

# Identificación de posibles biomarcadores predictivos o de pronóstico de respuesta a la quimioterapia metronómica, en pacientes pediátricos con tumores recaídos o refractarios

Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Tesista:

Juan Manuel Cáceres

Directora:

Dra. Viviana R. Rozados

Co-Directora:

Dra. O. Graciela Scharovsky



Instituto de Genética Experimental  
Facultad de Ciencias Médicas  
Universidad Nacional de Rosario

Año 2025

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN .....	VI
ABSTRACT .....	VIII
INTRODUCCIÓN .....	1
Cáncer .....	1
Estadísticas .....	4
Cáncer pediátrico.....	5
Quimioterapia convencional .....	9
Quimioterapia Metronómica.....	10
Fármacos.....	12
Biomarcadores Pronóstico/Predictivos .....	14
Células Endoteliales Circulantes .....	15
Células Endoteliales Progenitoras .....	15
Linfocitos T reguladores .....	16
Sistema- sPD-1 / sPD-L1.....	17
Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-2 .....	18
Receptor soluble del VEGF-2 .....	19
Trombospondina-1 .....	19
Factor de crecimiento fibroblástico básico .....	20
Antecedentes de ensayos clínicos publicados .....	22
Antecedentes en el Instituto de Genética Experimental .....	25
OBJETIVOS .....	27
OBJETIVO GENERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	28
MATERIALES Y METODOS.....	29
Instituciones participantes .....	29
Grupo de trabajo .....	29
Pacientes.....	29
Criterios de inclusión .....	29

Criterios de exclusión y/o suspensión de la QTM.....	29
Grupos de Pacientes .....	30
Muestras .....	30
Esquema de trabajo.....	30
Metodología para la determinación de biomarcadores .....	33
Citometría de Flujo .....	33
ELISA.....	34
Historias Clínicas .....	34
Análisis Estadísticos .....	35
RESULTADOS .....	36
RECAÍDOS/REFRACTARIOS.....	37
ESQUEMAS ADMINISTRADOS .....	38
EVOLUCIÓN CLÍNICA .....	39
ANÁLISIS DE BIOMARCADORES .....	40
DISCUSIÓN DE BIOMARCADORES EN PACIENTES RECAÍDOS/REFRACTARIOS .....	46
ALTO RIESGO.....	48
Pacientes del grupo Alto Riesgo .....	50
ANÁLISIS DE TOXICIDADES .....	52
ANÁLISIS DE BIOMARCADORES .....	71
ANÁLISIS DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS .....	73
ANÁLISIS DE BIOMARCADORES RELACIONADOS A LA ANGIOGÉNESIS .....	87
ANÁLISIS BIOMARCADORES SÉRICOS RELACIONADOS A LA ANGIOGÉNESIS.....	95
DISCUSIÓN.....	101
DISCUSIÓN DE BIOMARCADORES EN PACIENTES DE ALTO RIESGO .....	101
Consideraciones metodológicas y clínicas en la interpretación de biomarcadores .....	103
Condiciones y limitaciones en la toma de muestras .....	103
Intercurrencias clínicas y adherencia terapéutica durante la QTM .....	104
Discusión de biomarcadores inmunológicos.....	105
Linfocitos T Reguladores .....	105
sPD-1 .....	107
sPD-L1.....	108
Discusión de biomarcadores relacionados con la angiogénesis .....	111

Células Endoteliales Circulantes .....	112
Células Endoteliales Progenitoras.....	113
VEGF-2.....	115
sVEGFR-2 .....	116
TSP-1 & bFGF.....	117
Discusión conjunta de biomarcadores CEC, VEGF-2 y sVEGFR-2.....	117
Aplicabilidad clínica y propuesta metodológica de seguimiento .....	118
Propuesta metodológica de seguimiento biomarcador-dirigido en pacientes pediátricos tratados con QTM .....	119
Aplicabilidad clínica real de la propuesta: oportunidades y desafíos .....	120
Implementación proyectiva: desarrollo de una base de datos integrada.....	122
CONCLUSIONES FINALE .....	123
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	126
PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS .....	142
ANEXOS .....	143
Resolución de autorización de la Facultad de Ciencias Médicas - UNR .....	143
Resolución del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas - UNR.....	144
Resolución de aprobación por el Comité Revisor de Investigación del Hospital de Pediatría “J. P. Garrahan” .....	145
Resolución de aprobación por el servicio de Oncología del Hospital de Niños “V. J. Vilela” .....	146
Consentimiento informado .....	147

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de Varianza)
<b>APC</b>	<i>Allophycocyanin</i> (Alofococianina)
<b>BE</b>	Buena Evolución
<b>bFGF</b>	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico)
<b>BRCA1, BRCA2</b>	<i>BReast CAncer gene 1 and 2</i> (Gen del cáncer de mama)
<b>CFM</b>	Ciclofosfamida
<b>CEC</b>	Células Endoteliales Circulantes
<b>CEP</b>	Células Endoteliales Progenitoras
<b>CMF</b>	Citometría de Flujo
<b>CTCAE</b>	<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i> (Criterios Comunes de Terminología para Eventos Adversos, v4.0)
<b>DLM</b>	Dosis letal mínima
<b>DMT</b>	Dosis máxima tolerada
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido Etilendiaminotetraacético; anticoagulante usado en tubos de extracción)
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico)
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Suero Fetal Bovino)
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
<b>IC</b>	Intervalo de Confianza
<b>IGE</b>	Instituto de Genética Experimental
<b>INC</b>	Instituto Nacional del Cáncer
<b>LSN</b>	Límite Superior Normal
<b>ME</b>	Mala Evolución
<b>MEMMAT</b>	<i>Medulloblastoma European Multitarget Metronomic Anti-Angiogenic Trial</i> (Ensayo Europeo Multicéntrico de Terapia Metronómica Antiangiogénica Multiblanco para Medulloblastoma)
<b>NB</b>	Neuroblastoma
<b>OS</b>	Osteosarcoma
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Solución Salina Buffer Fosfato)
<b>PE</b>	Phycoerythrin (Ficoeritrina)
<b>PFS</b>	Progression-Free Survival (Supervivencia Libre de Progresión)
<b>QTM</b>	Quimioterapia Metronómica

<b>RA</b>	Recaída Alejada
<b>RAN</b>	Recuento Absoluto de Neutrófilos
<b>RMS</b>	Rabdomiosarcoma
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico)
<b>RT</b>	Recaída Temprana
<b>SaS</b>	Sarcoma Sinovial
<b>SaR</b>	Sarcoma Renal
<b>SEw</b>	Sarcoma de Ewing
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>sPD-1</b>	<i>Soluble Programmed Death-1</i> (Receptor de Muerte Programada 1 soluble)
<b>sPD-L1</b>	<i>Soluble Programmed Death-Ligand 1</i> (Ligando soluble de PD-1)
<b>sVEGFR-2</b>	Receptor soluble 2 del VEGF
<b>TGO</b>	Transaminasa Glutámico Oxalacética (AST, Aspartato Aminotransferasa)
<b>TGP</b>	Transaminasa Glutámico Pirúvica (ALT, Alanina Aminotransferasa)
<b>Tregs</b>	Linfocitos T Reguladores
<b>TRab</b>	Tumor Rabdoide
<b>TSP-1</b>	Trombospondina-1
<b>VBL</b>	Vinblastina
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular)
<b>VNR</b>	Vinorelbine
<b>VP</b>	Etopósido

## RESUMEN

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células anómalas, capaces de invadir y diseminarse. En pediatría, los tumores sólidos recaídos o refractarios representan un desafío terapéutico significativo, dado que los pacientes suelen agotar esquemas convencionales sin remisión completa. En este contexto, la quimioterapia metronómica (QTM), que emplea fármacos en dosis bajas y de forma continua, busca controlar el crecimiento tumoral modulando la angiogénesis y el microambiente inmunológico, con mínima toxicidad.

Este estudio observacional, longitudinal y prospectivo incluyó 45 pacientes pediátricos de entre 2 y 18 años, agrupados en dos cohortes: Alto Riesgo (n=26) y Recaídos/Refractarios (n=19). Se evaluaron biomarcadores angiogénicos e inmunológicos —células endoteliales circulantes (CEC), células progenitoras endoteliales (CEP), factor de crecimiento vascular endotelial -2 (VEGF-2), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial-2 soluble (sVEGFR-2), trombospondina -1 (TSP-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), Receptor de Muerte Programada 1 soluble (sPD-1), Ligando del Receptor de Muerte Programada 1 soluble (sPD-L1) y linfocitos T reguladores (Tregs)— mediante técnicas estandarizadas (ELISA y citometría de flujo), con determinaciones seriadas durante la QTM. Además, se registraron eventos de toxicidad hematológica, renal y hepática, según criterios CTCAE v4.0.

En el grupo Recaídos/Refractarios, los biomarcadores mostraron variaciones heterogéneas sin alcanzar significancia estadística. La interpretación estuvo limitada por el estado clínico avanzado y la dificultad para completar la recolección sistemática de muestras. Estos factores impidieron confirmar asociaciones sólidas entre los cambios en los biomarcadores durante el tratamiento y la evolución clínica.

En el grupo Alto Riesgo, se observaron diferencias en los biomarcadores inmunológicos según la evolución clínica. El eje inmunológico evaluado mediante Tregs, sPD-1 y sPD-L1 permitió caracterizar perfiles funcionales contrastantes entre los grupos de buena evolución (BE), recaída alejada (RA) y mala evolución (ME), revelando que la estabilidad clínica al final de la QTM puede enmascarar dinámicas inmunitarias divergentes. Al concluir el tratamiento, se identificaron tres perfiles inmunológicos:

- BE: Tregs↑ / sPD-L1↓ / sPD-1↔ → restauración inmunológica regulada.
- RA: Tregs↔ / sPD-L1↓ / sPD-1↑ → activación persistente no regulada.
- ME: Tregs↔ / sPD-L1↔ / sPD-1↔ → perfil inmunológico inefectivo.

Aunque la interpretación requiere cautela, estos marcadores podrían reflejar ajustes en los mecanismos de evasión tumoral o en la vigilancia inmunológica.

En cuanto a los biomarcadores de angiogénesis, el análisis conjunto de CEC, VEGF-2 y sVEGFR-2 mostró que CEC es un marcador dinámico de respuesta, mientras que VEGF-2 podría

actuar como predictor de mal pronóstico cuando se mantiene elevado. Su análisis conjunto refuerza el valor de evaluar perfiles angiogénicos integrados y no indicadores aislados.

En paralelo, el perfil de toxicidad de la QTM fue globalmente favorable y permitió mantener la continuidad del tratamiento sin mayores complicaciones en la mayoría de los pacientes, lo que subraya su factibilidad clínica en oncología pediátrica.

En conjunto, este trabajo refuerza la necesidad de integrar parámetros inmunológicos y angiogénicos para construir firmas biológicas más robustas en oncología pediátrica. Pese a las limitaciones del tamaño muestral y la heterogeneidad diagnóstica, los resultados aportan evidencia preliminar sobre el valor pronóstico y de monitoreo de estos biomarcadores. El modelo de seguimiento biomarcador-dirigido es un aporte metodológico concreto y factible, con potencial para guiar estudios multicéntricos y abrir camino hacia una medicina pediátrica más personalizada.

## ABSTRACT

Cancer is characterized by the uncontrolled growth of abnormal cells, capable of invading tissues and spreading distantly. In pediatrics, relapsed or refractory solid tumors represent a significant therapeutic challenge, since patients often exhaust conventional regimens without achieving complete remission. In this context, metronomic chemotherapy (QMT), which administers drugs in low and continuous doses, aims to control tumor growth by modulating angiogenesis and the immune microenvironment, while having a low toxicity profile.

This observational, longitudinal, and prospective study included 45 pediatric patients aged 2 to 18 years, grouped into two cohorts: High Risk (n=26) and Relapsed/Refractory (n=19). Angiogenic and immunological biomarkers were evaluated —circulating endothelial cells (CEC), endothelial progenitor cells (CEP), VEGF-2, sVEGFR-2, TSP-1, bFGF, sPD-1, sPD-L1, and regulatory T cells (Tregs)— using standardized techniques (ELISA and flow cytometry), with serial determinations performed during QMT. In addition, hematological, renal, and hepatic toxicities were recorded and classified according to international CTCAE v4.0 criteria.

In the Relapsed/Refractory cohort, biomarkers showed heterogeneous variations without reaching statistical significance. Interpretation was limited by advanced clinical status and difficulties in completing systematic sample collection. These factors prevented confirmation of solid associations between biomarker changes during treatment and clinical evolution.

In the High-Risk cohort, differences were observed in immunological biomarkers according to clinical outcome. The immunological axis assessed through Tregs, sPD-1, and sPD-L1 allowed the characterization of contrasting functional profiles between patients with good evolution (BE), late relapse (RA), and poor evolution (ME), revealing that apparent clinical stability at the end of QMT may conceal divergent immune dynamics. At the end of treatment, three distinct immunological profiles were identified:

- BE: Tregs $\uparrow$  / sPD-L1 $\downarrow$  / sPD-1 $\leftrightarrow$   $\rightarrow$  regulated immune restoration.
- RA: Tregs $\leftrightarrow$  / sPD-L1 $\downarrow$  / sPD-1 $\uparrow$   $\rightarrow$  persistent unregulated activation.
- ME: Tregs $\leftrightarrow$  / sPD-L1 $\leftrightarrow$  / sPD-1 $\leftrightarrow$   $\rightarrow$  ineffective immunological profile.

Although interpretation requires caution, these markers may reflect adjustments in tumor evasion mechanisms or in immune surveillance activity.

Regarding angiogenesis-related biomarkers, the combined analysis of CEC, VEGF-2, and sVEGFR-2 showed that CEC emerged as a dynamic response marker, whereas VEGF-2 could act as a poor prognosis predictor when persistently elevated. Their joint assessment reinforces the value of evaluating integrated angiogenic profiles rather than isolated indicators.

In parallel, the toxicity profile of QMT was overall favorable and allowed treatment continuity without important complications in most patients, underscoring its clinical feasibility in complex pediatric oncology settings.

Taken together, this study highlights the need to integrate angiogenic and immunological parameters to build more robust biological signatures in pediatric oncology. Despite the limitations of sample size and diagnostic heterogeneity, the results provide preliminary evidence on the prognostic and monitoring value of these biomarkers. The proposed biomarker-directed monitoring model represents a concrete and feasible methodological contribution, with potential to guide multicenter studies and pave the way toward a more personalized pediatric oncology practice.

# INTRODUCCIÓN

## Cáncer

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células anómalas en el cuerpo, que pueden invadir tejidos circundantes y propagarse a otras partes del organismo. Esta patología ha sido objeto de estudio y atención médica a lo largo de la historia de la humanidad. El cáncer se menciona por primera vez en registros médicos antiguos, como el papiro de Edwin Smith, que data del antiguo Egipto, donde se describen tumores mamarios. Sin embargo, fue el médico griego Hipócrates quien acuñó el término "cáncer" (del griego "karkinos"), en el siglo V a.c., refiriéndose a la apariencia de los tumores malignos como cangrejos (American Cancer Society, 2021).

Los elementos predisponentes para el desarrollo del cáncer son multifactoriales. La predisposición genética al cáncer es el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales. Aproximadamente 5%-10% de los diagnósticos de cáncer tienen un origen genético hereditario, debido a mutaciones en genes específicos, conocidos como genes de predisposición al cáncer (Hospital Vall d'Hebron, 2022). Entre los genes asociados a un mayor riesgo de cáncer se encuentran los genes de cáncer de mama 1 y 2 "BRCA1", "BRCA2", y el gen asociado de BRCA2, "PALB2" para el cáncer de mama, y genes de reparación del ADN como los asociados al síndrome de Lynch (NIH, 2020; Hospital Vall d'Hebron, 2022). Estas mutaciones genéticas pueden dar lugar a síndromes de cáncer hereditarios, como el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario (HBOC) y el síndrome de Lynch, que aumentan significativamente el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer (Cancer.gov 2022; NIH, 2020). La identificación de estas alteraciones genéticas es fundamental para la prevención y el tratamiento específico del cáncer. Sin embargo, entre el 90% y 95% de los casos de cáncer se deben a alteraciones genéticas y epigenéticas adquiridas a lo largo de la vida del individuo, no heredadas, las cuales surgen como consecuencia de la acumulación de daños en el ADN. Un ejemplo particular en pediatría es el retinoblastoma, que puede presentarse en forma hereditaria debido a mutaciones germinales en el gen *RB1*. Este caso paradigmático no solo constituye el tumor intraocular maligno más frecuente en la infancia, sino que también ha sido clave para la comprensión de los mecanismos de oncogénesis, al dar origen a la teoría de los "dos golpes" de Knudson (Byroju et al, 2023).

