in the amount of protein D, which improved the stability of the pulmonary surfactant and reduced the speed of destruction (Seifart 2004).

Efficacy of use ambroxol in humans

Some studies have evaluated the effectiveness of administration of ambroxol in humans, particularly the administration of the drug in the newborns.

The controlled double-blind, clinical trial by Marini 1987 carried out in five centers of perinatal care in Milan, compared ambroxol versus placebo. The trialists administered ambroxol to 28 babies weighing less than 2000 g with RDS who needed mechanical ventilation. The experimental group showed a significant reduction in mortality rate (39% compared with 53% in the placebo group $P < 0.05$).

It was also noted that the duration of mechanical ventilation was significantly lower in the group of newborns receiving ambroxol (270 hours) versus the group receiving placebo (396 hours) ($P < 0.05$) without any adverse events in the experimental group (Marini 1987).

A systematic review (Zhang 2010) that included six clinical studies comparing the efficacy of ambroxol in the first hours of life compared with conventional treatment (therapy of mechanical ventilation, electrolyte and acid - base) in infants under 36 weeks gestation weighing less at 1500 g reported the following findings:

- reduction in the risk for developing RDS (odds ratio (OR) 0.24; 95% CI 0.15 to 0.64) in babies treated with conventional ambroxol versus conventional treatment;
- reduction in the incidence rate of ventricular brain hemorrhage (OR 0.46; 95% CI 0.26 to 0.82) in the group treated with ambroxol compared with conventional treatment;
- reduction in the incidence of lung infections in newborns who received ambroxol in comparison with conventional treatment (OR 0.24; 95% CI 0.14 to 0.38);
- reduction in the incidence of patent ductus arteriosus in infants who were given ambroxol in comparison with conventional treatment (OR 0.33; 95% CI 0.17 to 0.67).

However, Zhang 2010 recommended that those results should be interpreted with caution due to the heterogeneity among the studies and the significant publication bias (Zhang 2010).

Other studies have evaluated the efficacy of ambroxol in pregnant women in preterm labour for preventing neonatal respiratory distress. Laoag-Fernandez 2000 conducted a trial with two groups of pregnant women in premature labour or with premature rupture of membranes and an estimated gestation between 27 to 34 gestational weeks. The ambroxol treatment group consisted of 39 women in whom 1000 mg of ambroxol diluted in 500 mL of 5% glucose solution was given intravenously for four hours once a day for three days, while the control group consisted of 41 women in whom ambroxol was not administered. The main measures included Apgar scores, clinical signs of one or more of the following:

respiratory rate of more than 60/min, intercostal retraction, alar flaring, expiratory grunting, cyanosis on room air and radiological evidence of RDS in their newborns. A significant decrease in the incidence of RDS as well as perinatal morbidity and mortality in the treatment group ($P < 0.01$) was found (Laoag-Fernandez 2000).

In another clinical trial, Molina 2004 evaluated the efficacy of ambroxol in pregnant women in the third trimester. Ambroxol was given orally to 10 women (30 mg every eight hours from week 28 until 32 gestational weeks to group A), while another group of 10 women received no drug. A sample of 3 mL to 4 mL of amniotic fluid was taken by amniocentesis (Appendix 1) at 32 gestational weeks and then the concentration of lamellar bodies was measured (an indirect measure of surfactant agent) and identified that this was significantly higher in treated women compared with the control group ($P = 0.01$). Findings show that oral ambroxol plays an important role in fetal lung maturation in women in the third trimester (Molina 2004).

Why it is important to do this review

Most studies have been conducted in newborns, however, there is insufficient information to determine whether giving ambroxol to pregnant women at risk of preterm birth prevents neonatal RDS in their infants. The purpose of this review is to evaluate the efficacy of administering ambroxol to mothers during preterm labour to reduce the incidence of RDS and subsequently to reduce neonatal morbidity and mortality.

OBJECTIVES

To evaluate the efficacy and safety of ambroxol given to pregnant women at risk of preterm birth to prevent neonatal RDS.

METHODS

Criteria for considering studies for this review

Types of studies

Randomized controlled trials that compare the administration of ambroxol given to pregnant women at risk of preterm birth with placebo or administration of antenatal corticosteroids (bethametasone and dexamethasone) Quasi-randomized studies are not eligible for this review.

Types of participants

Pregnant women, of any ethnicity, who are at risk of preterm birth, women in labour at less than 37 weeks gestation, carrying a baby of either sex with no evidence of congenital malformations (central nervous system, gastrointestinal tract, respiratory).

Types of interventions

- Ambroxol versus placebo or no treatment.
- Ambroxol versus antenatal corticosteroids (bethametasone or dexamethasone).
- Ambroxol + corticosteroids versus antenatal corticosteroids (bethametasone or dexamethasone).

Types of outcome measures

Primary outcomes

Neonatal outcomes

1. Incidence of RDS.
2. Perinatal mortality.

Maternal

1. Incidence of adverse effect (diarrhea, gastric irritation, nausea, vomiting and headache).

Secondary outcomes

Neonatal outcomes

1. Incidence of bronchopulmonary dysplasia (oxygen dependency at 36 weeks post-menstrual age).
2. Need for mechanical ventilation.
3. Administration of pulmonary surfactant.
4. Incidence of ventricular brain hemorrhage.
5. Incidence of necrotizing enterocolitis.

Maternal outcomes

1. Maternal mortality.

Search methods for identification of studies

Electronic searches

We will search the Cochrane Pregnancy and Childbirth Group's Trials Register by contacting the Trials Search Co-ordinator.

The Cochrane Pregnancy and Childbirth Group's Trials Register is maintained by the Trials Search Co-ordinator and contains trials identified from:

1. quarterly searches of the Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL);
2. weekly searches of MEDLINE;
3. weekly searches of EMBASE;
4. handsearches of 30 journals and the proceedings of major conferences;
5. weekly current awareness alerts for a further 44 journals plus monthly BioMed Central email alerts.

Details of the search strategies for CENTRAL, MEDLINE and EMBASE, the list of handsearched journals and conference proceedings, and the list of journals reviewed via the current awareness service can be found in the 'Specialized Register' section within the editorial information about the [Cochrane Pregnancy and Childbirth Group](#).

Trials identified through the searching activities described above are each assigned to a review topic (or topics). The Trials Search Co-ordinator searches the register for each review using the topic list rather than keywords.

In addition, we will search LILACS (1982 to current) and the WHO International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP) using the strategies detailed in [Appendix 2](#).

Searching other resources

We will search reference lists of retrieved studies. To identify unpublished studies, the review authors will contact study authors and manufacturers for knowledge of other studies.

We will not apply any language restrictions.

Data collection and analysis

Selection of studies

Two review authors will independently assess each reference identified by the search against the inclusion criteria. We plan to resolve any disagreements that may arise through discussion. Those references which appear to meet the inclusion criteria will be retrieved in full for further independent assessment by two review authors. If required, we will consult a third person.

Data extraction and management

For eligible studies, two review authors will independently extract data from the included trials using a standardized data extraction form. Overall, we plan to extract the following data: eligibility criteria, demographics (gestational age, gender, and country), characteristic of co-morbidities and treatment dose. We will discuss

any discrepancies between review authors and will achieve a final consensus. We will enter data into Review Manager software ([RevMan 2011](#)) and check them for accuracy.

When information regarding any of the above is unclear, we will attempt to contact authors of the original reports to provide further details.

Assessment of risk of bias in included studies

Each review author will independently assess the risk of bias of each trial using a simple form, and will follow the domain-based evaluation as described in the *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* ([Higgins 2011](#)). We will discuss any discrepancies between review authors and will achieve consensus on the final assessment. If required, we will consult a third person.

1) Random sequence generation (checking for possible selection bias)

We will describe for each included study the method used to generate the allocation sequence in sufficient detail to allow an assessment of whether it should produce comparable groups.

We will assess the method as:

- low risk of bias (any truly random process, e.g. random number table; computer random number generator);
- high risk of bias (any non-random process, e.g. odd or even date of birth; hospital or clinic record number);
- unclear risk of bias.

2) Allocation concealment (checking for possible selection bias)

We will describe for each included study the method used to conceal allocation to interventions prior to assignment and will assess whether intervention allocation could have been foreseen in advance of, or during recruitment, or changed after assignment.

We will assess the methods as:

- low risk of bias (e.g. telephone or central randomization; consecutively numbered sealed opaque envelopes);
- high risk of bias (open random allocation; unsealed or non-opaque envelopes, alternation; date of birth);
- unclear risk of bias.

3.1) Blinding of participants and personnel (checking for possible performance bias)

We will describe for each included study the methods used, if any, to blind study participants and personnel from knowledge of which intervention a participant received. We will consider that studies are at low risk of bias if they were blinded, or if we judge that the lack of blinding would be unlikely to affect results. We will assess blinding separately for different outcomes or classes of outcomes.

We will assess the methods as:

- low, high or unclear risk of bias for participants;
- low, high or unclear risk of bias for personnel.

3.2) Blinding of outcome assessment (checking for possible detection bias)

We will describe for each included study the methods used, if any, to blind outcome assessors from knowledge of which intervention a participant received. We will assess blinding separately for different outcomes or classes of outcomes.

We will assess methods used to blind outcome assessment as:

- low, high or unclear risk of bias.