Por otro lado, los factores ambientales desempeñan un papel crucial en la carcinogénesis. La exposición a carcinógenos, como el tabaco, las sustancias químicas industriales, la radiación ultravioleta y ciertos virus, ha sido ampliamente documentada como una de las principales causas de cáncer adquirido. Por ejemplo, la inhalación prolongada de productos del tabaco introduce sustancias químicas dañinas que provocan mutaciones en los genes que regulan el crecimiento celular, lo que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Asimismo, la exposición crónica a la radiación ultravioleta, como en el caso de las

personas con alta exposición al sol sin protección adecuada, puede inducir mutaciones en los genes encargados de la reparación del ADN, facilitando la aparición de cáncer de piel, incluyendo melanoma. Además, otros agentes como el alcohol, ciertos contaminantes ambientales y las dietas ricas en grasas o con escaso aporte de fibra también han sido relacionados con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Estos factores ambientales, junto con las alteraciones genéticas adquiridas, contribuyen significativamente a la aparición de tumores malignos a lo largo de la vida de una persona (Cancer.gov 2022; NIH, 2020).

La interacción entre factores genéticos y ambientales es un campo de investigación en constante evolución. Estudios epidemiológicos han demostrado que la predisposición genética puede aumentar la susceptibilidad a los carcinógenos ambientales, lo que subraya la importancia de una comprensión completa de estos factores en la prevención y el tratamiento del cáncer (American Cancer Society, 2021).

Los "*Hallmarks del Cáncer*" son una serie de características distintivas que definen el comportamiento y las propiedades de las células cancerosas. Esta conceptualización fue propuesta por Douglas Hanahan y Robert Weinberg en un influyente artículo publicado en 2000, el cual ha sido fundamental en la comprensión y el abordaje del cáncer desde entonces. En términos generales, los "*Hallmarks del Cáncer*" describen los rasgos que las células cancerosas adquieren para crecer de manera descontrolada y escapar de los mecanismos de regulación normales del cuerpo (Hanahan & Weinberg, 2000).

Históricamente, la investigación sobre el cáncer se ha centrado en identificar las causas y los tratamientos para esta enfermedad. Hanahan y Weinberg dieron un paso importante al proporcionar un marco conceptual que ayudó a consolidar la comprensión del cáncer como una enfermedad biológica compleja con características comunes, independientemente de su origen específico en diferentes tejidos, señalando una serie de características de las células cancerosas (Hanahan & Weinberg, 2011):

- 1) Proliferación descontrolada: capacidad de dividirse sin control, lo que conduce a la formación de tumores.
- 2) Resistencia a la muerte celular programada: evasión de la muerte celular programada o apoptosis, lo que permite la supervivencia y proliferación de células anormales.
- 3) Alteraciones genéticas: incorporación de numerosos cambios en los cromosomas y mutaciones genéticas, lo que afecta su comportamiento y proliferación.
- 4) Capacidad de invasión y metástasis: adquisición de la capacidad de invadir tejidos circundantes y diseminarse a otras partes del cuerpo, lo que contribuye a la progresión del cáncer.
- 5) Angiogénesis: inducción de nuevos vasos sanguíneos para suministrar nutrientes y oxígeno a los tumores.
- 6) Evasión de la respuesta inmunitaria: inducción de mecanismos que evitan la respuesta inmunitaria del organismo, lo que les permite proliferar y diseminarse.
- 7) Alteración metabólica: presencia de un metabolismo alterado, que les permite la

adaptación a las condiciones del microambiente tumoral.

- 8) Inflamación crónica: que puede contribuir al desarrollo del cáncer.
- 9) Estrés celular: que puede colaborar en el desarrollo del cáncer.
- 10) Inestabilidad genómica: que contribuye a la capacidad de evolucionar y adaptarse a su entorno.

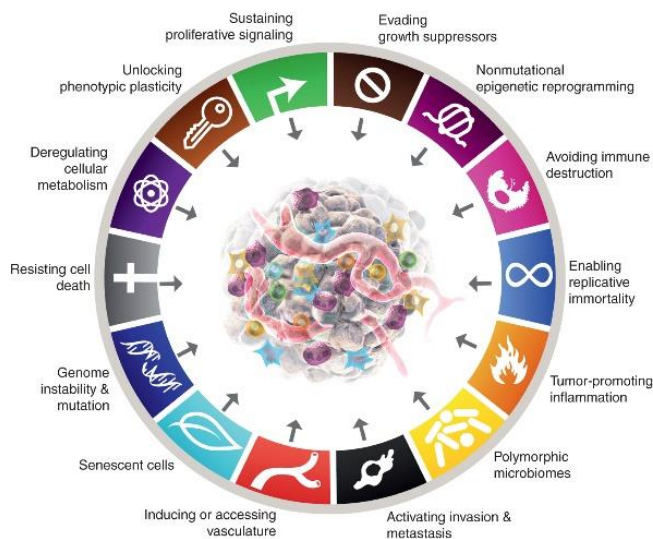
En 2022, Hanahan en su artículo, actualiza los *hallmarks* del cáncer y propone nuevas características emergentes y dos características adicionales habilitadoras. Las nuevas características emergentes son el “Desbloqueo de la plasticidad fenotípica”, refiriéndose a la capacidad de las células cancerosas para adaptarse y cambiar su fenotipo, lo que podría conducir a la resistencia al tratamiento y la progresión de la enfermedad; y “Células senescentes”, describe el papel de las células senescentes, originarias de diversas fuentes, en la modulación de las características del cáncer y fenotipos tumorales. Las características habilitadoras son la “Reprogramación Epigenética No Mutacional”, la cual implica alteraciones en los patrones de expresión génica sin cambios en la secuencia del ADN, impactando el desarrollo y progresión del cáncer; y, “Microbiomas polimórficos”, se destacan las diversas comunidades microbianas dentro del microambiente tumoral que pueden influir en las características del cáncer y el comportamiento tumoral (Hanahan, 2022) (Figura 1).

#### Los 10 *hallmarks* postulados son:

1. Señaliza la proliferación sostenida
2. Evade los supresores de crecimiento
3. Evade la destrucción inmunitaria
4. Permite la inmortalidad replicativa
5. Activa la invasión y las metástasis
6. Induce angiogénesis
7. Impide la muerte celular
8. Desregula el metabolismo celular
9. Desbloquea la plasticidad fenotípica
10. Células senescentes

#### Los 4 procesos habilitadores son:

1. Inestabilidad y mutación genómica
2. Inflamación promotora tumoral
3. Reprogramación epigenética no mutacional
4. Microbiomas polimórficos



**Figura 1. Hallmarks del cáncer y procesos habilitadores.**

Representación esquemática de las diez capacidades distintivas de las células tumorales (*hallmarks*) y los cuatro procesos biológicos que las facilitan. Adaptado de Hanahan, 2022.

La utilidad del estudio y conocimiento detallado de las características del cáncer radica en que proporcionan un marco de referencia para desarrollar terapias dirigidas para mejorar los resultados terapéuticos. Cada *hallmark* representa una posible vía terapéutica:

- Dirigidas a la señalización proliferativa: Fármacos como los inhibidores de EGFR (por

ejemplo, Erlotinib) se dirigen a las vías de señalización proliferativa en las células cancerosas. (Lynch, 2004)

- Evasión de los supresores del crecimiento: Los inhibidores de CDK4/6 (por ejemplo, Palbociclib) se utilizan para evitar que las células cancerosas evadan los supresores del crecimiento. (Finn, 2015)

- Resistencia a la muerte celular: Los miméticos BH3 (por ejemplo, Venetoclax) se dirigen a las vías implicadas en la resistencia a la muerte celular en células cancerosas. (Roberts, 2016)

- Inducción de angiogénesis: Las terapias anti-VEGF (por ejemplo, Bevacizumab) inhiben la inducción de angiogénesis en tumores. (Gianantonio, 2007)

- Activación de la invasión y metástasis: Los fármacos dirigidos a la vía PI3K/Akt/mTOR (por ejemplo, Everolimus) pueden inhibir la invasión y metástasis en las células cancerosas. (Motzer, 2008)

## Estadísticas

En la última década, el cáncer ha sido una carga significativa en todo el mundo. El cáncer, además de su importancia a nivel de la salud de los individuos, tiene significativos efectos tanto en la salud pública como en la economía, a nivel mundial, y estos efectos varían según el nivel de ingresos de los países. Según el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, el cáncer tiene un impacto significativo en la salud pública, con años perdidos por muertes prematuras, carga económica por productividad ausente, costos por la enfermedad y el tratamiento, y efectos a largo plazo en la calidad de vida de los pacientes. En América Latina y el Caribe, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad, lo que representa una carga significativa para los sistemas de salud y la economía de la región. Además, el cáncer puede generar gastos significativos por cuenta propia, debido a las diferencias en la intensidad y duración del tratamiento, así como el tiempo de supervivencia, lo que puede impactar la economía de los pacientes y sus familias (NCBI, 2007).

Aproximadamente, 5 millones de personas en países de bajos y medianos ingresos mueren de cáncer cada año, lo que representa alrededor del 10% de las muertes en esos países. Los datos vitales y de salud en los países de bajos ingresos son limitados, y solo alrededor del 18% de los mismos han registrado datos de mortalidad en algún momento desde 1950. Además, solo alrededor del 35% de los países de bajos ingresos han publicado datos de incidencia basados en la población, aunque menos de la mitad de ellos están representados en la edición más reciente de la Incidencia de Cáncer en Cinco Continentes de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, Ferlay, 2024).

Los países de altos ingresos tienen una mayor proporción de mortalidad por cáncer en comparación con los países de bajos ingresos. Sin embargo, el cáncer sigue siendo una carga significativa en los países de bajos ingresos, y las enfermedades infecciosas siguen siendo las principales causas de muerte, especialmente en los países de bajos ingresos y algunos países de medianos ingresos (Fitzmaurice, 2017).

En cuanto a las estadísticas globales de cáncer, el GLOBOCAN 2020 estima que la tasa

de incidencia de cáncer está aumentando rápidamente en países de transición (estados que están dejando atrás un período de conflicto o estancamiento y están trabajando hacia un nuevo modelo de desarrollo) en Sudamérica, África y Asia, así como en países asiáticos de altos ingresos. Además, se creó un Índice sociodemográfico para cada ubicación basado en el ingreso per cápita, el nivel educativo y la fertilidad, y los países se categorizaron según los niveles de ingresos (Sung, 2022 – GLOBOCAN).

En cuanto a la diferencia estadística entre países de altos y bajos recursos, se ha observado una variación en la disponibilidad de tratamiento entre países de diferentes niveles de ingresos. La disponibilidad de tratamiento integral se informa en más del 90% de los países de altos ingresos, pero en menos del 15% de los países de bajos ingresos. Además, la atención paliativa es un componente importante del tratamiento del cáncer, y la OMS ha establecido una iniciativa global para mejorar la atención paliativa en todo el mundo (Ferlay, 2024).

Estos datos, que señalan una profunda desigualdad, entre distintos países, en el acceso a los tratamientos y a la curación del cáncer, indican la necesidad de investigar, diseñar y trasladar a la clínica, modalidades terapéuticas que tiendan a ir cerrando esa gran brecha que separa países ricos y países pobres, en cuanto al tratamiento del cáncer en general.

## Cáncer pediátrico

El cáncer pediátrico es una de las principales causas de mortalidad entre niños y adolescentes en todo el mundo (PAHO, OMS, 2021). Se diagnostican aproximadamente 280.000 casos de cáncer infantil cada año. La mayoría de los casos de cáncer infantil se producen en países de ingresos medianos y bajos, donde las defunciones evitables debidas a los cánceres infantiles se producen a consecuencia de la falta de diagnóstico, a los diagnósticos incorrectos o tardíos, a las dificultades para acceder a la atención sanitaria, al abandono del tratamiento, a la muerte por toxicidad y a las mayores tasas de recidivas (OMS, 2021). Sin embargo, la curación del cáncer infantil es posible en más del 80% de los casos, cuando el niño puede recibir atención oncológica. En Argentina, por año, se diagnostican en promedio 1.320 casos nuevos de cáncer pediátrico, y la sobrevivencia del cáncer infantil ha aumentado notablemente en los últimos años (INC, 2019). Más del 80% de los casos registrados se tratan en hospitales públicos y, 44% de los niños en algún momento de su tratamiento, deben trasladarse a centros de mayor complejidad. El Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino desarrollado por el Instituto Nacional del Cáncer, es útil para la definición de estrategias e intervenciones relativas al manejo de los niños con cáncer a nivel institucional, provincial y nacional (ROHA, 2019).

Los tipos de cáncer más frecuentes en pediatría son: leucemia linfoblástica aguda (LLA) con un 40% de los casos, tumores del sistema nervioso central (SNC) representando un 20%, linfomas (incluyendo el linfoma de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin) con un 15%, neuroblastoma con un 7%, tumores renales, entre los cuales el tumor de Wilms es el más común, con un 6%, sarcomas de tejidos blandos, principalmente rhabdomyosarcoma, con un 5%, tumores óseos, donde destacan el osteosarcoma y el sarcoma de Ewing, representando

un 4%, retinoblastoma con un 3%, hepatoblastoma con un 2%, y tumores de células germinales con un 1%.

En el presente trabajo los tipos de tumores estudiados fueron el Sarcoma de Ewing, Rbdomiosarcoma, Osteosarcoma, Sarcoma Sinovial, Sarcoma Renal, Tumor Rabdoide y Neuroblastoma.

- **Sarcoma de Ewing (SEw):** es un cáncer óseo altamente agresivo que afecta principalmente a niños y adolescentes. Se origina en las células mesenquimales y se caracteriza por una translocación cromosómica característica, generalmente  $t(11;22)(q24;q12)$ , que da como resultado la fusión del gen EWSR1 con el gen FLI1. Fue descrito por primera vez en 1921 por el patólogo James Ewing, quien identificó una serie de tumores óseos altamente malignos en adolescentes que compartían características histológicas similares. Puede manifestarse con dolor óseo persistente y tumefacción en las extremidades. Las localizaciones más frecuentes incluyen el fémur (aproximadamente el 40% de los casos), la pelvis (alrededor del 20%), los huesos planos como la escápula y las costillas, así como otros huesos largos como la tibia y el húmero. El diagnóstico del Sarcoma de Ewing se confirma mediante biopsia de la lesión sospechosa, seguida de análisis histopatológico y pruebas moleculares para detectar la translocación característica. Las técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación *in situ* son utilizadas para identificar la fusión del gen EWSR1 con el gen FLI1 (Balamuth, 2010). En Argentina, para su tratamiento, se utiliza el esquema GALOP, el cual es un régimen de quimioterapia que consiste en la combinación de cuatro agentes quimioterapéuticos: doxorrubicina (adriamicina), ciclofosfamida, vincristina e ifosfamida. Este régimen se administra en ciclos y puede ir seguido de terapia local (cirugía y/o radioterapia) dependiendo de la extensión y la respuesta al tratamiento. El esquema GALOP ha demostrado eficacia en la reducción del tamaño del tumor y en la mejora de las tasas de supervivencia en pacientes con Sarcoma de Ewing (Balamuth & Womer, 2010; GALOP, 2011)

- **Rbdomiosarcoma (RMS):** es un tumor maligno derivado de las células musculares embrionarias. Es el sarcoma de tejidos blandos más común en la infancia y la adolescencia. Se clasifica en varios subtipos histológicos, cada uno con características distintas de crecimiento y respuesta al tratamiento. El subtipo *embrional* representa la mayoría de los casos pediátricos; está caracterizado por células que muestran propiedades de células musculares inmaduras y están asociadas con una mejor respuesta al tratamiento, mientras que el subtipo *alveolar* presenta células en disposición alveolar y se asocia con un pronóstico menos favorable y una mayor propensión al desarrollo de metástasis. Las manifestaciones clínicas varían según la ubicación y el tipo histológico del tumor. Puede presentarse como una masa indolora o dolorosa, con limitación de movimiento y síntomas sistémicos como fiebre y pérdida de peso. Las localizaciones más comunes incluyen la cabeza y el cuello, las extremidades, las vías genitourinarias y el área perirrectal. El diagnóstico del Rbdomiosarcoma se realiza mediante biopsia de la lesión, seguida de análisis histopatológico y, en algunos casos, estudios moleculares para identificar marcadores específicos como la expresión de miogenina y desmina (Hawkins, 2015). El tratamiento del Rbdomiosarcoma, en Argentina, se basa en el esquema GATLO, que incluye combinaciones de agentes

quimioterapéuticos como vincristina, doxorrubicina, ciclofosfamida e ifosfamida, administrados en ciclos específicos seguidos de cirugía y/o radioterapia, dependiendo del estadio y la respuesta al tratamiento (Hawkins, 2015; GATLO, 2006).

- **Osteosarcoma (OS):** Es el cáncer óseo primario más común en niños y adolescentes, caracterizado por la proliferación anormal de células óseas inmaduras. Afecta principalmente a los huesos largos como el fémur, la tibia y el húmero, aunque también puede desarrollarse en otras áreas óseas. El osteosarcoma generalmente se manifiesta con dolor óseo persistente y tumefacción en el área afectada. Las localizaciones más comunes son las extremidades, especialmente cerca de las rodillas y los hombros. Se destacan tres subtipos histológicos más frecuentes: *OS Convencional*, caracterizado por la producción de matriz ósea osteoide por parte de las células tumorales; *OS Telangiectásico* presenta grandes cavidades vasculares dentro del tumor y *OS de Bajo Grado*, se caracteriza por un crecimiento lento y menos agresivo. El diagnóstico del osteosarcoma se realiza mediante biopsia de la lesión, seguida de análisis histopatológico. Los marcadores moleculares relacionados con la expresión de proteínas asociadas con la osteogénesis, como la osteocalcina y la fosfatasa alcalina, pueden ayudar en el diagnóstico y la clasificación (Mirabello, 2009). El tratamiento del osteosarcoma, al igual que para RMS, se basa en el esquema GATLO, que incluye la administración de agentes quimioterapéuticos como metotrexato, cisplatino, doxorrubicina e ifosfamida, seguido de cirugía para extirpar el tumor y, en algunos casos, radioterapia (Mirabello, 2009; GATLO, 2006).

- **Sarcoma Sinovial (SaS):** es un tumor maligno raro que afecta principalmente a las articulaciones y los tejidos blandos circundantes. Se origina en las células sinoviales de las articulaciones y puede presentarse en cualquier parte del cuerpo, aunque es más común en las extremidades, especialmente cerca de las rodillas y las caderas. Se caracteriza por su tendencia a afectar a adultos jóvenes y adolescentes. Clínicamente, puede manifestarse como una masa palpable y dolorosa, a menudo con síntomas de inflamación articular. El diagnóstico se realiza mediante biopsia de la lesión, seguida de análisis histopatológico y, en algunos casos, estudios moleculares para detectar la translocación característica  $t(X;18)(p11.2;q11.2)$ . El tratamiento del Sarcoma Sinovial implica cirugía para extirpar el tumor, seguida de quimioterapia y, en algunos casos, radioterapia para reducir el riesgo de recurrencia (GATLO, 2006). La terapia multimodal ha demostrado mejorar las tasas de supervivencia y controlar la progresión de la enfermedad; esta terapia incluye inhibidores de la tirosina quinasa, inhibidores de la MEK e inhibidores de la HDAC (Nielsen, 2015).

-**Sarcoma renal (SaR):** El sarcoma renal es un tumor pediátrico poco frecuente, distinto del tumor de Wilms y de otras neoplasias renales, que se caracteriza por su origen mesenquimático y su curso clínico agresivo. Representa aproximadamente el 2–3% de las neoplasias renales en niños y suele diagnosticarse en edades tempranas, con una ligera predominancia en varones. Clínicamente se presenta como una masa abdominal de rápido crecimiento, acompañada de dolor, hematuria o hipertensión arterial secundaria. A diferencia del Wilms, el sarcoma renal muestra una tendencia marcada a la recaída local y a la

diseminación hematológica, principalmente pulmonar, con peor pronóstico global. Los avances terapéuticos han sido limitados, dado que la quimioterapia convencional y la cirugía logran solo un control transitorio en muchos casos, con tasas de supervivencia significativamente más bajas que en otros tumores renales infantiles (Salzillo et al., 2025).

- **Tumor Rabdoide (TRab):** El Tumor Rabdoide es un cáncer raro y altamente agresivo que afecta principalmente a niños menores de 2 años. Se origina en los tejidos blandos, especialmente en los riñones (tumor rabdoide renal) y el sistema nervioso central (tumor rabdoide extrarrenal). Clínicamente, puede manifestarse con dolor abdominal, masa abdominal palpable, síntomas neurológicos y, en casos de tumor cerebral, convulsiones y alteraciones del comportamiento. Histológicamente, se caracteriza por la presencia de células grandes y poligonales con núcleos hipercromáticos y citoplasma eosinofílico. El diagnóstico se confirma mediante biopsia de la lesión, seguida de análisis histopatológico y, en algunos casos, estudios moleculares para detectar la pérdida del gen supresor de tumores SMARCB1 (también conocido como INI1). El tratamiento del Tumor Rabdoide generalmente implica una combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia, aunque el pronóstico suele ser desfavorable debido a su agresividad y a menudo se asocia con una alta tasa de recurrencia (Nemes, 2015).

- **Neuroblastoma (NB):** es un cáncer infantil que se origina en las células nerviosas inmaduras llamadas neuroblastos, que se encuentran en el tejido nervioso simpático, generalmente en la glándula suprarrenal, el abdomen, el tórax, el cuello o la médula espinal. Es el tumor sólido extracraneal más común en niños y representa alrededor del 8-10% de todos los cánceres pediátricos. Se presenta con una amplia variedad de manifestaciones clínicas que pueden incluir masa abdominal palpable, dolor óseo, pérdida de peso, síntomas sistémicos como fiebre y fatiga, así como signos de síndrome de Horner o síndrome de opsoclono-mioclonus en casos más avanzados. El Neuroblastoma se clasifica en diferentes grupos de riesgo según criterios como la edad del paciente, la extensión del tumor, el grado histológico y la presencia de determinadas anomalías genéticas. Los tipos histológicos incluyen *Neuroblastoma indiferenciado*, *ganglioneuroblastoma* y *ganglioneuroma*, cada uno con características distintas de agresividad y comportamiento clínico. El diagnóstico se realiza mediante biopsia de la lesión, seguida de análisis histopatológico y estudios moleculares y genéticos para evaluar la amplificación del gen MYCN, la pérdida del brazo corto del cromosoma 1 (1p), la ganancia del brazo largo del cromosoma 17 (17q), entre otros (Mattay, 2016). El tratamiento del Neuroblastoma se basa en una estratificación de riesgo y puede incluir cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y trasplante de células madre, según el estadio y la agresividad del tumor. Se utiliza el esquema de tratamiento MEMMAT, un protocolo terapéutico utilizado en el manejo del Neuroblastoma de alto riesgo. Este esquema combina múltiples modalidades de tratamiento, incluyendo cirugía, quimioterapia, radioterapia y trasplante de células madre, con el objetivo de maximizar la erradicación del tumor y mejorar las tasas de supervivencia. La quimioterapia dentro del esquema MEMMAT suele incluir agentes como cisplatino, etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida y vincristina, administrados

en ciclos específicos. La radioterapia se administra generalmente después de la quimioterapia para eliminar cualquier célula tumoral residual. Además, el trasplante de células madre puede ser parte del tratamiento para restaurar la médula ósea después de la terapia intensiva. Este enfoque multimodal ha demostrado mejorar significativamente las tasas de supervivencia en pacientes con Neuroblastoma de alto riesgo (Matthay 2016; Slavc, 2022).

## Quimioterapia convencional

La quimioterapia convencional del cáncer es un enfoque terapéutico que ha sido fundamental en la lucha contra esta enfermedad a lo largo de la historia. Desde sus primeros intentos rudimentarios hasta los avances más recientes, la quimioterapia ha evolucionado significativamente en su comprensión y aplicación.

La historia de la quimioterapia estándar del cáncer se remonta a principios del siglo XX, cuando el investigador alemán Paul Ehrlich acuñó el término "quimioterapia" y propuso la idea de que los compuestos químicos podrían usarse para tratar enfermedades. Sin embargo, fue en la década de 1940 cuando se produjo un avance significativo con la introducción de la mostaza nitrogenada como agente quimioterapéutico, marcando el inicio de la era moderna de la quimioterapia del cáncer (DeVita & Chu, 2008).

La quimioterapia convencional se define como un tratamiento médico que utiliza fármacos quimioterapéuticos para combatir las células cancerosas. Uno de los desafíos principales en su aplicación ha sido determinar la dosis óptima que maximice la eficacia sin causar efectos secundarios intolerables. Este concepto se relaciona con la dosis máxima tolerada (DMT) o dosis letal mínima (DLM). La DMT se refiere a la dosis máxima de un fármaco que puede administrarse al paciente sin causar toxicidad inaceptable, mientras que la DLM es la cantidad mínima del mismo fármaco que es letal para el paciente. Determinar estas dosis es fundamental para lograr un equilibrio entre la efectividad terapéutica y la toxicidad (Dameshek, 1954; Frei et al., 1965; Chabner & Roberts, 2005).

Los fármacos quimioterapéuticos actúan a través de diversos mecanismos para interferir con la proliferación de células cancerosas. Algunos de los mecanismos de acción más frecuentes incluyen la inhibición de la síntesis de ADN, la interrupción de la división celular y la destrucción de la maquinaria celular. Por ejemplo, los agentes alquilantes como el cisplatino generan enlaces cruzados en el ADN, lo que interfiere con la replicación celular y desencadena la muerte celular (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014).

La estrategia terapéutica actual de la quimioterapia convencional busca una mayor especificidad y eficacia al combinar diferentes agentes quimioterapéuticos y terapias dirigidas. Se enfoca en la personalización de los tratamientos, teniendo en cuenta las características moleculares y genéticas de cada paciente para optimizar la terapia y minimizar los efectos secundarios (Letai, 2015). La inmunoterapia, que modula el sistema inmunitario para atacar selectivamente las células cancerosas, ha emergido como una prometedora adición a las estrategias terapéuticas convencionales (Sharma & Allison, 2015). Además, se utilizan combinaciones de fármacos con diferentes mecanismos de acción para aumentar la efectividad y reducir la resistencia tumoral. Esta estrategia se basa en un enfoque

multidisciplinario que incluye la cirugía, la radioterapia y la inmunoterapia, lo que mejora las tasas de éxito en la lucha contra el cáncer (Tannock et al., 2016).

## Quimioterapia Metronómica

La quimioterapia metronómica (QTM) es un innovador enfoque terapéutico en la lucha contra el cáncer que se caracteriza por la administración crónica, y a dosis bajas, de agentes quimioterapéuticos. Su principal objetivo es frenar el crecimiento de los tumores mediante la inhibición de la angiogénesis, proceso crucial para el suministro de nutrientes a las células cancerosas. Este enfoque contrasta con las terapias tradicionales que emplean dosis altas intermitentes para eliminar células tumorales.

Su historia se remonta a la investigación pionera del Dr. Judah Folkman, quien en la década de 1970 postuló la hipótesis de que el suministro constante y a baja dosis de ciertos agentes quimioterapéuticos podría inhibir el crecimiento de los vasos sanguíneos que alimentan los tumores, un proceso conocido como angiogénesis (Folkman, 1971).

La idea de la quimioterapia metronómica ganó impulso gracias al trabajo de Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg, quienes, en el año 2000, propusieron los *hallmarks* o características distintivas del cáncer, destacando la importancia de la angiogénesis en el desarrollo tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000). Esta conceptualización sentó las bases para el desarrollo de terapias dirigidas a la angiogénesis, incluida la quimioterapia metronómica.

Diversas investigaciones han contribuido significativamente a la comprensión de la biología tumoral y los procesos que sustentan el crecimiento de los tumores, en particular el rol central de la angiogénesis como requisito para la progresión maligna (Folkman, 1971; Ferrara & Kerbel, 2005; Fidler, 2000). Estos hallazgos sentaron las bases para el desarrollo de estrategias terapéuticas como la quimioterapia metronómica, que busca interferir de forma sostenida con el soporte vascular del tumor, modulando el microambiente tumoral y reduciendo la posibilidad de escape angiogénico (Kerbel & Kamen, 2004; Roma-Rodrigues et al., 2019).

Un enfoque innovador en el estudio del cáncer y la terapia metronómica fue propuesto por Isaiah J. Fidler y Robert E. Ellis, quienes argumentaron en su trabajo "Chemotherapeutic Drugs - More Is Really Not Better" que la maximización de las dosis de quimioterapia no siempre conduce a mejores resultados en el tratamiento del cáncer. Sugirieron que la quimioterapia metronómica, con sus dosis bajas y frecuentes, podría ser más efectiva y menos tóxica para los pacientes, cambiando la perspectiva de que "más es mejor".

El trabajo de Michael Browder y su equipo, a través de investigaciones como el estudio sobre el efecto antiangiogénico del medicamento talidomida, demostró que la quimioterapia metronómica podía tener un impacto significativo en la reducción del suministro sanguíneo de los tumores y, por lo tanto, en su crecimiento (Browder et al., 2000).

Además, el Dr. Robert Kerbel y sus colaboradores realizaron investigaciones cruciales que respaldaron la eficacia de la quimioterapia metronómica al demostrar su capacidad para suprimir la angiogénesis tumoral de manera sostenida y reducir el crecimiento de los tumores (Klement et al., 2000).

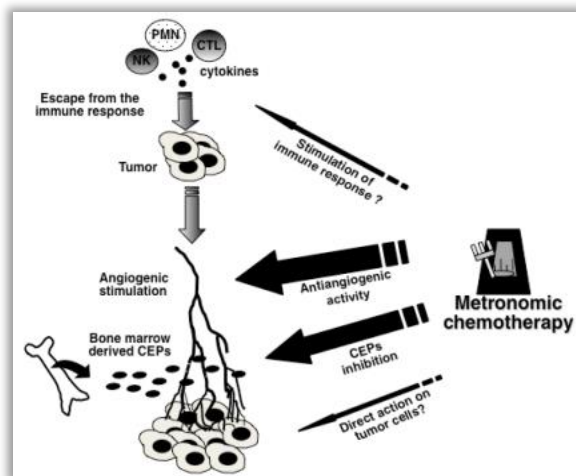
La QTM fue originalmente concebida para superar la resistencia a fármacos, desplazando el objetivo terapéutico desde las células tumorales hacia las células endoteliales de la vasculatura tumoral y su microambiente. En trabajos previos, junto con estudios realizados en el Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario, liderados por la Dra. Graciela Scharovsky, se han estudiado y descrito en detalle los principales mecanismos terapéuticos atribuidos a la QTM, los cuales se representan esquemáticamente en la Figura 2 (*Current Oncol.*, 2009).

**Anti-angiogénesis:** Inhibición de la proliferación y migración de las células endoteliales y del reclutamiento de sus progenitores hematopoyéticos, inhibición de factores de crecimiento pro-angiogénicos y estimulación de factores anti-angiogénicos. Normalización de la vasculatura tumoral.

**Activación inmunitaria:** Inhibición directa de los Linfocitos T Reguladores y activación de una respuesta inmune, tanto innata como específica, contra las células tumorales y reactivación de la inmunovigilancia tumoral.

**Inducción de la quiescencia tumoral:** La QTM logra inducir la detención del ciclo celular tumoral al suprimir la angiogénesis y favorecer la apoptosis de células malignas y la activación del sistema inmune.

**Inducción de la senescencia tumoral:** La detención irreversible del ciclo celular tumoral es desencadenada por daños irreversibles al ADN, provocados por la acción directa de dosis bajas y continuas de drogas citotóxicas (Scharovsky et al., 2009).



**Figura 2. Mecanismos de acción de la QTM.** Representación esquemática de los principales mecanismos terapéuticos atribuidos a la quimioterapia metronómica (QTM), incluyendo inhibición de la angiogénesis, activación inmunitaria, modulación de la quiescencia y la senescencia tumoral.

*Adaptado de Scharovsky, 2009.*

Se utilizan dosis optimizadas biológicamente en vez de DMT. Debido a las dosis bajas se presenta una baja incidencia de efectos secundarios y ausencia de toxicidades graves. En consecuencia, la falta de efectos secundarios implica que no se necesite administrar factores de crecimiento hematopoyéticos u otros fármacos para tratar toxicidades. La generación de resistencia a los fármacos es muy baja, a diferencia de lo que sucede cuando el régimen de tratamiento es el de DMT. La adherencia al tratamiento suele ser muy alta debido a que la administración de fármacos es, preferentemente, oral, y/o parenteral ambulatoria.