4) Incomplete outcome data (checking for possible attrition bias due to the amount, nature and handling of incomplete outcome data)

We will describe for each included study, and for each outcome or class of outcomes, the completeness of data including attrition and exclusions from the analysis. We will state whether attrition and exclusions were reported and the numbers included in the analysis at each stage (compared with the total randomized participants), reasons for attrition or exclusion where reported, and whether missing data were balanced across groups or were related to outcomes. Where sufficient information is reported, or can be supplied by the trial authors, we will re-include missing data in the analyses which we undertake.

We will assess methods as:

- low risk of bias (e.g. no missing outcome data; missing outcome data balanced across groups);
- high risk of bias (e.g. numbers or reasons for missing data imbalanced across groups; 'as treated' analysis done with substantial departure of intervention received from that assigned at randomization);
- unclear risk of bias.

5) Selective reporting (checking for reporting bias)

We will describe for each included study how we investigated the possibility of selective outcome reporting bias and what we found.

We will assess the methods as:

- low risk of bias (where it is clear that all of the study's pre-specified outcomes and all expected outcomes of interest to the review have been reported);
- high risk of bias (where not all the study's pre-specified outcomes have been reported; one or more reported primary outcomes were not pre-specified; outcomes of interest are reported incompletely and so cannot be used; study fails to include results of a key outcome that would have been expected to have been reported);
- unclear risk of bias.

6) Other bias (checking for bias due to problems not covered by (1) to (5) above)

We will describe for each included study any important concerns we have about other possible sources of bias.

We will assess whether each study was free of other problems that could put it at risk of bias:

- low risk of other bias;
- high risk of other bias;
- unclear whether there is risk of other bias.

7) Overall risk of bias

We will make explicit judgements about whether studies are at high risk of bias, according to the criteria given in the *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* (Higgins 2011). With reference to (1) to (6) above, we will assess the likely magnitude and direction of the bias and whether we consider it is likely to impact on the findings. We will explore the impact of the level of bias through undertaking sensitivity analyses - see [Sensitivity analysis](#).

Measures of treatment effect

We will carry out statistical analysis using the Review Manager software (RevMan 2011). We will use fixed-effect meta-analysis for combining data in the absence of significant heterogeneity if trials are sufficiently similar. If we find significant heterogeneity, we will explore this by sensitivity analysis followed by random-effects, if required.

Dichotomous data

For dichotomous data, we will present results as summary risk ratio with 95% confidence intervals.

Continuous data

For continuous data, we will use the mean difference if outcomes are measured in the same way between trials. We will use the standardized mean difference to combine trials that measure the same outcome, but use different methods. If there is evidence of skewed data, this will be reported.

Unit of analysis issues

Cluster-randomized trials

We will include cluster-randomized trials in the analyses along with individually randomized trials. We will adjust their sample sizes using the methods described in the *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* using an estimate of the intra-cluster correlation co-efficient (ICC) derived from the trial (if possible), from a similar trial or from a study of a similar population.

If we use ICCs from other sources, we will report this and conduct sensitivity analyses to investigate the effect of variation in the ICC. If we identify both cluster-randomized trials and individually-randomized trials, we plan to synthesize the relevant information. We will consider it reasonable to combine the results from both if there is little heterogeneity between the study designs and the interaction between the effect of intervention and the choice of randomization unit is considered to be unlikely.

We will also acknowledge heterogeneity in the randomization unit and perform a subgroup analysis to investigate the effects of the randomization unit.

Dealing with missing data

For included studies, we will note levels of attrition. We will explore the impact of including studies with high levels of missing data in the overall assessment of treatment effect by using sensitivity analysis.

For all outcomes, we will carry out analyses, as far as possible, on an intention-to-treat basis, i.e. we will attempt to include all participants randomized to each group in the analyses, and all participants will be analyzed in the group to which they were allocated, regardless of whether or not they received the allocated intervention. The denominator for each outcome in each trial will be the number randomized minus any participants whose outcomes are known to be missing.

Where data are not reported for some outcomes or groups, we will attempt to contact the study authors for further information.

Assessment of heterogeneity

We will test for heterogeneity between trials, if appropriate, using the T^2 , I^2 and Chi^2 statistics. We will regard heterogeneity as substantial if I^2 is greater than 50% and either T^2 is greater than zero, or there is a low P value (less than 0.10) in the Chi^2 test for heterogeneity. We will explore the heterogeneity by subgroup analysis. We will use a random-effects meta-analysis as an overall summary if this is considered appropriate.

Assessment of reporting biases

Where we will suspect reporting bias (*see* 'Selective reporting bias' above), we will attempt to contact study authors asking them to provide missing outcome data. Where this is not possible, and the missing data are thought to introduce serious bias, the impact of including such studies in the overall assessment of results will be explored by a sensitivity analysis.

Where we suspect publication bias (e.g. where only statistically significant results are reported), we will explore this using funnel plots (Higgins 2011). We will involve the project statistician in the interpretation of such analysis. We will assess funnel plot asymmetry visually, and use formal tests for funnel plot asymmetry. For continuous outcomes, we will use the test proposed by

Egger 1997, and for dichotomous outcomes, we will use the test proposed by Harbord 2006. If asymmetry is detected in any of these tests or is suggested by a visual assessment, we will perform exploratory analyses to investigate it.

Data synthesis

We will carry out statistical analysis using the Review Manager software (RevMan 2011). We will use fixed-effect meta-analysis for combining data where it is reasonable to assume that studies are estimating the same underlying treatment effect: i.e. where trials are examining the same intervention, and the trials' populations and methods are judged sufficiently similar. If there is clinical heterogeneity sufficient to expect that the underlying treatment effects differ between trials, or if substantial statistical heterogeneity is detected, we will use random-effects meta-analysis to produce an overall summary if an average treatment effect across trials is considered clinically meaningful. The random-effects summary will be treated as the average range of possible treatment effects and we will discuss the clinical implications of treatment effects differing between trials. If the average treatment effect is not clinically meaningful we will not combine trials.

If we use random-effects analyses, we will present the results as the average treatment effect with 95% confidence intervals, and the estimates of T^2 and I^2 .

Subgroup analysis and investigation of heterogeneity

If we identify substantial heterogeneity, we will investigate it using subgroup analyses and sensitivity analyses. We will consider whether an overall summary is meaningful, and if it is, use random-effects analysis to produce it.

We plan to carry out the following subgroup analyses.

1. Pregnant women in preterm labour versus no labour.
2. Type of administration of ambroxol (oral versus intravenous).

Subgroup analyses will be restricted to the primary outcomes.

For fixed-effect inverse variance meta-analyses, we will assess differences between subgroups by interaction tests. For random-effects and fixed-effect meta-analyses using methods other than inverse variance, we will assess differences between subgroups by inspection of the subgroups' confidence intervals; non-overlapping confidence intervals indicate a statistically significant difference in treatment effect between the subgroups.

Sensitivity analysis

If sufficient trials are identified, we plan to conduct sensitivity analyses as follows.

We will analyze the following outcomes: neonatal outcomes, incidence of respiratory distress syndrome and perinatal mortality. Maternal outcomes Incidence of adverse effects.

1. Randomized controlled trials with high methodological quality (studies classified as having a 'low risk of bias' overall versus those identified as having a 'high risk of bias' overall) (Higgins 2011).

2. Attrition bias, as estimated by the percentage of participants lost to follow-up. Trials with a total attrition rate of more than 30%, or where differences between the groups exceed 10% - or both - will be excluded from the meta-analysis, but will be included in the review.

3. Blinded outcome assessment versus unblinded outcome assessment.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Carlos Gardenia for his contributions during the earliest phases of the protocol for translating drafts from Spanish to English.

As part of the pre-publication editorial process, this protocol has been commented on by three peers (an editor and two referees who are external to the editorial team), a member of the Pregnancy and Childbirth Group's international panel of consumers and the Group's Statistical Adviser.

REFERENCES

Additional references

Barkovich 2008

Barkovich AJ, Truwit CL. Brain damage from perinatal asphyxia: correlation of MR findings with gestational age. *American Journal of Neuroradiology* 2008;**11**(6):1087.

Carbajal 1998

Carbajal UJ, Pastrana HE. Use of Ambroxol in the initial therapy of respiratory distress syndrome [Empleo de Ambroxol en la terapia inicial del síndrome de dificultad respiratoria]. *Revista Mexicana de Pediatría* 1998;**65**(1): 15–8.

Chalumeau 2002

Chalumeau M, Chéron G, Assathiany R, Moulin F, Bavoux F, Bréart G, et al. Mucolytic agent for acute respiratory tract infections in infants: a pharmacoepidemiologic problem?. *Archives de Pédiatrie* 2002;**9**(11):1128–36.

Chen 2012

Chen Y, Susan K, Mahan A, Thornton J, Xu H, Schwarz M. Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II Disrupts Alveolar Epithelial Type II to Type I Cell Transdifferentiation. *Respiratory Research* 2012 Jan 3 [Epub ahead of print].

Crowther 2007

Crowther CA, Harding JE. Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007, Issue 3. [DOI: 10.1002/14651858.CD003935.pub2]

Daniels 2003

Daniels C, Orgeig S. Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing. *New in Physiological Sciences* 2003;**18**(4):151–7.

Disse 1987

Disse BG. The pharmacology of ambroxol—review and new results. *European Journal of Respiratory Diseases. Supplement* 1987;**153**:255–62.

Egger 1997

Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997;**315**(7109):629–34.

Fox 2008

Fox NS, Chervenak FA. Cervical cerclage: a review of the evidence. *Obstetrical & Gynecological Survey* 2008;**63**(1): 58–65.