En la actualidad, la quimioterapia metronómica está ganando terreno como una estrategia prometedora en la lucha contra el cáncer. Sus alcances incluyen, no solo la inhibición de la angiogénesis sino también la modulación del sistema inmunológico para combatir el cáncer de manera más efectiva. Además, este enfoque tiene el potencial de ser más accesible en países de bajos recursos, como se ha destacado en los trabajos de Nicolas André, quien ha abogado por su implementación en entornos con recursos limitados (André et al, 2013; Traore et al, 2013). En pediatría, la QTM se ha utilizado principalmente en el tratamiento de tumores sólidos avanzados o metastásicos, en los que la quimioterapia convencional no ha sido efectiva (Banchi et al, 2022).

En resumen, la QTM se posiciona como una alternativa terapéutica sólida y en expansión dentro del tratamiento oncológico pediátrico. Más allá de su ya reconocida capacidad antiangiogénica, estudios recientes refuerzan su utilidad como estrategia de mantenimiento, paliación e incluso control prolongado de la enfermedad en distintos tipos tumorales. Si bien inicialmente enfocada en pacientes con enfermedad avanzada o refractaria, la QTM ha comenzado a aplicarse también en escenarios más tempranos del tratamiento, particularmente en tumores como neuroblastoma, gliomas de bajo grado, meduloblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing y osteosarcoma (Roux et al., 2021; Peyrl et al., 2023 ; Sakurai et al., 2024; Heng-Maillard et al., 2019).

En neuroblastoma, por ejemplo, se han observado tasas alentadoras de supervivencia libre de enfermedad con esquemas metronómicos basados en vinblastina, particularmente como terapia de mantenimiento tras inducción en contextos sin trasplante autólogo o inmunoterapia anti-GD2 (Roux et al., 2021). En tumores del sistema nervioso central como los gliomas de bajo grado y el meduloblastoma recurrente, la QTM también ha demostrado ser efectiva para evitar recaídas tempranas y prolongar la supervivencia global, respectivamente (Peyrl et al., 2023; Winnicki et al., 2023). Estos hallazgos, aunque aún preliminares y limitados por el tamaño de muestra en muchos estudios, abren un camino promisorio para consolidar regímenes de QTM adaptados a pediatría.

Entre sus principales fortalezas, se destacan la baja toxicidad, la administración oral o ambulatoria, y su potencial aplicación en entornos con recursos limitados. No obstante, persisten desafíos como la estandarización de esquemas terapéuticos, la identificación de biomarcadores predictivos de respuesta y la necesidad de estudios controlados multicéntricos de mayor escala.

Dado este creciente cuerpo de evidencia y sus implicancias clínicas, resulta fundamental explorar con mayor detalle los fármacos más comúnmente utilizados en esquemas metronómicos pediátricos, así como sus características farmacológicas, mecanismos de acción y combinaciones terapéuticas más eficaces.

## **Fármacos**

En el contexto de la QTM, la selección de los agentes quimioterapéuticos no solo responde a su eficacia citotóxica, sino también a su perfil farmacocinético, tolerabilidad a largo

plazo y capacidad para modular el microambiente tumoral, particularmente mediante la inhibición de la angiogénesis y la regulación inmunitaria. Los fármacos incluidos en los esquemas metronómicos suelen administrarse por vía oral o en forma endovenosa ambulatoria, con regímenes continuos o semanales de baja dosis, lo que facilita su utilización en pediatría (André et al., 2014). A continuación, se describen los agentes más frecuentemente empleados en pediatría, junto con sus mecanismos de acción y esquemas de dosificación más comunes:

**Tabla 1. Fármacos utilizados en esquemas metronómicos pediátricos.**  
Descripción de los agentes quimioterapéuticos más frecuentes en oncología pediátrica bajo esquemas metronómicos, junto a sus mecanismos de acción y dosis habituales.

Fármaco	Mecanismo de acción	Dosificación
<b>Ciclofosfamida</b>	Agente alquilante que interfiere con la replicación del ADN, induciendo apoptosis.	Oral: 25-100 mg/día, en régimen continuo.
<b>Vinblastina</b>	Antimitótico que inhibe la formación del huso mitótico, deteniendo la mitosis.	Endovenosa: 1-3 mg/m <sup>2</sup> , 1-2 veces por semana.
<b>Vinorelbina</b>	Inhibe la polimerización de los microtúbulos, interfiriendo con la mitosis.	Endovenosa: 10-20mg/m <sup>2</sup> , una vez por semana.
<b>Etopósido</b>	Inhibe la topoisomerasa II, causando roturas en el ADN de doble hebra.	Oral: 25-50 mg/m <sup>2</sup> , 2-3 veces por semana.
<b>Metotrexato</b>	Inhibe la enzima dihidrofolato reductasa, bloqueando la síntesis de timidina y purina.	Oral: 2.5-10 mg, una vez al día, en régimen continuo.

Algunos de estos agentes han demostrado, en estudios preclínicos y clínicos, no solo efectos directos sobre las células tumorales, sino también un impacto relevante en la inhibición de la angiogénesis (e.g., ciclofosfamida, vinblastina), en la modulación inmune (e.g., metotrexato y ciclofosfamida) y en la inducción de senescencia celular (Browder et al., 2000; Colleoni et al., 2002; Scharovsky et al., 2009; Rozados et al. 2010). Estos mecanismos son fundamentales para lograr el control tumoral sin recurrir a dosis máximas toleradas, lo que reduce significativamente la toxicidad acumulativa.

El uso metronómico de vinblastina, por ejemplo, ha sido asociado a tasas reducidas de progresión en gliomas de bajo grado pediátricos (Roux et al., 2021), mientras que la combinación de ciclofosfamida con otros agentes antiangiogénicos ha demostrado eficacia en diversos tumores sólidos infantiles (Peyrl et al., 2023; Carcamo & Francia, 2022). El etopósido y el metotrexato, por su parte, han sido incluidos con éxito en esquemas metronómicos combinados, como el protocolo MEMMAT, utilizado en meduloblastoma recurrente y otros tumores del SNC pediátricos.

## Biomarcadores Pronóstico/Predictivos

En el abordaje integral del cáncer, los conceptos de marcadores, biomarcadores pronósticos y biomarcadores predictivos de respuesta adquieren un papel central en la caracterización de la enfermedad, la estimación del curso clínico y la toma de decisiones terapéuticas individualizadas (Henry & Hayes, 2012; Simon & Roychowdhury, 2013).

Los marcadores tumorales comprenden un amplio espectro de características biológicas, moleculares o genéticas que permiten identificar, cuantificar o monitorear el desarrollo y la progresión del cáncer. Estos pueden incluir proteínas circulantes, productos génicos, metabolitos o señales celulares asociadas al comportamiento tumoral (Poste, 2011; Hanahan & Weinberg, 2011).

En particular, los biomarcadores pronósticos son aquellos que brindan información sobre la evolución natural de la enfermedad, independientemente del tratamiento aplicado. Su presencia o expresión permite estimar la probabilidad de recurrencia, progresión o supervivencia, y son de utilidad para estratificar a los pacientes en grupos de riesgo. Por ejemplo, la sobreexpresión de ciertos factores angiogénicos o la presencia de células tumorales circulantes puede estar asociada con peor pronóstico en diversas neoplasias pediátricas (Gyorffy & Schäfer, 2014).

Por otro lado, los biomarcadores predictivos de respuesta permiten anticipar la eficacia de una intervención terapéutica específica. Estos biomarcadores son fundamentales para optimizar el tratamiento, evitando exposiciones innecesarias a terapias ineficaces y favoreciendo un enfoque más personalizado (Henry & Hayes, 2012; Simon & Roychowdhury, 2013). Un ejemplo clásico es la expresión de receptores moleculares que determinan la sensibilidad de ciertos tumores a terapias dirigidas, así como la presencia de biomarcadores inmunológicos que predicen la eficacia de inhibidores de puntos de control inmunológico, como PD-1 o PD-L1 (Duffy, 2009).

En el contexto de la QTM, el estudio de biomarcadores adquiere un interés creciente, ya que muchos de los efectos terapéuticos observados —como la inhibición de la angiogénesis, la inmunomodulación o la inducción de senescencia tumoral— pueden ser monitoreados o anticipados a través de variables biológicas específicas. De este modo, los biomarcadores relacionados con la vascularización tumoral, la función inmune y la biología celular ofrecen herramientas potenciales para comprender mejor la evolución de la enfermedad y el impacto de este enfoque terapéutico (Scharovsky et al., 2009). En las secciones siguientes se desarrollará el marco conceptual y biológico de los principales biomarcadores de interés en oncología pediátrica, con especial énfasis en aquellos que podrían tener implicancias pronósticas o predictivas en el contexto de la QTM.

## Células Endoteliales Circulantes

Las células endoteliales circulantes (CEC) son un subconjunto de células presentes en la sangre periférica que desempeñan un papel clave en los procesos de angiogénesis y reparación vascular. Se originan principalmente por el desprendimiento de células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos, como daño tisular o inflamación. También se ha propuesto que algunas CEC podrían derivar de células madre hematopoyéticas de la médula ósea, lo cual añade complejidad a su caracterización y función (Urbich & Dimmeler, 2004).

La identificación y caracterización fenotípica de las CEC se ha perfeccionado mediante técnicas de citometría de flujo, que permiten detectar y cuantificar estas células utilizando anticuerpos específicos contra marcadores endoteliales como CD31, CD34 y CD146. Esta estrategia permite distinguirlos de otros elementos celulares de la sangre y analizar su perfil inmunofenotípico con precisión (Hill et al., 2003).

En el contexto oncológico, las CEC han cobrado relevancia por su implicancia en la angiogénesis tumoral, proceso fundamental para el crecimiento y diseminación de los tumores. Diversos estudios han demostrado que los niveles elevados de CEC se asocian con una mayor progresión tumoral y peor pronóstico clínico, posicionándolas como un potencial biomarcador pronóstico en distintas neoplasias (Mancuso et al., 2001). Además, las CEC pueden portar información genética o proteica derivada del microambiente tumoral, lo que sugiere su valor como herramienta no invasiva para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad (Shaked & Kerbel, 2007).

En el marco de la QTM, el análisis de las CEC ha demostrado ser particularmente útil. Debido a que uno de los principales mecanismos de acción de la QTM es la inhibición sostenida de la angiogénesis, la cuantificación de CEC se ha propuesto como un biomarcador dinámico para evaluar la respuesta terapéutica antiangiogénica. Varios estudios han reportado que una disminución en los niveles de CEC durante el tratamiento se correlaciona con una mayor eficacia clínica, reforzando su utilidad como marcador de respuesta en este contexto terapéutico (Pasquier et al., 2010).

## Células Endoteliales Progenitoras

Las células endoteliales progenitoras (CEP) son un tipo de célula madre de origen hematopoyético, con un rol fundamental en la formación de nuevos vasos sanguíneos (vasculogénesis) y en la reparación vascular. Se originan en la médula ósea, a partir de células madre hematopoyéticas pluripotentes las que, bajo estímulo de factores de crecimiento como VEGF o G-CSF, se diferencian hacia linajes endoteliales (Asahara et al., 1997). Estas células migran hacia los tejidos periféricos en respuesta a señales de hipoxia o daño vascular, donde participan activamente en la neovascularización.

La identificación de las CEP se realiza habitualmente mediante citometría de flujo, caracterizándolas por la co-expresión de CD34 y CD133, junto con la ausencia de marcadores de células endoteliales maduras como CD31 o CD144. Esta combinación fenotípica permite

distinguir las de otras poblaciones circulantes y facilita su estudio funcional y cuantitativo (Timmermans et al., 2009; Ingram et al., 2004).

En el contexto oncológico, las CEP han sido implicadas en la angiogénesis tumoral, actuando como un componente esencial del reclutamiento vascular que permite a los tumores adquirir un suministro sanguíneo adecuado para su crecimiento y diseminación. Se ha demostrado que los niveles elevados de CEP se correlacionan con una mayor capacidad angiogénica y resistencia a terapias antiangiogénicas, como los anti-VEGF (Shojaei et al., 2009). Esto ha motivado investigaciones sobre la inhibición selectiva de CEP como estrategia terapéutica antitumoral.

Por otro lado, en un contexto opuesto, las CEP también se han explorado como herramienta terapéutica en medicina regenerativa, dadas sus propiedades vasculogénicas. Su potencial aplicación en enfermedades cardiovasculares o isquémicas ha sido objeto de ensayos preclínicos con resultados alentadores.

En relación con la QTM, las CEP representan un blanco clave debido a su participación en la vascularización tumoral. La administración continua de dosis bajas de agentes como vinblastina o ciclofosfamida ha demostrado tener un efecto antiangiogénico sostenido, en parte por la inhibición del reclutamiento y la función de las CEP, lo que limita la formación de nuevos vasos y, con ello, la progresión tumoral (Klement et al., 2000). En este sentido, el monitoreo de CEP circulantes se postula como un biomarcador dinámico de respuesta a la QTM.

## Linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores (Tregs) constituyen una subpoblación especializada de células T CD4+ con una función inmunomoduladora clave. Se caracterizan por la expresión del receptor de alta afinidad para la interleucina-2 (CD25) y, especialmente, por el factor de transcripción nuclear FoxP3, considerado el marcador más específico de esta población. Los Tregs se desarrollan tanto en el timo (naturales) como en los tejidos linfoides periféricos (inducidos), y son fundamentales para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica, evitando respuestas autoinmunes o inflamatorias exacerbadas (Sakaguchi et al., 2008).

Su principal mecanismo de acción es la supresión funcional de linfocitos T efectores y otras células inmunes a través de múltiples vías: la secreción de citocinas antiinflamatorias como TGF- $\beta$  e IL-10, la competencia por factores de crecimiento como IL-2, y la interferencia metabólica y de señalización dentro del microambiente inmunológico (Sakaguchi et al., 2008).

La identificación de Tregs en muestras biológicas se realiza mediante citometría de flujo multiparamétrica, utilizando combinaciones de marcadores como CD4+, CD25<sup>high</sup>, y expresión intracelular de FoxP3, lo cual permite su diferenciación respecto de otras poblaciones T CD4+ activadas (Baecher-Allan et al., 2006).

El papel de los Tregs en la inmunología tumoral es complejo. Si bien son esenciales para evitar autoinmunidad, en el entorno tumoral pueden ser explotados por las células malignas para evadir la inmunovigilancia, favoreciendo así la progresión y diseminación del cáncer. En numerosos tumores sólidos se ha asociado un incremento de Tregs intratumorales

y circulantes con mal pronóstico y menor eficacia de terapias inmunomoduladoras (Nishikawa & Sakaguchi, 2017).

En este contexto, la QTM ha demostrado tener un efecto inmunomodulador adicional: la reducción selectiva de Tregs. En un estudio seminal, Ghiringhelli et al. (2004) mostraron que la administración continua de ciclofosfamida a baja dosis disminuía significativamente la proporción de Tregs en modelos murinos y en pacientes, restaurando parcialmente la respuesta inmunitaria antitumoral. Este hallazgo posicionó a la QTM no solo como una estrategia antiangiogénica, sino también como una herramienta para potenciar la inmunidad adaptativa contra el tumor. Estudios posteriores han reforzado esta observación en distintos tipos tumorales y esquemas clínicos (Pasquier et al., 2010).

Sin embargo, los efectos de la QTM sobre los Tregs pueden variar según el tipo de cáncer, la droga utilizada y el estado inmunológico del paciente, por lo que se requiere mayor investigación para definir su aplicación clínica óptima.

### Sistema- sPD-1 / sPD-L1

El sistema muerte programada y su ligando de muerte programada, (PD-1 / PD-L1; del inglés, *Programmed Death-1 / Programmed Death-Ligand 1*) es una vía inmunológica clave en el campo de la inmunoterapia del cáncer. PD-1 es una proteína de membrana presente en la superficie de las células T del sistema inmunológico, cuya función principal es actuar como regulador de la respuesta inmunológica al interactuar con su ligando, PD-L1. Esta interacción, en condiciones normales, contribuye a evitar respuestas autoinmunes; sin embargo, las células tumorales explotan esta vía para evadir la inmunovigilancia.

Bioquímicamente, PD-1 está compuesto por un dominio inmunoglobulina extracelular que se une a PD-L1, y un dominio citoplasmático que transmite señales inhibitorias a la célula T. PD-L1, por su parte, es expresado por múltiples tipos celulares, incluyendo células tumorales y células presentadoras de antígenos. Cuando se unen, se produce una señal que reduce la activación de las células T, su proliferación y secreción de citocinas (Pardoll, 2012; Chen & Han, 2015).

La aplicación clínica de los inhibidores de PD-1 / PD-L1, como pembrolizumab o nivolumab, ha revolucionado el tratamiento de diversos tumores sólidos avanzados, mejorando la supervivencia en múltiples tipos de cáncer (Gandhi et al., 2018; Hargadon et al., 2018). Sin embargo, la tasa de respuesta sigue siendo limitada y variable entre pacientes.

Una dimensión menos explorada, pero en creciente interés, es el estudio de las formas solubles de estos receptores: PD-1 soluble (sPD-1) y PD-L1 soluble (sPD-L1). Estas formas circulantes derivan del clivaje proteolítico de las proteínas de membrana y pueden encontrarse en sangre periférica. El sPD-1 puede actuar como “trampa” de PD-L1, inhibiendo parcialmente la señalización inmunosupresora, mientras que el sPD-L1 puede competir con PD-L1 de membrana, interfiriendo con la respuesta inmunológica antitumoral (Li et al., 2018; Frigola et al., 2011).

Los niveles de sPD-1 y sPD-L1 han sido propuestos como biomarcadores de progresión tumoral, pronóstico y respuesta a la inmunoterapia. Zhang et al. (2019) encontraron que

concentraciones elevadas de sPD-L1 se correlacionaban con mayor expresión tumoral de PD-L1 y peor pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar no microcítico.

En el contexto pediátrico, si bien los estudios aún son escasos, se ha sugerido que los mecanismos inmunológicos involucrados en la evasión tumoral podrían tener características similares a los de adultos. La revisión de Muraro et al. (2023) destaca que la combinación de QTM con inmunoterapia basada en *checkpoint inhibitors* como PD-1/PD-L1 podría ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas en oncología pediátrica, incluyendo modelos preclínicos donde se observó que el agregado de QTM a la inmunoterapia mantenía la eficacia del tratamiento (Muraro et al., 2023).

A pesar de que los estudios directos sobre sPD-1 y sPD-L1 en pediatría con QTM son escasos, la literatura emergente sugiere que su evaluación podría ofrecer pistas importantes como biomarcadores de respuesta en ensayos futuros.

## Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-2

El Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, del inglés, *Vascular endothelial growth factor*) es una glicoproteína clave en el proceso de angiogénesis, es decir, en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Su descubrimiento se remonta a 1983, cuando Senger et al. identificaron una proteína tumoral que aumentaba la permeabilidad vascular, y que más tarde fue reconocida como VEGF (Senger et al., 1983).

Desde entonces, se han identificado múltiples miembros de esta familia, incluyendo VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y Factor de crecimiento placentario (PlGF, del inglés *Placental Growth Factor*). De estas, VEGF-A es la isoforma más estudiada, y existen diversas variantes moleculares generadas por *splicing* alternativo de su gen. Estas variantes difieren en su afinidad por los receptores específicos VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1), que se expresan principalmente en células endoteliales. Además, la interacción de VEGF con correceptores como Neuropilina-1 (NRP-1) modula sus efectos sobre la proliferación, migración y supervivencia celular (Olsson et al., 2006).

En condiciones fisiológicas, VEGF es indispensable para la vasculogénesis embrionaria, la respuesta a la hipoxia y la reparación tisular, manteniendo la homeostasis vascular. Sin embargo, en el contexto oncológico, muchos tumores exhiben una sobreexpresión de VEGF, lo cual promueve el desarrollo de vasos anómalos que alimentan el crecimiento tumoral y facilitan la diseminación metastásica (Ferrara & Adamis, 2016).

La comprensión de la función crítica de VEGF en la angiogénesis tumoral condujo al desarrollo de terapias antiangiogénicas que buscan bloquear su acción. Fármacos como el bevacizumab (Avastin), un anticuerpo monoclonal contra VEGF-A, han demostrado beneficios en el tratamiento de diversos tumores sólidos (cáncer de mama, colon, pulmón), especialmente cuando se utilizan en combinación con esquemas de quimioterapia convencional (Ferrara & Kerbel, 2005).

En este contexto, la QTM representa una estrategia terapéutica complementaria con fuerte impacto sobre la vía del VEGF. Diversos estudios han demostrado que la administración continua y a bajas dosis de agentes quimioterapéuticos puede inhibir de forma sostenida la

expresión de VEGF, reduciendo así la angiogénesis tumoral y favoreciendo la normalización de la vasculatura, con mejoras en la perfusión y la entrega de fármacos (Kerbel & Kamen, 2004). Esta supresión crónica de VEGF constituye uno de los mecanismos centrales del efecto antitumoral de la QTM, y su cuantificación en sangre periférica ha sido explorada como un biomarcador de respuesta y pronóstico clínico.

## Receptor soluble del VEGF-2

El receptor soluble del VEGF-2 (sVEGFR-2) es una proteína clave en la regulación de la angiogénesis, proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Deriva de la proteólisis o del *splicing* alternativo del VEGFR-2 de membrana, una tirosina quinasa presente en células endoteliales que media los efectos proangiogénicos del VEGF-A (Shibuya, 2011; Kendall & Thomas, 1993).

Desde el punto de vista biomolecular, el sVEGFR-2 conserva los dominios extracelulares de su forma de membrana, lo que le permite unirse al VEGF libre sin inducir señalización intracelular. De este modo, actúa como un “receptor señuelo”, neutralizando al VEGF y bloqueando su unión a los receptores funcionales, inhibiendo así la angiogénesis (Waltenberger et al., 1994; Vasudev & Reynolds, 2014).

En condiciones fisiológicas, el sVEGFR-2 es producido por células endoteliales como parte del control natural de la angiogénesis. En cáncer, donde los tumores suelen sobreexpresar VEGF para estimular la vascularización que les da soporte, el sVEGFR-2 puede actuar como regulador negativo de este proceso, constituyéndose en un potencial biomarcador angiogénico (Iwamoto et al., 2016; Shibuya, 2011).

El valor clínico del sVEGFR-2 ha sido evaluado en estudios que aplicaron QTM en pacientes con cáncer. En un ensayo clínico dirigido por Perroud y colaboradores, se observó que el tratamiento metronómico con ciclofosfamida y celecoxib inducía una disminución progresiva del VEGF y un incremento sostenido de sVEGFR-2. Además, el cociente VEGF/sVEGFR-2 basal se asoció inversamente con el tiempo hasta la progresión, proponiéndose como un posible marcador de respuesta al tratamiento (Perroud et al., 2013; Perroud et al., 2015).

Estudios posteriores han reforzado la hipótesis de que la liberación de sVEGFR-2 forma parte del mecanismo antiangiogénico de la QTM, y su análisis conjunto con otros marcadores como VEGF o TSP-1 podría mejorar la capacidad predictiva para identificar pacientes que se beneficien con este enfoque terapéutico (André et al., 2014; Muraro, 2023).

## Trombospondina-1

La Trombospondina-1 (TSP-1) es una glicoproteína extracelular multifuncional que desempeña un papel crucial en la regulación de la angiogénesis, la adhesión celular, la migración y la comunicación entre células y matriz extracelular. Fue identificada por primera vez en la década de 1980 en estudios que analizaban proteínas secretadas por plaquetas

activadas y células endoteliales, destacándose rápidamente como uno de los primeros reguladores antiangiogénicos descritos en la literatura científica (Adams & Lawler, 2004).

Desde una perspectiva estructural, TSP-1 es una proteína multidominio con regiones ricas en repeticiones tipo trombospondina, dominios de unión a colágeno, y sitios de interacción con receptores celulares como CD36, CD47 e integrinas, lo que le confiere una gran versatilidad funcional. Esta arquitectura le permite influir en múltiples procesos fisiológicos, incluyendo la remodelación tisular, la migración celular y la inhibición de la angiogénesis (Bornstein, 1995).

En condiciones fisiológicas, TSP-1 se expresa en diversos tipos celulares, como plaquetas, células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales, contribuyendo a la homeostasis del microambiente tisular. Sin embargo, en el contexto tumoral, se ha observado una frecuente represión de la expresión de TSP-1, mediada por mecanismos epigenéticos o por señalización aberrante, lo que favorece la angiogénesis patológica y la progresión tumoral (Yang et al., 2018).

Diversos estudios han demostrado que la reducción de TSP-1 está asociada con un aumento en la vascularización tumoral y una mayor agresividad en distintos tipos de cáncer, incluyendo el de mama, ovario, próstata y glioma. Esta evidencia ha llevado a postular que TSP-1 puede actuar como un supresor tumoral, además de ser un biomarcador pronóstico de interés en oncología (Kazerounian, Yee & Lawler, 2008).

En el contexto de la QTM, la TSP-1 ha cobrado relevancia como mediadora de algunos de sus efectos antiangiogénicos. La administración continua y a bajas dosis de agentes quimioterapéuticos ha demostrado inducir un aumento en la expresión de TSP-1, contribuyendo a la inhibición sostenida de la neovascularización tumoral. En un trabajo clásico, Kerbel y Kamen (2004) sugirieron que parte del efecto terapéutico de la QTM se debe precisamente a la inducción de inhibidores endógenos de la angiogénesis, como TSP-1, lo que refuerza su utilidad tanto como blanco terapéutico como biomarcador de respuesta.

### **Factor de crecimiento fibroblástico básico**

El Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (bFGF o FGF-2, del inglés, *basic Fibroblast Growth Factor*) es una proteína clave en la regulación del crecimiento celular, la reparación tisular y la angiogénesis. Fue identificado por primera vez en la década de 1970 a partir de extractos cerebrales bovinos por el grupo de Gospodarowicz, al observarse su capacidad para estimular la proliferación de fibroblastos. Desde entonces, su rol se ha extendido al estudio de procesos biológicos normales y patológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, la cicatrización y la progresión tumoral (Beenken & Mohammadi, 2009; Presta et al., 2005).

Desde un punto de vista biomolecular, el bFGF es una proteína de bajo peso molecular (aprox. 18 kDa) compuesta por 146 aminoácidos, perteneciente a una familia que incluye al menos 22 miembros conocidos. Su acción se ejerce al unirse a receptores tirosina quinasa específicos (FGFR1-4), ubicados en la membrana plasmática de células diana. Esta unión activa vías de señalización intracelular como RAS-MAPK, PI3K-AKT y PLC $\gamma$ , regulando procesos como la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular (Turner & Grose, 2010).

En condiciones fisiológicas, bFGF se encuentra ampliamente distribuido en tejidos como músculo, hueso, cerebro, piel y mucosas, participando activamente en la homeostasis y regeneración tisular. Ha demostrado promover la angiogénesis en contextos fisiológicos y reparativos, como la cicatrización de heridas, mediante la estimulación directa de células endoteliales (Zare et al., 2023).

Sin embargo, en el contexto tumoral, bFGF suele estar sobreexpresado, lo que favorece el crecimiento descontrolado, la resistencia a la apoptosis y la formación de nueva vasculatura tumoral. Esta actividad proangiogénica es clave para sostener la proliferación y diseminación de distintos tipos de tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, próstata, pulmón, y glioblastoma (Presta et al., 2005; Ardizzone et al., 2023).

Diversos estudios han demostrado que bFGF no solo estimula la angiogénesis, sino que también puede modular la respuesta a ciertos tratamientos oncológicos. Por ejemplo, Jodat et al. (2023) mostraron que bFGF puede potenciar el efecto de agentes como la ciclofosfamida sobre células tumorales, favoreciendo la apoptosis en líneas de cáncer colorrectal.

En cuanto a la QTM, se ha propuesto que uno de sus mecanismos de acción incluye la inhibición sostenida de factores proangiogénicos como VEGF y bFGF, afectando negativamente la viabilidad del endotelio tumoral. En un trabajo clásico de Browder et al. (2000), se demostró que el uso prolongado y en bajas dosis de ciclofosfamida era capaz de inducir regresión tumoral en modelos resistentes, en parte debido a su acción antiangiogénica mediada por la disminución de bFGF y VEGF.

Más allá de su rol como blanco terapéutico, bFGF ha sido evaluado como biomarcador pronóstico y predictor de respuesta a terapias antiangiogénicas. Su medición en sangre periférica o en tejido tumoral puede aportar información relevante sobre la agresividad del tumor y su potencial respuesta a estrategias combinadas como la QTM (Ardizzone et al., 2023).

## Antecedentes de ensayos clínicos publicados

La tabla 2 resume estudios clínicos publicados sobre seguridad y efectividad de la QTM en pediatría, detallando ensayos desde 1997 hasta 2014. Se investigaron diferentes combinaciones de fármacos en niños con tumores sólidos recurrentes o refractarios. Los estudios variaron en duración (de 6 a 40 meses) y mostraron diversos resultados en términos de control de la enfermedad y toxicidad, con tasas de beneficio clínico que oscilaron entre el 12% y el 80%.

**Tabla 2. Ensayos clínicos publicados sobre QTM en pediatría.**

Resumen de estudios clínicos que evaluaron la eficacia y seguridad de la quimioterapia metronómica (QTM) en pacientes pediátricos con tumores sólidos recurrentes o refractarios, incluyendo combinaciones de fármacos, duración del tratamiento, resultados clínicos y toxicidad.

*Abreviaturas:* N: número de pacientes, RC: remisión completa, RP: respuesta parcial, ES: Enfermedad Estable, PE: Progresión de enfermedad, BCT: Beneficio Clínico Total (RC+RP+ES); sem: semana.

AÑO	ENSAYO CLÍNICO	PAÍS	FARMACOS	TIEMPO	RESULTADOS						
					N	RC	RP	ES	PE	BCT (%)	Toxicidad
1997	Phase II Study of Daily Oral Etoposide in Children with Recurrent Brain tumors and other solid tumors (Needle, 1997).	EEUU	Etopósido 50mg/m <sup>2</sup> /día	18 meses	28	1	4	7	16	42,9	Grado 3 neutropenia
2003	Phase I Study of Oral Cyclophosphamide and Oral Topotecan for Children with Recurrent or Refractory Solid Tumors (Bowers, 2004).	EEUU	Ciclofosfamida 50mg/m <sup>2</sup> /día Topotecan 0,8mg/m <sup>2</sup> /dosis	40 meses	16	1	1	1	13	18,8	Grado 4 neutropenia
2005	A Feasibility Trial of Antiangiogenic (Metronomic) Chemotherapy in Pediatric Patients with Recurrent or Progressive Cancer (Kieran, 2005).	EEUU	Talidomida 3-24mg/kg/día Celecoxib 100-400mg/día Etopósido 50mg/m <sup>2</sup> /día Ciclofosfamida 2,5mg/kg/día	6 meses	20	0	3	7	10	50	<Grado 3 neutropenia
2006	A Pilot Pharmacokinetic and Antiangiogenic Biomarker Study of Celecoxib and Low-dose Metronomic Vinblastine or Cyclophosphamide in Pediatric Recurrent Solid Tumors (Stempak, 2006).	CANADA	Celecoxib 250mg/m <sup>2</sup> /día Vinblastina 1mg/m <sup>2</sup> /sem. Ciclofosfamida 30mg/m <sup>2</sup> /día	3-62 semanas	33	0	0	4	29	12,1	Toxicidades leves

<b>2006</b>	Combined Biodifferentiating and Antiangiogenic Oral Metronomic Therapy is Feasible and Effective in Relapsed Solid Tumors in Children: Single-Center Pilot Study (Sterba, 2006).	REP. CHECA	Celecoxib 250mg/m <sup>2</sup> /día Etopósido 25mg/m <sup>2</sup> /día Temozolomida 60mg/m <sup>2</sup> /día Isotreonina 100mg/m <sup>2</sup> /día	5-14 meses	22	2	4	3	13	40,9	Toxicidades leves, bien tolerado
<b>2008</b>	Feasibility of Metronomic Maintenance Chemotherapy Following High-Dose Chemotherapy for Malignant Central Nervous System Tumors (Choi, 2008).	EEUU	Etopósido 50mg/m <sup>2</sup> /día Ciclofosfamida 2,5mg/kg/día Temozolomida 90mg/m <sup>2</sup> /día Celecoxib 100mg/día Isotreonina 100mg/m <sup>2</sup> /día	6 meses	10	3	1	4	2	80	Toxicidades leves
<b>2008</b>	Phase II Study of Metronomic Chemotherapy with Thalidomide, Carboplatin-Vincristine-Fluvastatin in the Treatment of Brain Stem Tumors in Children (Lopez-Aguilar, 2008).	MEXICO	Carboplatino 350mg/día Vincristina 2mg/m <sup>2</sup> /15 días, Fluvastatina 8mg/kg/día Talidomida 3mg/kg/día	4 meses,	9	0	7	0	2	77,8	
<b>2010</b>	Phase II trial of low-dose continuous (metronomic) treatment of temozolomide for recurrent glioblastoma (Kong, 2010).	COREA DEL SUR	Temozolomida 40-50mg/m <sup>2</sup>	22 semanas	38	0	2	23	13	65,8	
<b>2011</b>	Children Treated with Metronomic Chemotherapy in a Low-income Country: METRO-MALI-01 (Fousseyni, 2011).	MALI	Vincristina 1,5mg/m <sup>2</sup> /sem. Ciclofosfamida 25mg/m <sup>2</sup> /día Metotrexato 15mg/m <sup>2</sup> /sem	15-24 semanas	12	0	0	7	5	58,3	
<b>2011</b>	Pilot study of a pediatric metronomic 4-drug regimen (André, 2011).	FRANCIA	Vinblastina 3mg/m <sup>2</sup> /sem. Ciclofosfamida 30mg/m <sup>2</sup> /día Metotrexato 10mg/m <sup>2</sup> /sem. Celecoxib 100-400mg/día	8 semanas	16	3	1	0	12	25	
<b>2012</b>	Antiangiogenic Metronomic Therapy for Children with Recurrent Embryonal Brain Tumors (Peyrl, 2012).	AUSTRIA	Talidomida 1,5-8mg/kg/día Celecoxib 50-400mg/día Etopósido 10-50mg/m <sup>2</sup> /día Ciclofosfamida 0,5-2,5mg/kg/día - 100mg/día Fenofibrato 90mg/m <sup>2</sup> Bevacizumab	10-58 meses	16	2	4	4	6	62,5	leves