Hansen 2000

Hansen T, Corbet A. Disorders of transition [Trastornos de la transición]. In: Taeush W, Ballard R editor(s). *Avery's Diseases of the Newborn. 7a*. Mexico: Harcourt, 2000: 602–13.

Harbord 2006

Harbord RM, Egger M, Sterne JA. A modified test for small-study effects in meta-analyses of controlled trials with binary endpoints. *Statistics in Medicine* 2006;**25**(20): 3443–57.

Higgins 2011

Higgins JPT, Green S, editors. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available from www.cochrane-handbook.org.

Kenyon 2010

Kenyon A, Abi-Nader K, Pandya P. Pre-term pre-labour rupture of membranes and the role of amniocentesis. *Fetal and Maternal Medicine Review* 2010;**21**(2):75.

Khalaf 2001

Khalaf MN, Brodsky N, Hurley J, Bhandari V. A prospective randomized, controlled trial comparing synchronized nasal intermittent positive pressure ventilation versus nasal continuous positive airway pressure as modes of extubation. *Pediatrics* 2001;**108**(1):13–7.

Kingner 1999

Kingner MC, Kruse J. Meconium aspiration syndrome: pathophysiology and prevention. *Journal of the American Board of Family Practice* 1999;**12**(6):450–66.

Laoag-Fernandez 2000

Laoag-Fernandez JB, Fernandez AM, Maruo T. Antenatal use of ambroxol for the prevention of infant respiratory

- distress syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2000;**26**(4):307–12.
- Liggins 1972**
Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 1972;**50**: 515–25.
- Marini 1987**
Marini A, Franzetti M, Gios G, Flauto U, Arosio A, Maccabruni M, et al. Ambroxol in the treatment of idiopathic respiratory distress syndrome. An interim report on a controlled double-blind multicenter study versus placebo. *Respiration* 1987;**51**(1):60–7.
- Molina 2004**
Molina G, Holguin E, Teran E. Oral ambroxol supplement in pregnant women induces fetal lung maturation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004;**191**(6):2177.
- Noppen 2008**
Noppen M, De Keukelerie T. Pneumothorax. *Respiration* 2008;**76**(2):121–7.
- Phelps 2001**
Phelps DL. Retinopathy of prematurity: history, classification, and pathophysiology. *NeoReviews* 2001;**2**(7): e153–66.
- RevMan 2011**
The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration. Review Manager (RevMan). 5.1. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2011.
- Roberts 2006**
Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 3. [DOI: 10.1002/14651858.CD004454.pub2]
- Sarasqueta 1996**
de Sarasqueta P, Basso G, Pataro MC, Colombrero E, Rodríguez H, González J, et al. Epidemiological study of the respiratory distress syndrome in the newborn infant [Estudio epidemiológico del síndrome de dificultad respiratoria en el recién nacido]. *Turkish Journal of Pediatrics* 1996;**38**(1):37–43.
- Schürch 1992**
Schürch S, Bachofen H, Possmayer F. Pulmonary surfactant: surface properties and function of alveolar and airway surfactant. *Pure and Applied Chemistry* 1992;**64**(11): 1745–50.
- Seifart 2004**
Seifart C, Clostermann U, Seifart U, Müller B, Vogelmeier C, Wichert B, et al. Cell-specific modulation of surfactant proteins by Ambroxol treatment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;**203**:27–35.
- Soll 1997**
Soll RF. Prophylactic animal derived surfactant extract for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1997, Issue 4. [DOI: 10.1002/14651858.CD000511]
- Soll 1998**
Soll RF. Synthetic surfactant for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1998, Issue 3. [DOI: 10.1002/14651858.CD001149]
- Soll 2011**
Soll RF. Digoxin for preventing or treating neonatal respiratory distress syndrome. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011, Issue 1. [DOI: 10.1002/14651858.CD001080.pub2]
- Stark 1986**
Stark AR, Frantz ID. Respiratory distress syndrome. *Pediatric Clinics of North America* 1986;**33**(3):533–44.
- Tobin 2006**
Tobin MJ. *Principles and Practice of Mechanical Ventilation*. 2nd Edition. McGraw Hill, 2006.
- Udaeta 2004**
Udaeta E, Alfaro M. Respiratory distress syndrome in the newborn [Síndrome de Dificultad Respiratoria en el recién nacido]. *Neonatología Clínica*. 1. Mexico: McGraw Hill, 2004:250–80.
- Zahaka 2002**
Zahaka KG, Patel CR. Congenital defects. In: Fanaroff AA, Martin RJ editor(s). *Neonatal - Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant*. 7th Edition. St. Louis Mosby, 2002: 1120–39.
- Zhang 2010**
Zhang ZQ. Ambroxol for the prevention of respiratory distress syndrome in preterm infants: a meta analysis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2010;**12**(11):858–63.
* Indicates the major publication for the study

APPENDICES

Appendix I. Glossary

Persistent ductus arteriosus: is a communication between the pulmonary artery and the aorta, in which the blood flows from the aorta (blood with oxygen) to the lung (blood without oxygen) causing overload of the circulatory system of the lung leading to pulmonary hypertension and heart failure (Zahaka 2002).

Asphyxia: is a condition of a severely deficient supply of oxygen to the body, resulting in a deficiency of oxygen in the blood and an increase in carbon dioxide in the blood and tissues (Barkovich 2008).

Pulmonary surfactant: is a lipoprotein complex (phospho lipoprotein) that is synthesized and secreted by the alveolar type II epithelial cell and the airway Clara cell into the thin liquid layer that lines the epithelium. It has two distinct functions: 1) it reduces surface tension of the air-liquid of the lung with an improved and efficient gas exchange; 2) It plays a role in host defense against infection and inflammation (Schürch 1992).

Mechanical ventilation: is a method of artificial breathing that employs mechanical means to force the air into and out of the lungs (Tobin 2006).

Pneumothorax: is a collapsed lung due an accumulation of air or gas into the space between the lungs and chest wall. This air pushes on the outside of the lung and makes it collapse (Noppen 2008).

Bronchopulmonary dysplasia (BPD): is a chronic lung disease that is most common among children who were born prematurely, with low birthweights and who received prolonged mechanical ventilation to treat respiratory distress syndrome. BPD is characterized by unusual abnormalities of the bronchioles, such as metaplasia (changing from one type of mature epithelium into another type of epithelium that does not belong to that organ), decrease in alveolar number and formation of cysts in the lung caused by an prolonged inflammatory process that disrupts distal lung neovascularization and alveolar formation during lung morphogenesis (Chen 2012).

Retinopathy: is an eye disease that occurs in babies born prematurely treated with high concentrations of oxygen. It is thought to be caused by disorganized growth of retinal blood vessels which may result in microphthalmia and blindness in serious cases. The population at risk for this disease are preterm newborns and very low birthweight (Phelps 2001).

Atelectasis: is a collapse of lung tissue due an absence of air in the entire, or part, of a lung. Acute atelectasis may occur as a result of surfactant deficiency among others.

Meconium aspiration: is a condition caused by inhalation of meconium (the first intestinal discharge) into the lungs of newborn, which obstructs the airway and therefore reduces gas exchange and the concentration of oxygen in the blood (Kingner 1999).

Cervical cerclage: is a surgical procedure for treating cervical incompetence in which the cervix is weak and may open too soon during pregnancy, causing preterm labor and delivery. Cervical cerclage involves suturing the cervix closed (Fox 2008).

Pulmonary Alveoli: are tiny air sacs along the walls in the lungs where oxygen and carbon dioxide are exchanged in the blood (Daniels 2003).

Amniocentesis: is a medical procedure used in prenatal diagnosis where, by percutaneous transabdominal puncture of the uterus during pregnancy, the physician obtains amniotic fluid (approximately 20 mL), to analyze the chemical characteristics and concentrations of hormones (Kenyon 2010).

Appendix 2. Search terms

LILACS (1982 to current)

ambroxol OR bromhexin\$

WHO International Trials Registry Platform

ambroxol or bromhexin%

HISTORY

Protocol first published: Issue 3, 2012

CONTRIBUTIONS OF AUTHORS

We appreciate the contribution of Ludovic Reveiz by his active participation in the direction of this protocol through the different methodological sections (form of search, types of analyses) that have been required to complete the necessary information and for the translation of the document from Spanish.

The contribution of Liliana Velasco in this protocol has been the location and evaluation of literature with the aim of obtaining information of adequate methodological quality for the drafting of the background and the preparation of the synthesis of the literature.

The contribution of Cecilia Solis has been the search and acquisition of necessary articles in electronic databases at regional and global levels required for carrying out this protocol.

Alejandro Gonzalez, author of this systematic review, who recorded, wrote and hosted the protocol in the time allocated, based on contributions from other authors and who will perform the review based on evidence from the literature to determine the efficacy of this treatment.

DECLARATIONS OF INTEREST

None known.

SOURCES OF SUPPORT

Internal sources

- Library of National Institute of Pediatrics, Mexico.

They will provide us with any article from their library, except when they do not have the articles. In this situation we will request this information from other Universities and health Institutes.

External sources

- No sources of support supplied

AUTHOR QUERY SHEET

Author(s): Juárez-Velázquez, Reyes-León, Salas-Labadía, Rivera-Luna, Velasco-Hidalgo, López-Hernández, López-Santiago, Paredes-Aguilera, Domínguez-López, Bernáldez, Pérez-Vera

Article title: Significance of *CASP8AP2* and *H2AFZ* expression in survival and risk of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia

Article no: 878458

Enclosures: 1) Query Sheet
3) Article Proofs

Dear Author,

Please check these proofs carefully. It is the responsibility of the corresponding author to check against the original manuscript and approve or amend these proofs. A second proof is not normally provided. Informa Healthcare cannot be held responsible for uncorrected errors, even if introduced during the composition process. The journal reserves the right to charge for excessive author alterations, or for changes requested after the proofing stage has concluded.