<b>2012</b>	Metronomic Chemotherapy with the COMBAT Regimen in Advanced Pediatric Malignancies: A Multicenter Experience (Zapletalova, 2012).	REP. CHECA	Celecoxib 400mg/m <sup>2</sup> /día Etopósido 25mg/m <sup>2</sup> /día Temozolomida 60mg/m <sup>2</sup> , Fenofibrato 100mg/m <sup>2</sup> /día, Colecalciferol 300 UI/m <sup>2</sup> /día Ciclofosfamida 30mg/m <sup>2</sup> /día Vinorelbine 60mg/m <sup>2</sup> /sem Ácido Retinoico 200mg/m <sup>2</sup> /bisemanal	12 meses	74	11	6	7	50	32,4	
<b>2014</b>	A Phase II Trial of a Multi-Agent Oral Antiangiogenic (Metronomic) Regimen in Children with Recurrent or Progressive Cancer (Robison, 2014).	EEUU	Talidomida 3-24mg/kg/día Celecoxib 100-400mg/día Fenofibrato 90mg/m <sup>2</sup> , Etopósido 50mg/m <sup>2</sup> /día, Ciclofosfamida 2,5mg/kg/día	27 semanas	97	1	12	36	47	50,5	
<b>2016</b>	Metronomic chemotherapy and radiotherapy as salvage treatment in refractory or relapsed pediatric solid tumours (Ali & El-Sayed, 2016).	EGIPTO	Celecoxib: 100-400mg/día Vinblastina 3mg/m <sup>2</sup> Ciclofosfamida 2,5mg/kg/día Metotrexato 15mg/m <sup>2</sup> / sem	21 semanas	64		22	27	15	76,56	Anemia y neutropenia grado I
<b>2017</b>	Metronomic Chemotherapy vs Best Supportive Care in Progressive Pediatric Solid Malignant Tumors. A Randomized Clinical Trial (Pramanik, 2017).	INDIA	Ciclofosfamida 50mg/m <sup>2</sup> /día Etopósido 50mg/m <sup>2</sup> /día, Celecoxib 100-400mg/día, Talidomida 1-8mg/kg/día, vs placebo	2.9 meses	10 8	0	2	8	98	9,259	

## Antecedentes en el Instituto de Genética Experimental

Con el comienzo del milenio y el advenimiento de nuevas teorías respecto al tratamiento del cáncer, en el Instituto de Genética Experimental (IGE) de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario se inició una línea de investigación enfocada en la QTM. En uno de los primeros estudios preclínicos desarrollados por el grupo, se demostró que la administración continua y a bajas dosis de ciclofosfamida tenía un potente efecto antitumoral en modelos experimentales de linfoma y sarcoma en ratas, sin inducir toxicidades relevantes. A su vez, se documentó un marcado efecto antiangiogénico e inmunomodulador, reforzando el potencial de este enfoque como alternativa terapéutica menos tóxica que la quimioterapia convencional (Rozados et al., 2004).

Posteriormente, otros trabajos realizados en el IGE profundizaron estos hallazgos. Se observaron efectos inmunomoduladores significativos de la QTM con ciclofosfamida, incluyendo la modulación de poblaciones inmunes y citoquinas (Rozados et al., 2010; Zacarias-Fluck et al., 2010), así como también efectos antimetastásicos y antiangiogénicos en modelos murinos de adenocarcinoma mamario al utilizar esquemas combinados de ciclofosfamida con celecoxib o doxorubicina (Mainetti et al., 2011, Rico et al, 2014).

Luego de más de una década de trabajo preclínico sostenido, en el año 2013 se implementó el primer estudio clínico del grupo. En este ensayo, Perroud et al. trataron con un esquema metronómico compuesto por ciclofosfamida y celecoxib a un grupo de mujeres con cáncer de mama avanzado, metastásico, refractario o recurrente, sin otras opciones terapéuticas y con una expectativa de vida mayor a tres meses. El tratamiento demostró ser clínicamente seguro, bien tolerado y con escasas toxicidades, observándose una mejora subjetiva en la calidad de vida de un alto porcentaje de las pacientes (Perroud et al., 2013a).

Además del abordaje clínico, el estudio incluyó la evaluación de biomarcadores séricos pro- y antiangiogénicos, arrojando resultados relevantes:

- Disminución significativa de VEGF y aumento de sVEGFR-2, confirmando el perfil antiangiogénico del esquema.
- Elevación sostenida de sVEGFR-2 durante el tratamiento, sugiriendo su posible utilidad como marcador de respuesta.
- La relación basal VEGF/sVEGFR-2 mostró potencial como herramienta predictiva de respuesta terapéutica.
- Se documentó un aumento de CEC hacia el final del tratamiento, lo que refuerza su uso como biomarcador dinámico.
- Se observó una reducción sostenida en la proporción de pacientes con dolor y una posible acción analgésica complementaria atribuida al celecoxib.
- La calidad de vida se mantuvo estable o mejoró transitoriamente en la mayoría de las pacientes tratadas (Perroud et al., 2013b; 2015; 2016)

En el año 2015, profesionales del Servicio de Oncología del Hospital de Niños V. J. Vilela de Rosario se contactaron con el IGE debido a la necesidad de contar con biomarcadores

pronósticos o de respuesta que permitieran monitorear el efecto de la QTM en pacientes pediátricos. Según refirieron, este esquema terapéutico—anteriormente denominado “mantenimiento”—era utilizado con frecuencia en el ámbito pediátrico como parte de los protocolos estándar en diversas patologías oncológicas, especialmente en pacientes que:

- habían sido tratados por tumores de alto riesgo de recaída,
- o que habían recaído tras la quimioterapia de primera línea y se encontraban en remisión completa al momento de finalizar la quimioterapia convencional.

En estos casos, tras completar el tratamiento convencional, los pacientes eran derivados a esquemas de QTM ambulatoria por un período determinado, aunque sin la posibilidad de monitorear la respuesta mediante biomarcadores validados.

Frente a esta necesidad clínica concreta, se diseñó un proyecto de investigación colaborativo entre el IGE y los servicios de Oncología de los hospitales pediátricos “V. J. Vilela” de Rosario y “J. P. Garrahan” de Buenos Aires. El proyecto fue aprobado y financiado por el Instituto Nacional del Cáncer (INC) en el año 2016, dando origen al estudio clínico y traslacional que constituye el marco de esta tesis.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Identificar biomarcadores predictivos o de pronóstico de respuesta a la quimioterapia metronómica con diversos fármacos en pacientes pediátricos con tumores recaídos o refractarios y de alto riesgo de recaída.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar, en muestras de sangre entera, el recuento de células endoteliales circulantes (CEC) y células endoteliales progenitoras (CEP) y Linfocitos T Reguladores (Tregs) cada 8 semanas durante el tratamiento metronómico.
2. Determinar, en muestras de suero, las concentraciones de VEGF-2, bFGF, sVEGFR-2, TSP-1, sPD-1 y sPD-L1 cada 8 semanas a lo largo del tratamiento metronómico.
3. Valorar la ocurrencia de toxicidad hematológica, renal y hepática a lo largo del tratamiento.
4. Analizar el rol potencial como predictores de respuesta al tratamiento de los biomarcadores estudiados, en conjunto con los datos clínicos obtenidos de las historias clínicas.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

*La evaluación de distintas moléculas y tipos celulares circulantes en pacientes pediátricos con tumores recidivantes, en progresión o con alto riesgo de recaída permite identificar factores pronósticos que, en forma individual o combinada, mejoran la capacidad de predicción de respuesta a la quimioterapia metronómica, con el potencial de aumentar su eficacia y contribuir a una mejor calidad de vida.*

- Los valores séricos de **VEGF-2** y **bFGF** están disminuidos en los pacientes que responden al tratamiento, en comparación con aquellos que no lo hacen.
- Los valores séricos de **sVEGFR-2** y **TSP-1** están aumentados en los pacientes que responden al tratamiento, en comparación con aquellos que no lo hacen.
- La disminución progresiva del recuento de **CEC**, **CEP** y **Tregs** circulantes a lo largo del tratamiento se asocia con una mejor respuesta clínica.
- Las concentraciones séricas de **sPD-1** y **sPD-L1** muestran un patrón diferencial entre los pacientes con buena evolución clínica y aquellos con progresión o recaída.
- La QTM presenta un perfil de seguridad favorable, con muy baja incidencia de eventos adversos de tipo hematológico, renal o hepático.
- La integración de biomarcadores con datos clínicos mejora la capacidad predictiva de la respuesta a la QTM en pacientes pediátricos con tumores sólidos.

## MATERIALES Y METODOS

### Instituciones participantes

- Hospital de Pediatría “J. P. Garrahan”, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Hospital de Niños “V. J. Vilela”, Rosario, Santa Fe.
- Instituto de Genética Experimental (IGE), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe.

### Grupo de trabajo

- La selección de pacientes, su tratamiento y seguimiento clínico fueron realizados por médicos oncólogos pediatras de los Servicios de Oncología de cada hospital.
- Las decisiones terapéuticas ante interurrencias clínicas o quirúrgicas fueron tomadas por los especialistas correspondientes.
- La extracción de muestras sanguíneas fue llevada a cabo por personal técnico y de enfermería en los laboratorios de cada institución, bajo normas vigentes de bioseguridad.
- Los análisis de rutina fueron realizados por los bioquímicos de cada centro, quienes también prepararon y enviaron las muestras para los estudios específicos.
- La determinación de biomarcadores celulares y séricos, la recolección de datos clínicos, el análisis de los datos obtenidos y la interpretación de los resultados se realizó en el IGE.

### Pacientes

#### Criterios de inclusión

- Pacientes de entre 1 y 18 años, con diagnóstico oncológico, que hayan recibido tratamiento en alguna de las instituciones participantes.
- Que hubiesen completado esquemas terapéuticos estándar según edad, tipo tumoral y estadio.
- Que se encontraran en situación de recaída, progresión tumoral o con alto riesgo de recaída.
- Firma del consentimiento informado por parte del paciente y/o sus representantes legales.

#### Criterios de exclusión y/o suspensión de la QTM

- Se excluyeron pacientes con diagnóstico de neoplasias hematológicas (leucemias, linfomas, mielomas, etc.).
- Se suspendió transitoriamente la QTM en los siguientes casos:
  - Intolerancia oral a la medicación.
  - Eventos adversos moderados/severos.
  - Toxicidad grado  $\geq$  III (hematológica, renal o hepática) según CTCAE v4.0,

- Intercurrencias infecciosas, clínicas o quirúrgicas que impidieran la administración de los fármacos.
- Se suspendió definitivamente el tratamiento ante progresión o recaída comprobada (local o a distancia).

### Grupos de Pacientes

Se incluyeron dos grupos:

- **Recaídos/Refractarios:** Pacientes con enfermedad progresiva o en recaída, luego de múltiples líneas de tratamiento, en quienes la QTM se administró como opción terapéutica de última instancia.
- **Alto Riesgo:** Pacientes en remisión completa tras finalizar esquemas de quimioterapia convencional, con alto riesgo de recaída según protocolo, para quienes se indicó QTM como tratamiento de mantenimiento.

### Muestras

- Se obtuvieron muestras de sangre al inicio de la QTM y luego cada 8 semanas hasta completar el esquema terapéutico.
- Las muestras consistieron en 2 a 5mL de sangre entera en EDTA y suero, almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- El envío se realizó en contenedores SISTEG® adecuados para transporte biológico.

### Esquema de trabajo

Los pediatras oncólogos de cada institución seleccionaron a los pacientes a ser incluidos en el estudio según los criterios preestablecidos. Antes de iniciar el tratamiento, se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y/o sus representantes legales, asegurando la comprensión de los objetivos, procedimientos, riesgos y beneficios del estudio (Figura 3).

Una vez incluidos, los pacientes fueron divididos en dos grupos:

- **Recaídos/Refractarios:** pacientes con enfermedad activa, luego de haber agotado todas las instancias terapéuticas convencionales, en quienes la QTM fue considerada como último recurso terapéutico, con potencial beneficio clínico, aunque sin expectativa de curación.
- **Alto Riesgo:** pacientes en remisión completa tras completar una o dos líneas de tratamiento convencional, con indicación de continuar con QTM dada la gravedad de su enfermedad y el riesgo elevado de recaída.

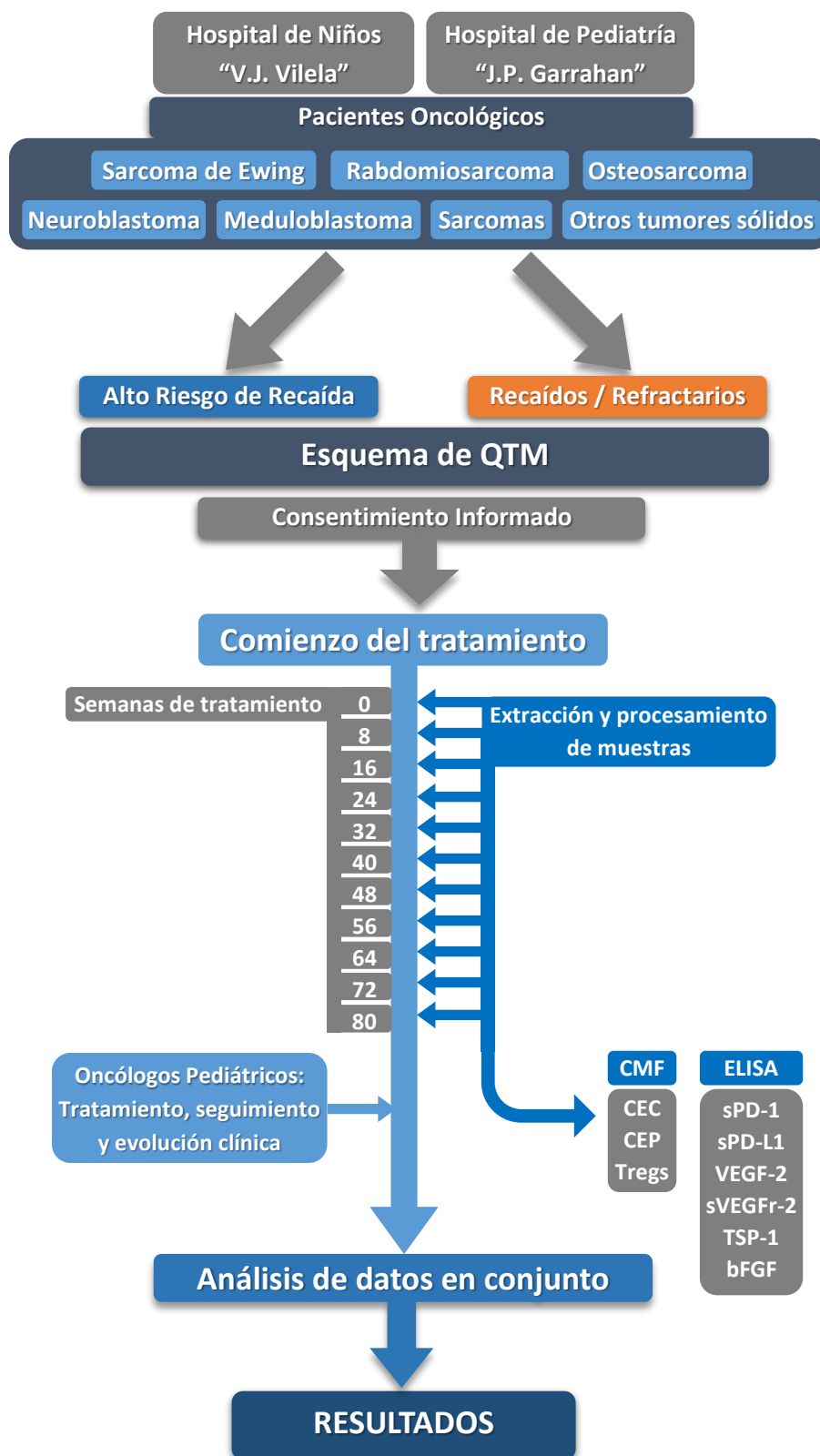
El esquema terapéutico metronómico consistió en la combinación de al menos dos fármacos, preferentemente administrados por vía oral de forma diaria y/o endovenosa de manera semanal, según tolerancia y disponibilidad.