The following queries have arisen during the editing of your manuscript and are marked in the margins of the proofs. Unless advised otherwise, submit all corrections using the CATS online correction form. Once you have added all your corrections, please ensure you press the “Submit All Corrections” button.

[AQ1] Please review the table of contributors below and confirm that first and last names are structured correctly and that the authors are listed in the order of contribution.

Contrib. No.	Given name(s)	Surname	Suffix
1,2	Rocío	Juárez-Velázquez	
1	Adriana	Reyes-León	
1	Consuelo	Salas-Labadía	
3	Roberto	Rivera-Luna	
4	Liliana	Velasco-Hidalgo	
5	Gerardo	López-Hernández	
6	Norma	López-Santiago	

6	Rogelio	Paredes-Aguilera	
7	Aarón	Domínguez-López	
8	Roberto	Bernáldez	
1	Patricia	Pérez-Vera	

Page No.	Query Details	Author Reply
1	[AQ2] Affiliations are correct? Please check and advise	
3	[AQ3] We have inserted a running head. Please approve or provide an alternative.	
6	[AQ4] The p-value given in Figure 1 is 0.081 – should these be the same?	

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

Significance of *CASP8AP2* and *H2AFZ* expression in survival and risk of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia

Rocío Juárez-Velázquez^{1,2}, Adriana Reyes-León¹, Consuelo Salas-Labadía¹, Roberto Rivera-Luna³, Liliana Velasco-Hidalgo⁴, Gerardo López-Hernández⁵, Norma López-Santiago⁶, Rogelio Paredes-Aguilera⁶, Aarón Domínguez-López⁷, Roberto Bernáldez⁸ & Patricia Pérez-Vera¹

¹Laboratorio de Cultivo de Tejidos, ³División de Hemato/Oncología Pediátrica, ⁴Servicio de Oncología and ⁶Servicio de Hematología, Instituto Nacional de Pediatría, México D.F., México, ²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, ⁵Hospital para el Niño Poblano, Puebla, México, ⁷Laboratorio del Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México and ⁸Servicio de Hematología, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México

Abstract

Novel biomarkers for risk refinement and stratification in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) are needed to optimize treatment results. We studied the expression of *CASP8AP2* and *H2AFZ* associated with relapse and survival in bone marrow samples from newly diagnosed children with ALL. We found: (a) an increased risk for early relapse in those patients with low expression of *CASP8AP2* (odds ratio [OR] 3.93, 95% confidence interval [CI] 1.40–11.02, $p < 0.05$) confirming its usefulness as a predictive risk marker, although *H2AFZ* did not present the same effect; (b) patients with low expressions of *CASP8AP2* and *H2AFZ* had inferior survival rates ($p < 0.001$); (c) the predictive values regarding low expressions of *H2AFZ* and *CASP8AP2* and high white blood cell count suggest that these features could help to identify more accurately patients at greater risk of relapse.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, childhood, *CASP8AP2* expression, *H2AFZ* expression, risk of relapse

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in childhood. In Mexico the Popular Medical Insurance (PMI), which offers coverage for children who lack social medical protection, reported an incidence of 62.5 cases per one million/year [1]. Significant advances in the management of pediatric cancer have resulted in an increased cure rate in children diagnosed with ALL, which has risen from 10% in the 1960s to 76–86% currently in developed countries [2,3]. Some institutional highly specialized pediatric oncology units in Mexico report current overall survival for children with precursor B-cell ALL (B-ALL) of 75% [4].

Disease-free survival success is mainly due to the administration of suitable treatment protocols based on stratification of patients by risk groups [5–7]. The identification of patients prone to relapse is determined by high-risk, clinical laboratory criteria at the time of diagnosis and treatment response [2,3,8].

Although most parameters currently used in the classification of risk in children with ALL are universally considered, they remain insufficient for establishing a suitable stratification of all patients. This is the case for those patients who lack recognizable high-risk factors, who are treated as patients with standard risk and eventually relapse. *BCR-ABL* and *MLL-AF4* are genetic abnormalities with known clinical value in ALL. Recently, diverse studies using high-resolution genomic methods have been conducted to identify new molecular markers for risk that could eventually be used as therapeutic targets. Among the genes proposed as predictors of relapse in children with ALL, Caspase 8-associated protein 2 (*CASP8AP2*), histone family member 2 (*H2AFZ*), Ikaros family zinc finger 1 (*IKZF1*), Janus kinase 2 (*JAK2*) and cytokine receptor-like factor 2 (*CRLF2*) have been identified [9–12].

The *CASP8AP2* gene, also known as *FLICE* or *FLASH*, is located at chromosome region 6q15. This gene encodes a protein with multiple functions that is recognized as a key mediator in the apoptotic process through interaction with the Caspase 8 death-effector domain. Diverse studies have shown that it also participates in cell division [13], nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling [14], c-Myb activation [15,16], S-phase cell cycle progression [17] and the transcription and maturation of the 3' end of histone mRNAs [18]. Furthermore, *H2AFZ* (also known as *H2AZ*, *H2A/Z* or *H2A.Z*, located at 4q24) is a highly conserved basal histone

Correspondence: Patricia Pérez-Vera, PhD, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur No. 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, CP 04530, México D.F., México. Tel: + 52-55-10840900, ext. 1471. Fax: + 52-55-10845533. E-mail: pperezvera@yahoo.com

Received 19 July 2013; revised 25 November 2013; accepted 17 December 2013

1 that is expressed independently of DNA replication and is
2 involved in diverse biological processes, including the tran-
3 scriptional activation of genes [19,20], chromosomal segre-
4 gation and stability [21,22], heterochromatic gene silencing
5 [20] and cell cycle progression [19].

6 The clinical significance of *CASP8AP2* in childhood
7 ALL was first reported by Flotho *et al.*, who associated dif-
8 ferences in gene expression with response to chemothera-
9 peutic agents *in vitro*, and with patient event-free survival
10 (EFS) [9]. Low levels of *CASP8AP2* expression predicted
11 a lower EFS and higher rate of leukemia relapse. Flotho
12 *et al.* identified a gene signature of another 14 genes
13 whose expression was associated with minimal residual
14 disease (MRD) and low expression of *CASP8AP2*. *H2AFZ*
15 was one of those genes with low expression in patients
16 with relapse. Patients who showed low expression of both
17 genes had a suboptimal treatment response and eventu-
18 ally relapsed [10]. The usefulness of *CASP8AP2* expression
19 in the identification of patients with adverse ALL prog-
20 nosis is controversial [23]. Yang *et al.* did not observe an
21 association between the underexpression of *CASP8AP2*
22 and the presence of relapse in patients with B-ALL [24].
23 In contrast, Jiao *et al.* found that *CASP8AP2* is a potential
24 prognostic marker [11]. Based on these results, conducting
25 studies in different populations with ALL to support the
26 value of *CASP8AP2* expression as a predictive marker of
27 relapse are required. Moreover, *H2AFZ* expression has not
28 been evaluated in other populations of patients with ALL,
29 a fact that highlights the importance of understanding the
30 behavior of the *CASP8AP2* and *H2AFZ* genes in Mexican
31 children with ALL.

32 The aim of this study was to assess the prognostic value
33 of the gene expression levels of *CASP8AP2* and *H2AFZ*,
34 and associate these features with the presence of relapse,
35 EFS, relapse-free survival (RFS) and clinical and laboratory
36 risk parameters, in a cohort of recently diagnosed pediatric
37 patients with ALL treated in Mexican institutions.

38 **Materials and methods**

39 **Selection of patients**

40 Patients with ALL registered at the Instituto Nacional de
41 Pediatría and the Hospital para el Niño Poblano were con-
42 secutively recruited from February 2008 to December 2010.
43 Bone marrow samples were collected at diagnosis and their
44 clinical progression was followed. Samples from 86 patients
45 were available for molecular analysis. Cases in which RNA
46 could not be obtained, and patients who received treatment
47 prior to a bone marrow test, were excluded. The project was
48 approved and followed the guidelines of the Research and
49 Institutional Ethics Committees.

50 Leukemia was classified by immunophenotyping
51 according to the following criteria: for B-ALL, cCD179a+,
52 cCD22+ and CD19+ with additional analyses of CD34,
53 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), CD10,
54 CD20 and CD22; and for T-cell ALL (T-ALL), cCD3+ and
55 CD7+ with additional analysis of CD34, TdT, CD1, CD2,
56 CD3 and CD5. The treatment protocols were based on
57 the proposal for the PMI that includes the following
58

60 drugs: prednisone, L-asparaginase, vincristine, methotrexate,
61 etoposide, cytosine arabinoside, 6-mercaptopurine
62 and doxorubicin (Supplementary Table available online at
63 [http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.](http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.878458)
64 2013.878458) [25].

65 **RNA extraction**

66 Mononuclear cells were obtained from bone marrow sam-
67 ples using density gradient centrifugation (Lymphoprep/
68 Nycomed, Oslo, Norway). The purified cells were suspended
69 in lysis buffer and stored in liquid nitrogen until the time
70 of extraction. RNA was extracted using an RNeasy kit (QIA-
71 GEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's
72 instructions.

73 **Determination of *CASP8AP2* and *H2AFZ* gene expression**

74 Relative quantification of expression levels for the *CAS-*
75 *P8AP2*, *H2AFZ* and *ABL1* gene transcripts were deter-
76 mined by real-time reverse transcription polymerase chain
77 reaction (RT-PCR), utilizing a LightCycler 2.0 instrument
78 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). cDNA was
79 obtained by standard methods (Invitrogen, Paisley, UK).
80 Quantitative PCR amplification of the cDNA was performed
81 using TaqMan gene expression probes from the Universal
82 Probe Library System (Roche Applied Science, Germany).
83 The primer sets used for *CASP8AP2* NM_012115.2 were:
84 left primer 5'-CCAGAGAGTCGGAGGGAGT-3' and right
85 primer 5'-CCTTTTGAGAGTCACCACCTG-3'; for *H2AFZ*
86 NM_002106.3N:left primer 5'-CACCGTGGGTCCGATTAG-3'
87 and right primer 5'-GTCCTTCCAGCCTTACCG-3'. Quan-
88 tification of the transcripts was calculated by the $\Delta\Delta CT$
89 method using the *ABL1* gene as an endogenous control for
90 data normalization; the primer set was: *ABL1* NM_007373.2:
91 left primer 5'-CAGAGAAGGTCTATGAACTCATGC-3' and
92 right primer 5'-GGTGGATTTTCAGCAAAGGAG-3'. Gene
93 expression was analyzed in duplicate. Based on the methods
94 and descriptions of Flotho *et al.* and Yang *et al.*, the group
95 of patients was divided by percentiles into three groups
96 according to the level of each gene expression to classify
97 patients into groups of low, medium and high expression
98 (cut-off points were used for each gene) [9,24]. RFS analysis
99 was performed considering each category of gene expres-
100 sion. The group of low *CASP8AP2* expression presented
101 inferior RFS and were statistically different compared with
102 those of high and medium expression ($p = 0.002$; 0.011 ,
103 respectively); however, the high and medium expression
104 groups were not different ($p = 0.354$). When comparing
105 *CASP8AP2* and *H2AFZ* expression levels, similar results
106 were obtained (high vs. low, $p = 0.007$; medium vs. low,
107 $p = 0.03$; high vs. medium, $p = 0.317$). Moreover, the analy-
108 sis applied to *H2AFZ* expression showed that between low
109 and high expression groups there was a tendency toward
110 significance, and there were no differences for other com-
111 parisons. The survival analysis suggests that high and
112 medium expression have very similar behavior, and only in
113 the low expression group did statistical differences persist.
114 Based on these observations, high and medium expression
115 levels were combined in a single group for comparison with
116 the low expression group.

Statistical analysis

Univariate and multivariate analyses were carried out using central tendency tests to characterize the study sample, and to establish the type of distribution for each variable. Fisher's exact test was used to determine differences between groups of patients who did and did not show relapse in terms of CASP8AP2 and H2AFZ gene expression and clinical-biological characteristics. The Kaplan-Meier method was applied to obtain differences in RFS and EFS between the expression groups (low vs. medium and high). RFS was defined as the time elapsed from the date of diagnosis to the appearance of relapse, and EFS as the time elapsed from the date of diagnosis to the occurrence of death or relapse. Logistic regression analysis was performed to determine the risk of relapse in patients with low levels of CASP8AP2 or H2AFZ expression and different clinical and laboratory characteristics (gender, age, white blood cell [WBC] count). A 95% confidence interval (CI) was used, and all tests were considered statistically significant when the *p*-value was < 0.05. The predictive values of low gene expression and WBC count were determined. Additionally, the sensitivity, specificity and positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were calculated. The χ^2 test was used to determine differences between PPV values of WBC count and CASP8AP2 gene expression, and between relapse (early and late) and CASP8AP2 gene expression.

Results

Clinical and gene expression features and their association with relapse

Of the 86 patients, 74 were diagnosed with B-ALL and 12 with T-ALL; their clinical and laboratory characteristics are shown in Table I. The relative expression levels of CASP8AP2 and H2AFZ were determined, and patients were grouped according to expression (32/31 in the low group and 54/55 in the medium/high group). Twenty-one out of 86 patients relapsed, 18 presented early relapse (prior to 30 months from treatment initiation) and three relapsed at 32, 36 and 37 months, respectively; 15/74 (20%) patients with B-ALL and 6/12 (50%) with T-ALL relapsed. The influence of conventional prognostic factors (gender, age, WBC count, immunophenotype, gene fusions) and the different expression categories (low and medium/high) for each gene on the absence or occurrence of relapse were determined. A significant difference with respect to high WBC count (> 50 × 10⁹/L) and low CASP8AP2 expression was found (Fisher's exact test *p* < 0.05, Table I). Age and gene fusions were non-significant. Gene expression affected the time to relapse: low CASP8AP2 expression was significantly more frequent in patients with early relapse (13/18; χ^2 *p* < 0.05).

Risk of relapse for clinical and gene expression features

The hazard risk of relapse was analyzed according to the presence of each conventional risk factor and to low expression of the target genes. The results of this analysis yielded an increase in the risk of relapse in patients with a T-cell immunophenotype (odds ratio [OR] 3.93, 95% CI 1.10–13.94), high WBC count (OR 6.05, 95% CI 2.03–17.98) and low CASP8AP2 gene expression (OR 3.93, 95% CI 1.40–11.02, univariate

Table I. Clinical and gene expression features of the ALL cohort and their association with relapse.

Feature	Total no. (%)	Relapse		<i>p</i> -Value
		No	Yes	
Age				
1-9 years	69 (80)	52	17	1.00
< 1 or ≥ 10 years	17 (20)	13	4	
Gender				
Male	48 (55)	35	13	0.61
Female	38 (45)	30	8	
WBC count				
< 50 × 10 ⁹ /L	68 (79)	56	12	0.01
≥ 50 × 10 ⁹ /L	18 (21)	9	9	
Immunophenotype				
B-ALL	74 (86)	59	15	0.06
T-ALL	12 (14)	6	6	
CASP8AP2				
Low expression	32 (37)	19	13	0.01
Medium/high expression	54 (63)	46	8	
H2AFZ				
Low expression	31 (36)	21	10	0.29
Medium/high expression	55 (64)	44	11	
BCR-ABL				
Positive	3 (3.5)	2	1	1.00
Negative	83 (96.5)	63	20	
TEL-AML1				
Positive	7 (8)	7	0	0.2
Negative	79 (92)	58	21	
E2A-PBX1				
Positive	2 (2)	0	2	0.06
Negative	84 (98)	65	19	
MLL-AF4				
Positive	0	0	0	1.00
Negative	86 (100)	65	21	
SIL-TAL1				
Positive	1 (1)	1	0	1.00
Negative	85 (99)	64	21	

ALL, acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood cell.

logistic regression *p* < 0.05, Table II). Multivariate analysis was used to analyze these parameters, and the significant difference found for high WBC count and low CASP8AP2 expression persisted (OR 1.72, 95% CI 0.004–5.35 and OR 1.14, 95% CI 0.28–3.40, respectively; multivariate logistic regression *p* < 0.05). However, the risk of relapse in those patients with lower WBC count (< 50 × 10⁹/L) and low expression of CASP8AP2 was not statistically significant (OR 1.13, 95% CI 0.377–3.381, *p* = 0.82).

Survival analysis for CASP8AP2 and H2AFZ expression groups

Kaplan-Meier curves were generated to estimate the impact of CASP8AP2 and H2AFZ gene expression on RFS and

Table II. Risk analysis for clinical and gene expression features.

	Relapse, OR (95% CI)	<i>p</i> -Value	Non-relapse, OR (95% CI)
Age			
< 1 or ≥ 10 years	0.94 (0.27–3.27)	0.924	1.06 (0.30–3.69)
Immunophenotype			
T-ALL	3.93 (1.10–13.94)	0.034	0.25 (0.72–0.90)
WBC count			
> 50 × 10 ⁹ /L	6.05 (2.03–17.98)	0.001	0.16 (0.56–0.49)
CASP8AP2			
Low expression	3.93 (1.40–11.02)	0.009	0.25 (0.09–0.71)
H2AFZ			
Low expression	1.90 (0.69–5.18)	0.20	0.52 (0.19–1.44)

ALL, acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood cell.

1 EFS. These curves showed superior RFS (log-rank $p = 0.001$)
 2 [Figure 1(A)] in patients with medium/high levels of
 3 *CASP8AP2* gene expression in comparison with the low
 4 expression group. The same trend was observed after analyz-
 5 ing the different levels of *H2AFZ* gene expression; however,
 6 for this gene the difference between groups was not signifi-
 7 cant [Figure 1(B)]. The EFS analysis revealed that those
 8 patients who presented lower expression of the studied genes
 9 had lower EFS compared to patients with medium/high
 10 expression ($p < 0.05$) [Figures 1(C) and 1(D)].

11 The group of patients with low expression levels of
 12 both genes showed the lowest RFS and EFS [$p < 0.001$,
 13 Figures 2(A) and 2(B)] compared to patients with medium/
 14 high expression for both genes or with low expression for
 15 only one gene.