Los pacientes fueron citados semanalmente para control clínico y de laboratorio, en el marco de los seguimientos habituales indicados por su enfermedad y tratamiento. Se evaluaron

signos de toxicidad hematológica, renal y hepática, así como otros eventos adversos relacionados o no con el tratamiento, incluyendo interurrencias infecciosas, quirúrgicas o traumatológicas. Si los valores de laboratorio y el estado clínico eran adecuados, el tratamiento continuaba. En caso de toxicidad grado  $\geq$  III (según CTCAE v4.0), se indicaba la suspensión temporal de la QTM, con reevaluación y nuevo control de laboratorio a las 48–72 horas. El tratamiento se reiniciaba una vez superado el evento adverso.

Las muestras destinadas al análisis de biomarcadores fueron recolectadas al inicio del tratamiento y luego cada 8 semanas ( $\pm 2$  semanas), hasta la finalización del esquema. La duración total del tratamiento con QTM fue variable según la patología y la evolución clínica de cada paciente, con un rango aproximado de entre 12 y 24 meses.

Además del seguimiento clínico durante el tratamiento, se recopilaron y registraron en las historias clínicas todos los datos relevantes: evolución clínica, estudios por imágenes, marcadores moleculares y celulares, resultados de biopsias y análisis de laboratorio. El seguimiento posterior se extendió hasta dos años luego de finalizado el tratamiento.



**Figura 3. Esquema general de trabajo.** Representación del diseño experimental y flujo de trabajo desde la inclusión de pacientes hasta la obtención de resultados.

## Metodología para la determinación de biomarcadores

### Citometría de Flujo

Las determinaciones de CEC, CEP y Tregs se realizaron a partir de muestras de sangre entera en EDTA, mediante citometría de flujo multiparamétrica (CMF). La adquisición y el análisis de las muestras se llevaron a cabo en un citómetro Navios EX (Beckman Coulter®) del Laboratorio CIBIC (Rosario, Santa Fe), siguiendo protocolos previamente validados.

Para la detección de CEC y CEP se utilizaron combinaciones de anticuerpos que reconocen marcadores específicos de células endoteliales y progenitoras. Las poblaciones fueron definidas como:

- **CEC:** CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD31<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>
- **CEP:** CD34<sup>++</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>/CD146<sup>+</sup>

**Tabla 3. Panel de anticuerpos y fluorocromos utilizados para la identificación de CEC y CEP mediante citometría de flujo.**

Se detallan los anticuerpos monoclonales, fluorocromos asociados, expresión diferencial en CEC y CEP, y funciones celulares correspondientes.

	Color	Nombre	Expresión en CEP	Expresión en CEC	Función
<b>CD31</b>	FITC	PECAM-1	No	Si	Adhesión, activación y migración endotelial
<b>CD133</b>	PE	Prominina-1	Si	Si	Supresión de la diferenciación celular
<b>CD45</b>	PE-CF594	LCA, PTPRC	Si	No	Regulador de señalización de linfocitos T y B, del crecimiento y diferenciación celular
<b>CD34</b>	PE-CY5	HPCA-1	Si	Si	Adhesión y marcación de progenitores hematopoyéticos
<b>CD146</b>	PE-CY7	MCAM	SI	Si	Adhesión y migración celular

Estos paneles han sido descritos y validados en diversos estudios que demostraron su utilidad en la identificación de subpoblaciones endoteliales circulantes, tanto en condiciones fisiológicas como en procesos angiogénicos asociados a cáncer (Case et al., 2007; Mund et al., 2012).

La población de **Tregs** fue definida como CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FOXP3<sup>+</sup>, conforme a criterios establecidos en la literatura especializada (Tang & Bluestone, 2008; Manjili & Butler, 2016).

**Tabla 4. Panel de anticuerpos y fluorocromos utilizados para la identificación de Tregs mediante citometría de flujo.**

Se detallan los anticuerpos monoclonales, fluorocromos asociados, expresión diferencial en Linfocitos T y B, y funciones celulares correspondientes.

	Color	Nombre	Expresión en Linfocitos T CD8	Expresión en Linfocitos B	Función
<b>CD3</b>	FITC	T3	Si	No	Traducción de señales entre linfocitos T
<b>FOXP-3</b>	PE	Scurfin-1	Si	No	Regulación de linfocitos T CD4 específicos
<b>CD45</b>	PE-CF594	LCA, PTPRC	Si	Si	Regulador de señalización de linfocitos T y B, del crecimiento y diferenciación celular
<b>CD4</b>	PE-CY5	T4	Si	No	Inicia o incrementa la activación de linfocitos T
<b>CD25</b>	Alexa Fluor647	TCGFR, IL-2Ra	Si	Si	Receptor de Interleuquina-2 (IL-2)
<b>CD8</b>	PE-CY7	T8	Si	No	Mediador de muerte por linfocitos T

Los anticuerpos utilizados provinieron de BD Pharmingen® y Miltenyi Biotec®, y la adquisición de eventos osciló entre 50.000 y 100.000 por muestra. La selección de las subpoblaciones se realizó mediante análisis de dispersión y *gating* secuencial, utilizando software para citometría.

## ELISA

Las determinaciones séricas se realizaron a partir de muestras de suero almacenadas a -20 °C. Se utilizaron kits comerciales de ELISA según protocolos de los fabricantes. Para las determinaciones de VEGF-2, TSP-1, bFGF y sVEGFR-2, se emplearon kits de R&D Systems y Quantikine®. Para SPD-1 y SPD-L1, se utilizaron kits de Invitrogen®.

## Historias Clínicas

La información clínica de los pacientes fue recolectada por los oncólogos pediatras de ambas instituciones. Se registraron en las historias clínicas (HC) los antecedentes personales, diagnóstico, tratamientos previos, complicaciones, comorbilidades, estudios complementarios y controles clínicos durante todo el seguimiento.

Los pacientes fueron evaluados antes del inicio de la QTM y luego semanalmente, desde el comienzo del tratamiento. Todos los eventos relevantes, tanto relacionados con la QTM como interurrencias ajenas al tratamiento (toxicidades, infecciones, accidentes o traumatismos), fueron detalladamente consignados en las HC.

## Análisis Estadísticos

El análisis estadístico se realizó con el objetivo de explorar la dinámica de los biomarcadores angiogénicos e inmunológicos en los pacientes pediátricos con tumores sólidos de alto riesgo tratados con QTM, considerando tanto las variaciones intraindividuales a lo largo del tiempo como las diferencias entre grupos clínicos de evolución.

Dado el tamaño muestral reducido y la ausencia de distribución normal en la mayoría de las variables (evaluada mediante pruebas de normalidad y la inspección gráfica de histogramas), se utilizaron métodos no paramétricos.

### 1. Comparaciones intragrupo (evolución longitudinal):

- Se empleó el test de Friedman para analizar cambios globales a lo largo del tratamiento.
- Cuando se identificaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Wilcoxon para comparaciones pareadas, con ajuste por comparaciones múltiples.

### 2. Comparaciones intergrupales (entre categorías clínicas):

- Para contrastar los niveles basales o finales de los biomarcadores entre los grupos, se utilizó el test de Kruskal-Wallis.
- En los casos con diferencias significativas, se realizaron comparaciones post hoc con el test de Dunn.
- En algunos biomarcadores de interés, también se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney para comparaciones específicas entre subgrupos, a fin de corroborar tendencias observadas en los análisis descriptivos.

### 3. Análisis de correlación:

- Se calcularon coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de biomarcadores y el tiempo de tratamiento, para explorar asociaciones lineales no paramétricas y posibles tendencias dinámicas.

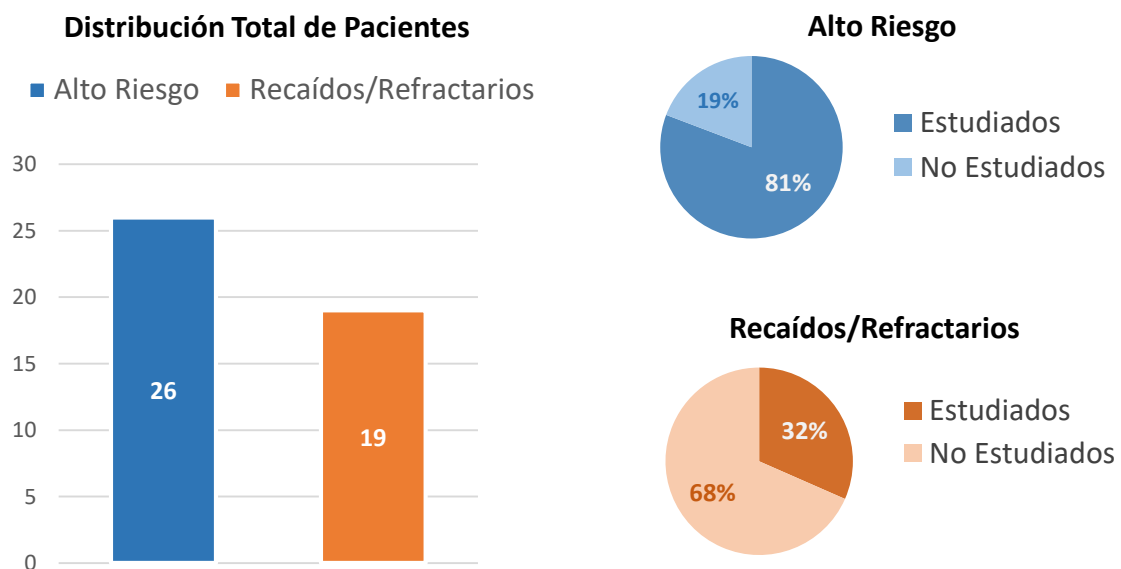
### 4. Análisis exploratorios adicionales:

- Para los biomarcadores séricos con menor número de determinaciones (VEGF-2, sVEGFR-2, TSP-1, bFGF), se aplicó un ANOVA de dos vías no paramétrico y pruebas de correlación, reconociendo su carácter exploratorio por el reducido tamaño muestral.

Los resultados se expresaron como medianas e intervalos intercuartílicos (IQR). Se consideró un valor de  $P < 0.05$  como estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron utilizando software estadístico validado (GraphPad Prism, versión 10).

## RESULTADOS

Los pacientes incorporados se dividieron en dos grupos según su condición al ingreso. El primer grupo, denominado de ALTO RIESGO, estuvo compuesto por 26 pacientes, mientras que el segundo grupo, identificado como RECAÍDOS/REFRACTARIOS, incluyó a 19 pacientes. Del grupo de ALTO RIESGO, 5 pacientes no pudieron ser estudiados, y del grupo de RECAÍDOS/REFRACTARIOS, 13 pacientes quedaron excluidos del análisis. Los motivos de estas exclusiones se detallarán más adelante en el estudio. Esta clasificación inicial es fundamental para la evaluación comparativa de las condiciones y resultados observados en ambos grupos durante el período de investigación (Figura 4).



**Figura 4. Distribución de pacientes incluidos según grupo clínico y condición de estudio.** Visualización de la distribución total de pacientes al ingreso (Alto Riesgo y Recaídos/Refractarios) y proporción de estudiados vs. no estudiados en cada grupo.

## RECAÍDOS/REFRACTARIOS

Este grupo comprende a aquellos pacientes con diversos tumores quienes, tras recibir los esquemas de quimioterapia convencional protocolizados por enfermedad y estadio, no lograron la remisión completa y/o recayeron en su enfermedad y tras haber agotado esquemas de tratamiento convencional, se les administró un esquema metronómico de fármacos quimioterapéuticos (Tabla 5).

Cabe destacar que tanto la obtención de muestras como el análisis posterior de los datos se vieron significativamente limitados por el estado clínico de los pacientes, quienes en su mayoría se encontraban cursando fases avanzadas o terminales de la enfermedad. Esta condición afectó la posibilidad de completar el seguimiento previsto, lo que derivó en la imposibilidad, en todos los casos, de analizar todos los biomarcadores, debido a la ausencia o insuficiencia de muestras biológicas.

**Tabla 5. Características clínicas de los pacientes con recaída o refractariedad.**

Datos individuales de los pacientes incluidos en este grupo y su evolución bajo tratamiento metronómico. Se destaca en color verde al único paciente con remisión completa.

Paciente	Diagnóstico	Metástasis	Estadio al inicio	QTM	Evolución final	Tiempo (Semanas)
1_SEw	Sarcoma de Ewing/PNET abdominal	Hepáticas, ganglionar, Renal, pulmonares y MO	Progresión	VP	Progresión	16,57
2_EA	Ependimoma Anaplásico	-	Recaída	MEMMAT	Progresión	2,29
3_NB	Neuroblastoma abdominal de alto riesgo, refractario	-	Progresión	VP	Progresión	9
4_OS	Osteosarcoma sacro, localizado, irresecable	-	Enfermedad estable	VP	Progresión	21,14
5_EA	Ependimoma Anaplásico	-	Progresión	MEMMAT	Progresión	5,14
6_RMS	Rabdomiosarcoma alveolar perineal	Ganglionar	Enfermedad estable	CFM + VNR	Progresión	33,14
7_GNB	Ganglio - neuroblastoma nodular clásico torácico	Huesos y MO	Enfermedad estable	VP	Progresión	151,86
8_RMS	Rabdomiosarcoma alveolar retroperitoneal	Medula ósea y Hueso orbita izq.	Progresión Local	CFM + VNR	Progresión	4,57

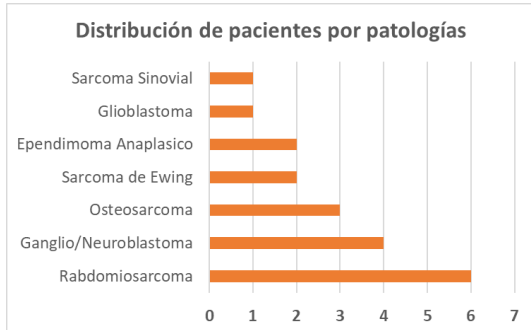
9_OS	Osteosarcoma de fémur distal derecho, recaída pulmonar	Pulmonares y Pleurales	Progresión Metastásica	VP	Progresión	6,86
10_RMS	Rabdomiosarcoma embrionario fusocelular en vagina	Ganglionar local	Recaída (segunda) loco-rregional	CFM + VNR	Remisión	191,14
11_RMS	Rabdomiosarcoma alveolar pélvico	Ganglionar	Recaída	CFM + VNR	Progresión	15,57
12_NB	Neuroblastoma cervical metastásico	MO, óseo múltiple y ganglionar cervical	Enfermedad estable	CFM + VNR, luego: VP	Progresión	57
13_RMS	Rabdomiosarcoma alveolar torácico izquierdo	MO y esternal	Progresión	VP	Progresión	3
14_GBM	Glioblastoma Multiforme	-	Progresión	MEMMAT	Progresión	15,14
15_OS	Osteosarcoma tibial derecha	-	Progresión	VP	Progresión	9,29
16_NB	Neuroblastoma abdominal de alto riesgo, refractario	Óseas múltiples, MO	Progresión	VP	Progresión	5,14
17_SEw	Sarcoma de Ewing de hueso ilíaco derecho con compromiso de partes blandas	Óseas múltiples y MO	Buena respuesta parcial	CFM + VBL	Progresión	9,3
18_RMS	RMS embrionario con anaplasia focal de vejiga/próstata	Pulmonares	Refractario	CFM + VNR	Recaída local	18,14
19_SaS	Sarcoma Sinovial escapula	Pulmonares	Refractario	CFM + VNR	Progresión	37,71

## ESQUEMAS ADMINISTRADOS

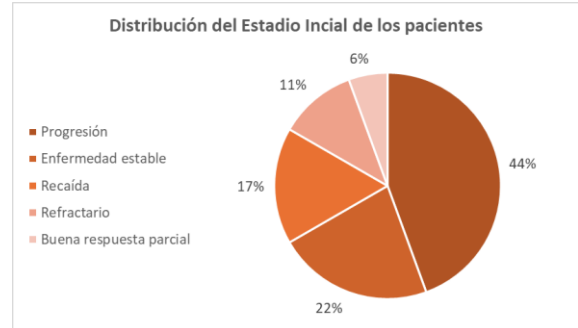
- **VP:** Etopósido 50mg/m<sup>2</sup>/día, vía oral; ciclos de 21 días más 7 días de descanso.
- **CFM + VNR:** Ciclofosfamida 25mg/m<sup>2</sup>/dosis (25-50mg), vía oral, diario, en ciclos de 28 días. Más, Vinorelbine 25mg/m<sup>2</sup>/dosis EV semanal, los días 1,8,15, luego descanso por 7 días.
- **CFM + VBL:** Ciclofosfamida 25mg/m<sup>2</sup>/dosis (25-50mg), vía oral, diario, en ciclos de 28 días; en algunos casos se redujo la dosis al 50% los fines de semana. Más, Vinblastina 3mg/m<sup>2</sup>/dosis EV *push*, semanal, en ciclos de 28 días.
- **MEMMAT:** Talidomida 3mg/kg/día; Celecoxib 50-400mg/dosis, dos veces por día; Fenofibrato 90mg/m<sup>2</sup>/día; vía oral, diario, sin descanso. Etopósido 35-50mg/m<sup>2</sup>/día, Ciclofosfamida 2,5mg/kg/día ( $\leq 100$ mg/día) por 21 días, ciclos alternantes con descanso de 7 días. Bevacizumab 10mg/kg, endovenoso, cada 2 semanas. (Peyrl et al. 2016).