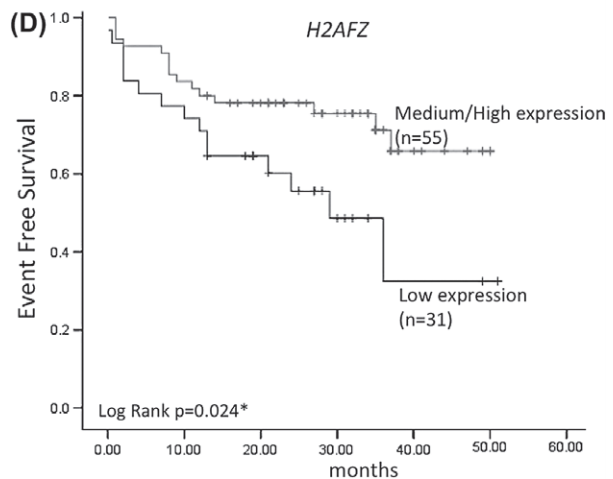
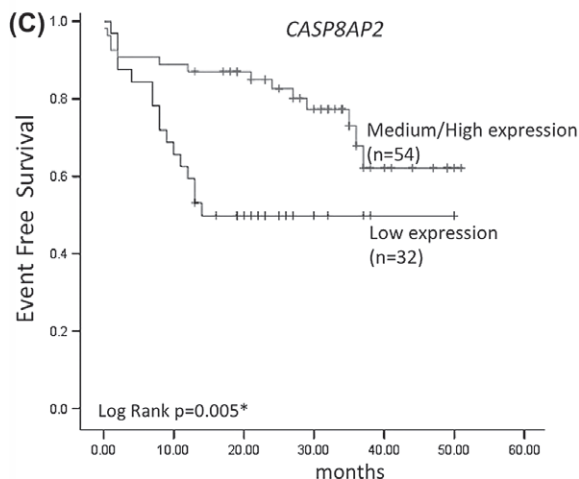
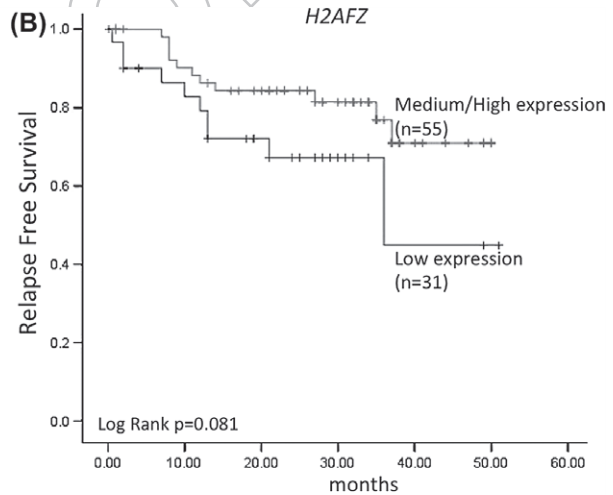
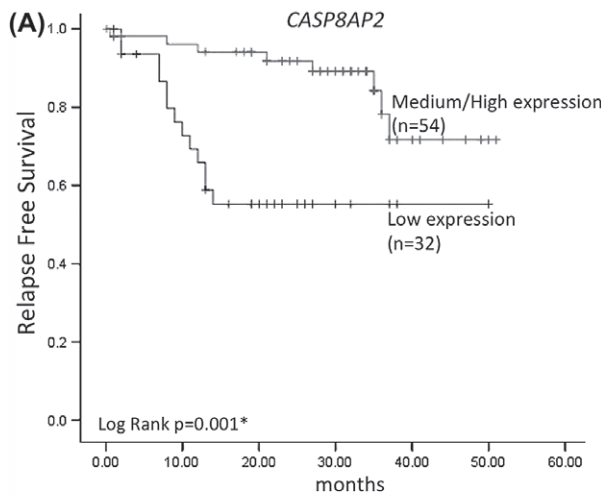
17 **Predictive value of WBC count, *CASP8AP2*
 18 and *H2AFZ* low expression in relapse**

19 Additionally, the predictive value for relapse of low
 20 expression levels of the target genes was determined. For
 21 comparison, high WBC count was used as a reference because
 22 it is a well-established predictor of relapse. This analysis
 23 showed that the PPV and NPV of low expression levels for

both genes were close to the values determined for WBC 60
 ($\chi^2 p = 0.15$, Table III). To determine the predictive values 61
 of the combination of these positive parameters, high WBC 62
 count and low expression of both genes were analyzed. 63
 Higher values of sensitivity-specificity and PPV-NPV were 64
 observed compared to the values obtained separately for 65
 each of these parameters (Table III). 66

68 **Discussion**

69
 70 Recently, genomic approaches have been applied to find
 71 novel genetic risk markers that will allow the stratification
 72 of children with ALL into risk groups at diagnosis, thereby
 73 leading to an improvement in RFS. Changes in the tran-
 74 scriptome of leukemic blasts have been associated with the
 75 presence of MRD, but these changes have been relatively
 76 unexplored in terms of survival in diverse populations that
 77 follow different therapeutic regimens. Among the genes
 78 associated with adverse responses to treatment, low levels
 79 of *CASP8AP2* and *H2AFZ* expression have been highlighted
 80 for their association with a higher cumulative incidence
 81 of relapse [9,10]. The objective of this study was to analyze
 82 the expression of these two genes at diagnosis in a group of
 83



57 Figure 1. Kaplan-Meier analysis of RFS and EFS according to gene expression. (A) Patients with medium/high *CASP8AP2* expression have superior
 58 RFS ($p = 0.001$); (B) patients with low *H2AFZ* expression tend to have lower RFS; (C, D) patients with lower gene expression have minor improvements
 59 in EFS ($p < 0.005$; $p < 0.024$).

60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118

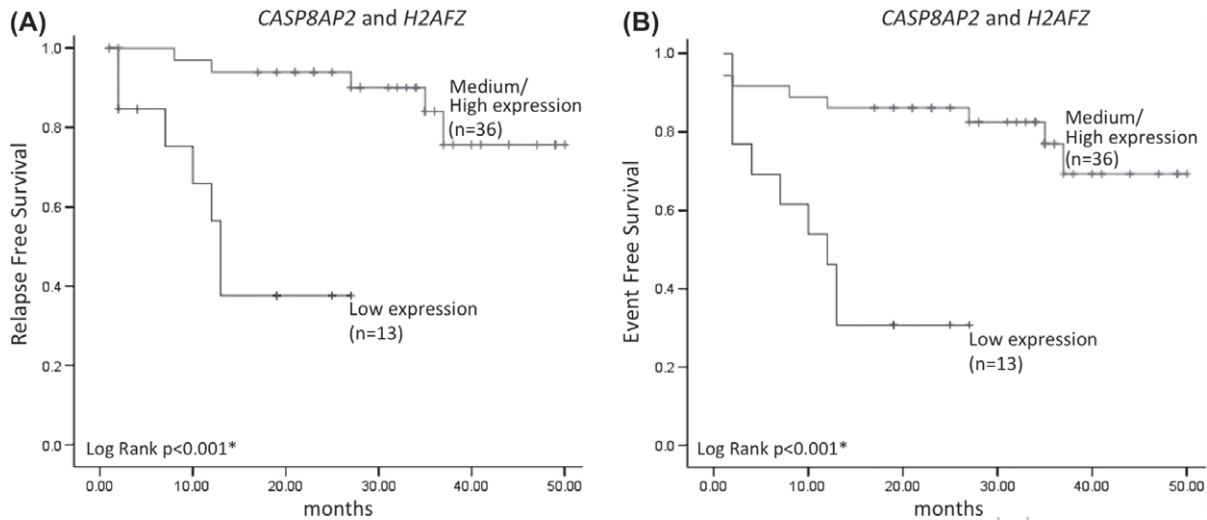


Figure 2. Kaplan-Meier analysis of RFS and EFS according to expression of *CASP8AP2* and *H2AFZ*. (A) Patients with medium/high *CASP8AP2*/*H2AFZ* expression have superior RFS ($p < 0.001$) and (B) superior EFS ($p < 0.001$).

children with ALL. We determined the association between the levels of gene expression and patients' clinical progression, as well as attempting to define whether these two genetic markers could be candidates for inclusion in the initial risk classification of our population.

The proapoptotic function of *CASP8AP2*, its low expression in ALL blasts in patients with MRD, and the cell resistance to drugs observed when the promoter of *CASP8AP2* is methylated, suggest that this gene could be implicated in a suboptimal treatment response. Our results show that those patients with low expression of *CASP8AP2* also had lower RFS and EFS. These results are in agreement with those of Flotho *et al.* in a study conducted in a cohort of 99 patients, where those with low expression of *CASP8AP2* and *H2AFZ* showed lower EFS ($p = 0.02$) and a greater cumulative incidence of relapse ($p = 0.01$) [10]. Similarly, *CASP8AP2* expression was analyzed in a cohort study of 39 children from Beijing with ALL at diagnosis; in this study, the authors reported that patients with low expression levels showed a greater percentage of relapse and lower EFS and overall survival compared to the high expression group; this result was verified in another cohort of 106 patients [11]. However, the usefulness of *CASP8AP2* as a risk marker remains controversial, since Yang *et al.* found no biological significance in a group of 90 children with B-ALL recruited by the Taiwan Pediatric Oncology Group [24].

The biological basis for the variation of *CASP8AP2* expression could be associated with the occurrence of a deletion at the 6q15q16.1 region, which corresponds to

the gene's location. In patients with T-ALL it has been demonstrated that the deletion results in a decrease in *CASP8AP2* expression; these findings have been associated with the presence of MRD [26]. An extensive variation in incidence of the 6q15q16.1 deletion has been reported: it is observed in from 11% up to 32% of children with ALL, occurring in both lineages (16% in B-ALL and 11% in T-ALL) [27–29]. This deletion has been associated with adverse characteristics such as hyperleukocytosis, as frequently in B-ALL as in T-ALL. In adults with T-ALL this deletion is particularly frequent (50%), and has been observed in association with unfavorable clinical progression [30]. Furthermore, other possibilities of *CASP8AP2* silencing should be considered: aberrant methylation in the promoter of *CASP8AP2* has been reported in cancer cells, contributing to prolonged cell survival and resulting in drug resistance [31]. Epigenetic mechanisms affecting *CASP8AP2* expression must be further explored in patients with ALL.

This is the second study to evaluate the usefulness of *H2AFZ* expression as a relapse risk marker in childhood ALL. A low level of *H2AFZ* expression has been associated with resistance to chemotherapy in *in vitro* assays. Regarding the biological relationship between *CASP8AP2* and *H2AFZ*, it has been shown that inhibition of *CASP8AP2* gene expression affects the transcription and processing of the H2A histone family [18]. This finding suggests that these two genes could converge in functional processes, although the mechanism of interaction has not yet been established.

Table III. Predictive values for relapse of WBC count, *CASP8AP2* and *H2AFZ* gene expression.

	Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	Positive predictive value (%) (95% CI)	Negative predictive value (%) (95% CI)
WBC count ≥ 50 ($10^9/L$)	43 (22.6–65.5)	86 (74.8–93.1)	50 (26.8–73.2)	82 (70.8–90.1)
<i>CASP8AP2</i> low expression	62 (38.7–81.0)	71 (58.8–81.0)	41 (24.2–59.2)	85 (72.3–92.9)
<i>H2AFZ</i> low expression	48 (26.4–69.6)	68 (54.8–78.4)	32 (17.3–51.4)	80 (66.6–89.1)
<i>CASP8AP2</i> / <i>H2AFZ</i> low expression	33 (15.5–56.9)	90 (80.3–96.2)	54 (26.1–79.6)	81 (69.6–88.7)
WBC count/ <i>CASP8AP2</i> low expression	54 (26.1–79.6)	95 (82.2–99.1)	78 (40.2–96.0)	87 (72.5–94.4)
WBC count/ <i>H2AFZ</i> low expression	42 (16.5–71.4)	94 (81.4–99.1)	71 (30.2–94.9)	84 (69.3–92.8)
WBC/ <i>CASP8AP2</i> low expression/ <i>H2AFZ</i> low expression	62 (25.9–89.7)	96 (78.4–99.8)	83 (36.5–99.1)	89 (70.6–97.2)

WBC, white blood cell.

1 With the purpose of determining whether low expres- 60
 2 sion of *CASP8AP2* and *H2AFZ* could be considered as a risk 61
 3 marker for relapse in our group of patients, an analysis of 62
 4 hazard of relapse was performed taking into account the 63
 5 low expression of *CASP8AP2* and *H2AFZ* and conventional 64
 6 clinical risk factors as variables. The results showed an 65
 7 increase in the risk of relapse for patients with T-cell 66
 8 immunophenotype, high WBC count and low *CASP8AP2* 67
 9 expression. These results are in agreement with those found 68
 10 in the survival analysis, where low levels of *CASP8AP2* expres- 69
 11 sion were associated with lower RFS and EFS. The patients 70
 12 with low expression of *H2AFZ* tended to have low RFS, but 71
 13 the association was not significant ($p = 0.082$). Additionally, 72
 14 it was observed that patients with low levels of *CASP8AP2* 73
 15 and *H2AFZ* expression had a greater cumulative incidence 74
 16 of relapse. This result is similar to that reported by Flotho 75
 17 *et al.* Interestingly, in the studied group, all patients who 76
 18 showed relapse and low expression of *CASP8AP2* relapsed 77
 19 early. These data suggest that low *CASP8AP2* expression 78
 20 could be useful as a predictive marker of early relapse at 79
 21 diagnosis, and its predictability could be increased when 80
 22 low expression of *H2AFZ* is also present. Although age and 81
 23 specific gene fusions are recognized risk factors, they were 82
 24 not statistically significant in the studied patients, presuma- 83
 25 bly due to sample size; also, only one patient was less than 84
 26 1 year old. It is also important to include MRD measurement 85
 27 in order to determine whether gene expression is associated 86
 28 with early treatment response. 87

29 The results presented thus far are promising, indicat- 88
 30 ing the usefulness of *CASP8AP2* as a predictive marker of 89
 31 relapse in Mexican children with ALL. Analysis of the sensi- 90
 32 tivity, specificity, PPV and NPV (Table III) reveals that the 91
 33 low expression level of each individual gene is associated 92
 34 with similar values of sensitivity and specificity as compared 93
 35 to high WBC count. However, when the expression levels of 94
 36 both genes are analyzed together, the specificity, PPV and 95
 37 NPV are increased. Among the genetic markers proposed 96
 38 in this study, *CASP8AP2* has the greater utility in the initial 97
 39 screening of patients, with a NPV of 85% (95% CI 72.3–92.9). 98
 40 This value increases when low level of *CASP8AP2* expres- 99
 41 sion is used in combination with high WBC count (87%, 95% 100
 42 CI 72.5–94.4). When low levels of expression of both genes 101
 43 and high leukocyte count are analyzed together, the NPV 102
 44 increases to 89% (95% CI 70.6–97.2). 103

45 The analysis of low gene expression combined with high 104
 46 WBC count increased sensitivity, specificity and predic- 105
 47 tive values, although the confidence intervals show that 106
 48 sample size should be increased in order to obtain more 107
 49 accurate values. For the studied group, high expression of 108
 50 *CASP8AP2* and low WBC count were useful markers for 109
 51 identifying patients less prone to relapse. As for other risk 110
 52 factors, *CASP8AP2* expression is not an independent marker 111
 53 of relapse, but is a promising candidate to be included in 112
 54 the gene signature for detecting children with ALL at risk, 113
 55 mainly in countries where MRD analysis is not feasible. 114
 56 The identification of these informative genes is relevant for 115
 57 countries with limited resources, in order to design useful 116
 58 and cost-effective assays for the screening of our children 117
 59 with ALL. This analysis demonstrates that the application of 118

well-established risk markers, such as high WBC count, with 60
 the gene expression markers proposed in this study could be 61
 useful for the stratification of Mexican children with ALL. 62

63 It should be noted that follow-up of the studied patients 63
 64 was feasible because they are part of the PMI program, which 64
 65 allows for the treatment of patients with diverse oncological 65
 66 diseases, reducing the number of cases who abandon treat- 66
 67 ment. The percentage of patients without relapse (75%) was 67
 68 found to be among the highest values reported in Mexico, 68
 69 but lower than those observed in developed countries. It 69
 70 is important to consider that some regions of Mexico with 70
 71 a lower socioeconomic level have inferior rates of EFS in 71
 72 patients with acute leukemia [32]. For this reason, the same 72
 73 expression analysis should be extended to patients who are 73
 74 treated in different regions of the country, to determine its 74
 75 prognostic significance and applicability. However, other 75
 76 factors such as adherence to treatment and the resolution of 76
 77 treatment-related issues should not be ruled out. 77

78 These results suggest that low expression levels of both 78
 79 genes at the time of ALL diagnosis could be used as a risk 79
 80 marker for relapse, besides others. The gene expression 80
 81 analysis discussed here, in addition to previously estab- 81
 82 lished prognostic factors, could contribute to the initial risk 82
 83 stratification of children with ALL. However, it is necessary 83
 84 to increase the study sample to include patients under 84
 85 different treatment protocols from diverse geographical 85
 86 regions of Mexico, and also from other countries, to deter- 86
 87 mine the impact and applicability of these new param- 87
 88 eters. Further research is therefore required to elucidate 88
 89 the biological interaction of these markers, their role in the 89
 90 progression of ALL and their potential contribution to the 90
 91 risk of relapse. 91

92 Acknowledgements 93

94 The authors would like to thank the nurses of the Área 95
 96 de Quimioterapia Ambulatoria (AQUA) at the Instituto 96
 97 Nacional de Pediatría, for their assistance in sample collection. 97

98 **Potential conflict of interest:** Disclosure forms provided 99
 100 by the authors are available with the full text of this article at 100
 101 www.informahealthcare.com/lal. 101

102 Financial support was provided by CONACyT FONSEC 102
 103 SSA/IMSS/ISSSTE/44402 (P.P.-V.). 103

104 This article constitutes a partial fulfillment of the 104
 105 Graduate Program in Biological Sciences of the National 105
 106 Autonomous University of México (UNAM). Rocío Juárez- 106
 107 Velázquez acknowledges the scholarship and financial 107
 108 support provided by the National Council of Science and 108
 109 Technology (CONACyT) PhD grant 165427, and UNAM. 109

110 References 111

- 112 [1] Rivera-Luna R, Correa-González C, Altamirano-Alvarez E, et al. 113
 114 Incidence of childhood cancer among Mexican children registered 114
 115 under a public medical insurance program. *Int J Cancer* 2013;132: 115
 116 1646–1650. 116
 117 [2] Neale GAM, Campana D, Pui C-H. Minimal residual disease 117
 118 detection in acute lymphoblastic leukemia: real improvement with 118
 the real-time quantitative PCR method? *J Pediatr Hematol Oncol* 118

- [3] Pui C-H, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29:551-565.
- [4] Rivera-Luna R, Olaya-Vargas A, Velásquez-Aviña M, et al. Early death in children with acute lymphoblastic leukemia: does malnutrition play a role? *Pediatr Hematol Oncol* 2008;25:17-26.
- [5] Rabin K, Man T-K, Lau CC. Personalized care of pediatric cancer patients. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2008;62:173-188.
- [6] Duffy MJ, Crown J. A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin Chem* 2008;54:1770-1779.
- [7] Izraeli S. Application of genomics for risk stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: from bench to bedside? *Br J Haematol* 2010;151:119-131.
- [8] Bhojwani D, Howard SC, Pui C-H. High-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9:S222-S230.
- [9] Flotho C, Coustan-Smith E, Pei D, et al. Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2. *Blood* 2006;108:1050-1057.
- [10] Flotho C, Coustan-Smith E, Pei D, et al. A set of genes that regulate cell proliferation predicts treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;110:1271-1277.
- [11] Jiao Y, Cui L, Gao C, et al. CASP8AP2 is a promising prognostic indicator in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2012;36:67-71.
- [12] Juárez-Velázquez MR, Salas-Labadía C, Reyes-León A, et al. Genetic markers in the prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. In: Mejia-Arangure JM, editor. *Clinical epidemiology of acute lymphoblastic leukemia - from the molecules to the clinic*. Rijeka, Croatia: In Tech; 2013. pp 193-235.
- [13] Kittler R, Putz G, Pelletier L, et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 2004;432:1036-1040.
- [14] Choi YH, Kim KB, Kim HH, et al. FLASH coordinates NF-kappa B activity via TRAF2. *J Biol Chem* 2001;276:25073-25077.
- [15] Alm-Kristiansen AH, Saether T, Matre V, et al. FLASH acts as a co-activator of the transcription factor c-Myb and localizes to active RNA polymerase II foci. *Oncogene* 2008;27:4644-4656.
- [16] Alm-Kristiansen AH, Lorenzo PI, Molværsmyr A-K, et al. PIAS1 interacts with FLASH and enhances its co-activation of c-Myb. *Mol Cancer* 2011;10:21.
- [17] Barcaroli D, Dinsdale D, Neale MH, et al. FLASH is an essential component of Cajal bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14802-14807.
- [18] Yang X, Xu B, Sabath I, et al. FLASH is required for the endonucleolytic cleavage of histone pre-mRNAs but is dispensable for the 5' exonucleolytic degradation of the downstream cleavage product. *Mol Cell Biol* 2011;31:1492-1502.
- [19] Nekrasov M, Amrichova J, Parker BJ, et al. Histone H2A.Z inheritance during the cell cycle and its impact on promoter organization and dynamics. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19:1076-1083.
- [20] Soboleva TA, Nekrasov M, Pahwa A, et al. A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19:25-30.
- [21] Greaves IK, Rangasamy D, Ridgway P, et al. H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:525-530.
- [22] Huh YH, Sherley JL. Molecular cloaking of H2A.Z on mortal DNA chromosomes during nonrandom segregation. *Stem Cells* 2011;29:1620-1627.
- [23] Camitta BM. Colonel Mustard, with the rope, in the ballroom. *Blood* 2006;108:785.
- [24] Yang Y-L, Lin S-R, Chen J-S, et al. Expression and prognostic significance of the apoptotic genes BCL2L13, Livin, and CASP8AP2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2010;34:18-23.
- [25] Consejo Nacional para la Prevencion y el Tratamiento del Cancer en la Infancia y la Adolescencia. In: Rivera-Luna R, editor. *Protocolos Técnicos Cancer en Niños*. México, D.F.: Edamsa Impresiones S.A. de C.V.; 2010.
- [26] Remke M, Pfister S, Kox C, et al. High-resolution genomic profiling of childhood T-ALL reveals frequent copy-number alterations affecting the TGF-beta and PI3K-AKT pathways and deletions at 6q15-16.1 as a genomic marker for unfavorable early treatment response. *Blood* 2009;114:1053-1062.
- [27] Hayashi Y, Raimondi SC, Look AT, et al. Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;76:1626-1630.
- [28] Takeuchi S, Koike M, Seriu T, et al. Frequent loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6: identification of two distinct regions of deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1998;58:2618-2623.
- [29] Merup M, Moreno TC, Heyman M, et al. 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998;91:3397-3400.
- [30] Mancini M, Vegna ML, Castoldi GL, et al. Partial deletions of long arm of chromosome 6: biologic and clinical implications in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2002;16:2055-2061.
- [31] Lee K-D, Pai M-Y, Hsu C-C, et al. Targeted Casp8AP2 methylation increases drug resistance in mesenchymal stem cells and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;422:578-585.
- [32] Pérez-Cuevas R, Doubova SV, Zapata-Tarres M, et al. Scaling up cancer care for children without medical insurance in developing countries: the case of Mexico. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:196-203.

Supplementary material available online

Supplementary Table showing national treatment protocols

40		99
41		100
42		101
43		102
44		103
45		104
46		105
47		106
48		107
49		108
50		109
51		110
52		111
53		112
54		113
55		114
56		115
57		116
58		117
59		118

1 *Supplementary material for Juárez-Velázquez R, et al., Significance of CASP8AP2 and H2AFZ expression in survival and risk* 60
 2 *of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia, Leukemia & Lymphoma, 2014, doi: 10.3109/10428194.2013.878458.* 61

3
4
5
6 Supplementary Table. National Treatment Protocols for High Risk and Standard Risk ALL. 65

7 **Protocol for High Risk** 66

Treatment stage	Drug	Dosage	Days
Steroid window	Prednisone	40mg/m ²	-7, -6, -5, -4, -3, -2, -1
Induction	Vincristine	1.5mg/m ²	1, 8, 15, 22
	Prednisone	40mg/m ²	1-28
	Doxorubicin	25mg/m ²	1, 8
	L-asparaginase	10,000 IU/m ²	2, 4, 6, 8, 10, 12
	Etoposide	300mg/m ²	22, 25, 29
	Cytosine arabinoside	300mg/m ²	22, 25, 29
	Triple intrathecal therapy (IT)**		1, 8, 15, 22
Consolidation	Methotrexate (24 hour infusion) (Follow by leukovorin rescue at 48 hours)	2g/m ²	43, 50
	6-mercaptopurine	75mg/m ²	43-56
	IT**		43, 50
Maintenance Each agent is administered as single dose, except for prednisone which is administered daily for 7 days, as well as 6- mercaptopurine for 7 days	Etoposide/Cyclophosphamide	300mg/m ² - 300mg/m ²	Week 1
	Methotrexate/6-mercaptopurine	40mg/m ² - 75mg/m ²	Week 2
	Methotrexate/Cytosine arabinoside	40mg/m ² - 300mg/m ²	Week 3
	Vincristine/Prednisone	1.5mg/m ² - 40mg/m ²	Week 4
	Etoposide/Cyclophosphamide	300mg/m ² - 300mg/m ²	Week 5
	Methotrexate (24 hour infusion) (Follow by leukovorin rescue at 48 hours) (Every 12 weeks triple IT** for 1 year)	2g/m ²	Week 6
	6-mercaptopurine	75mg/m ²	
	Etoposide/Cyclophosphamide	300mg/m ² - 300mg/m ²	Week 7
Vincristine/Prednisone	1.5mg/m ² - 40mg/m ²	Week 8	
	Repeat the 8 week cycle starting with week 1 until completion of 120 weeks		

29 **Protocol for Standard Risk** 88

Steroid window	Prednisone	60mg/m ²	-7, -6, -5, -4, -3, -2, -1
Induction	Vincristine	2mg/m ²	0, 7, 14, 21
	Prednisone	45mg/m ²	1-28
	Daunorubicin	30mg/m ²	0, 14
	L-asparaginase	10,000 IU/ m ²	5, 8, 12, 15, 19, 22
	Triple IT **		0 (only if CSF is CNS 1)
Consolidation	Methotrexate (24 hour infusion) (Follow by leukovorin rescue at 48 hours)	2g/m ²	36, 68, 94
	Vincristine	2mg/m ²	35, 51, 67, 83, 93
	Cyclophosphamide	1g/m ²	44, 76
	Cytosine arabinoside	80mg/m ²	45-48, 52-55, 77-80, 84-87, 102-106
	6-mercaptopurine	50mg/m ²	45-59, 77-90
	Doxorubicin	30mg/m ²	106
	Prednisone	60mg m ²	102-106
	Triple IT**		36, 68, 94
Maintenance	6-mercaptopurine	50mg/m ²	120-176, 208-222, 247-331
	Methotrexate	20mg/m ² /week	120-176
	Vincristine	2mg/m ²	177, 184, 191, 198, 214, 332, 339, 346, 355
	Daunorubicin	30mg/m ²	177, 191, 240
	Prednisone	60mg/m ²	177-198, 236-240
	L-asparaginase	10,000 IU/m ²	182, 185, 189, 192, 196, 199, 337, 340, 344, 347, 353, 356
	Cyclophosphamide	1g/m ²	208-211, 215-218
Cytosine arabinoside	120mg/m ²	236-240	
	Triple IT**		Monthly (until completion of 1 year)

51 ** Intrathecal chemotherapy dose/per age in ALL: 110

Drug	Age (years):< 1	1-2	2-3	3-8	> 8
Methotrexate (mg)	6	8	10	12	15
Hydrocortisone (mg)	6	8	10	12	15
Cytosine Arabinoside (mg)	12	16	20	24	30

55 CSF: Cerebral Spinal Fluid; CNS: Central Nervous System 114

56
57
58
59 115
116
117
118