## EVOLUCIÓN CLÍNICA

Este grupo está compuesto por 19 pacientes, de los cuales 10 fueron niñas y 9 varones, con un rango etario entre los 2 y 16 años. Se muestran a continuación en las Figuras 5A y 5B la distribución de pacientes por patologías y por estadio previo al inicio de la QTM:



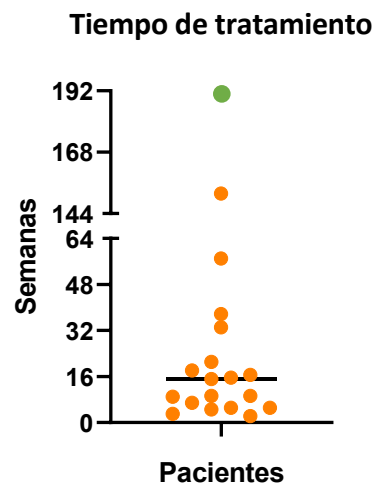
**Figura 5A. Distribución de pacientes según diagnóstico.**  
Cantidad de pacientes según tipo de tumor.



**Figura 5B. Distribución del estadio inicial al ingreso.**  
Clasificación de los pacientes según su condición clínica al inicio de la QTM.

**Tabla 6. Evolución clínica de los 19 pacientes evaluados**

Clasificación	n pacientes
Progresión antes de 8 semanas	6
Progresión entre 8 y 16 semanas	6
Sin evaluación por falta de muestras	1
Seguimiento completo con biomarcadores	6
Buena evolución (>190 semanas sin recaída)	1
Progresión entre 18 y 151 semanas	5



**Figura 5C. Tiempo de tratamiento individual.**  
Duración del tratamiento hasta progresión o última evaluación. Se destaca en verde un paciente con evolución clínica favorable.

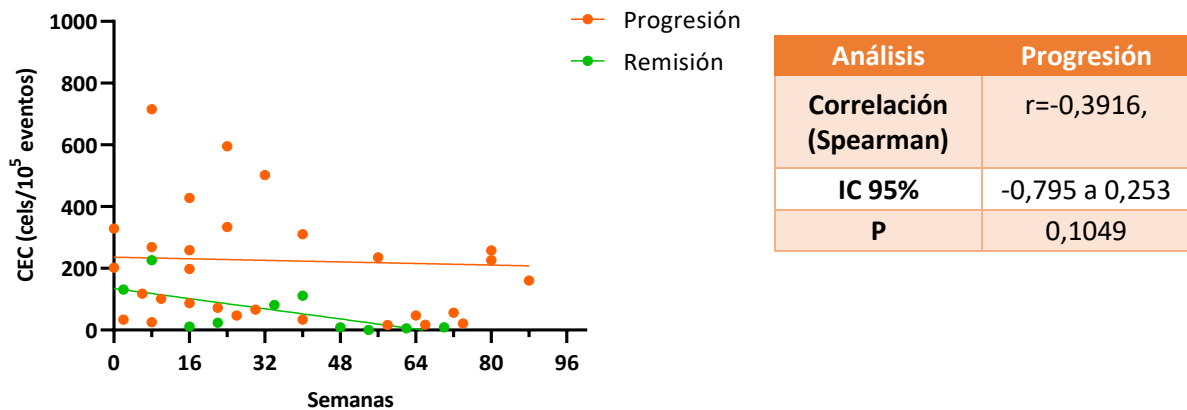
## ANÁLISIS DE BIOMARCADORES

El análisis de los biomarcadores estudiados en este grupo, se realizó con un enfoque no paramétrico, adecuado a las características de la muestra y la naturaleza de los datos. En particular, los tamaños de muestra desiguales entre los grupos clínicos representan una limitación importante, un único paciente que alcanzó remisión completa frente a cinco pacientes con recaída o progresión tumoral. Este desbalance impide cualquier comparación estadística válida y podría introducir sesgos interpretativos si se forzaran análisis entre subconjuntos tan dispares.

Por esta razón, el presente análisis se focaliza exclusivamente en los pacientes con evolución desfavorable (recaída o progresión), a fin de explorar patrones comunes en los niveles de biomarcadores a lo largo del tratamiento metronómico. El uso de herramientas estadísticas no paramétricas, como la correlación de Spearman, fue seleccionado por su robustez frente a distribuciones no normales y tamaños de muestra pequeños. Esta técnica permite explorar relaciones potenciales entre los niveles de biomarcadores y el tiempo de tratamiento, incluso en cohortes con bajo número de casos.

El único paciente que logró remisión clínica fue representado en las figuras como caso individual, pero no fue incluido en los análisis estadísticos comparativos, ya que un único caso no constituye una unidad válida para contrastes inferenciales. Su inclusión visual tiene por objetivo documentar la existencia de dicho desenlace dentro del grupo con evolución desfavorable, sin derivar de ello conclusiones cuantitativas.

## Células Endoteliales Circulantes

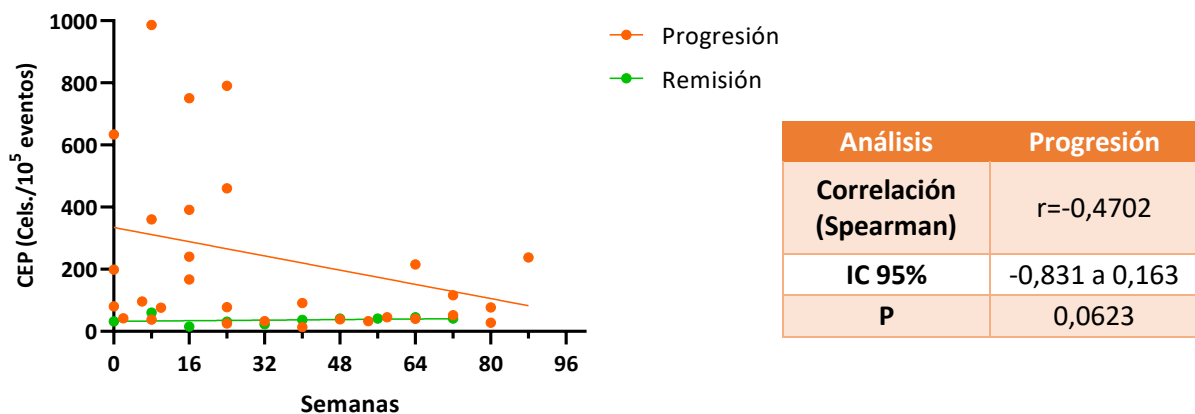


**Figura 6. Evolución de CEC según desenlace clínico.**

Se muestra la correlación de Spearman entre semanas de tratamiento y niveles de CEC. El paciente en remisión se incluye como caso individual (punto verde), sin ser parte del análisis.

La correlación entre los niveles de CEC y el tiempo de tratamiento en pacientes con progresión mostró una tendencia a la disminución, aunque no alcanzó significancia estadística (Spearman  $r=-0,3916$ ,  $P=0,1049$ ) (Figura 6).

## Células Endoteliales Progenitoras

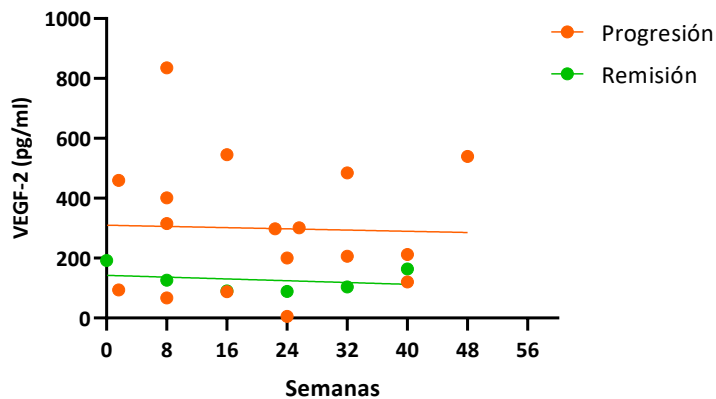


**Figura 7. Evolución de CEP según desenlace clínico.**

Se muestra la correlación de Spearman entre semanas de tratamiento y niveles de CEP. El paciente en remisión se incluye como caso individual (punto verde), sin ser parte del análisis.

La correlación entre los niveles de CEP y el tiempo de tratamiento en pacientes con progresión mostró una tendencia a la disminución, aunque no alcanzó significancia estadística (Spearman  $r=-0,4702$ ,  $P=0,0623$ ) (Figura 7).

## VEGF-2



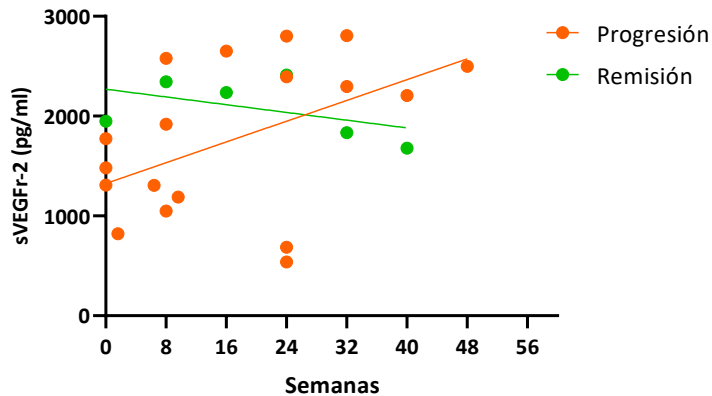
Análisis	Progresión
Correlación (Spearman)	r=0,1071, n=7
IC 95%	-
P	0,4198

**Figura 8. Evolución de VEGF-2 según desenlace clínico.**

Se muestra la correlación de Spearman entre semanas de tratamiento y niveles de VEGF-2. El paciente en remisión se incluye como caso individual (punto verde), sin ser parte del análisis.

La correlación entre los niveles de VEGF-2 y el tiempo de tratamiento en pacientes con progresión no mostró significancia estadística (Spearman  $r=0,1071$ ,  $P=0,4198$ ) (Figura 8).

## sVEGFr-2



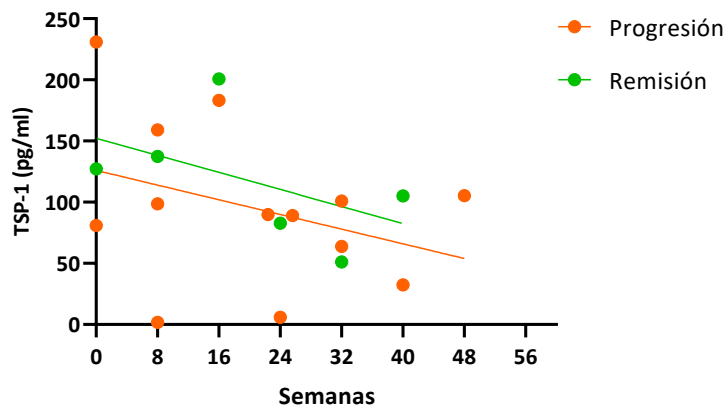
Análisis	Progresión
Correlación (Spearman)	r=0,4643
IC 95%	-
P	0,1512

**Figura 9. Evolución de sVEGFr-2 según desenlace clínico.**

Se muestra la correlación de Spearman entre semanas de tratamiento y niveles de sVEGFr-2. El paciente en remisión se incluye como caso individual (punto verde), sin ser parte del análisis.

El análisis de correlación no mostró relaciones significativas entre los niveles de sVEGFr-2 y las semanas de tratamiento (Progresión:  $r=0,4643$ ,  $P=0,1512$ ) (Figura 9).

## TSP-1



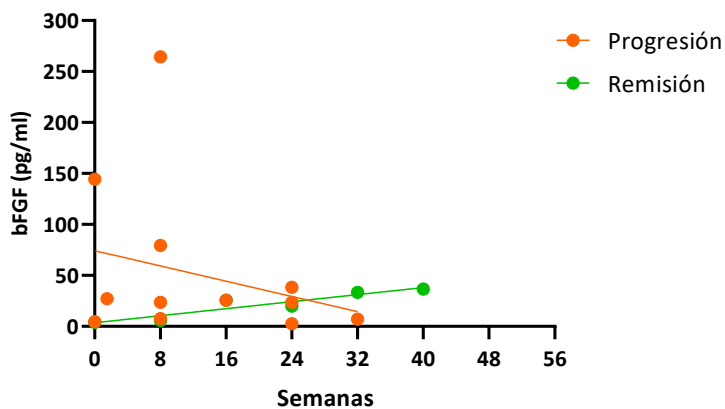
Análisis	Progresión
Correlación (Spearman)	$r=-0,4643$
IC 95%	-
P	0,1512

**Figura 10, Evolución de TSP-1 según desenlace clínico.**

Se muestra la correlación de Spearman entre semanas de tratamiento y niveles de TSP-1. El paciente en remisión se incluye como caso individual (punto verde), sin ser parte del análisis.

El análisis de correlación no mostró relaciones significativas entre los niveles de TSP-1 y las semanas de tratamiento ( $r=-0,4643$ ,  $P=0,1512$ ) (Figura 10).

## bFGF



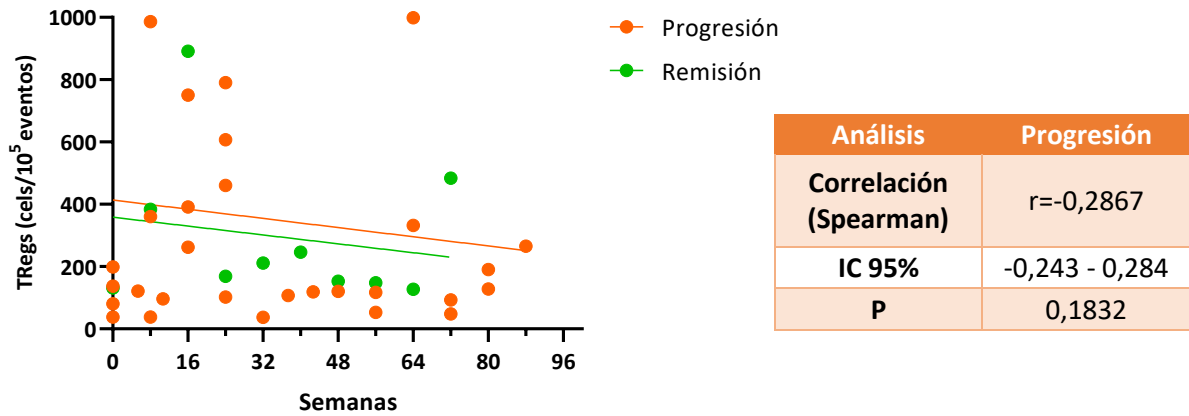
Análisis	Progresión
Correlación (Spearman)	$r=-0,9000$
IC 95%	-
P	0,0417

**Figura 11. Evolución de bFGF según desenlace clínico.**

Se muestra la correlación de Spearman entre semanas de tratamiento y niveles de bFGF. El paciente en remisión se incluye como caso individual (punto verde), sin ser parte del análisis.

En Progresión, se observó una correlación negativa significativa con las semanas ( $r=-0,9000$ ,  $P=0,0417$ ) (Figura 11).

## Linfocitos T Reguladores

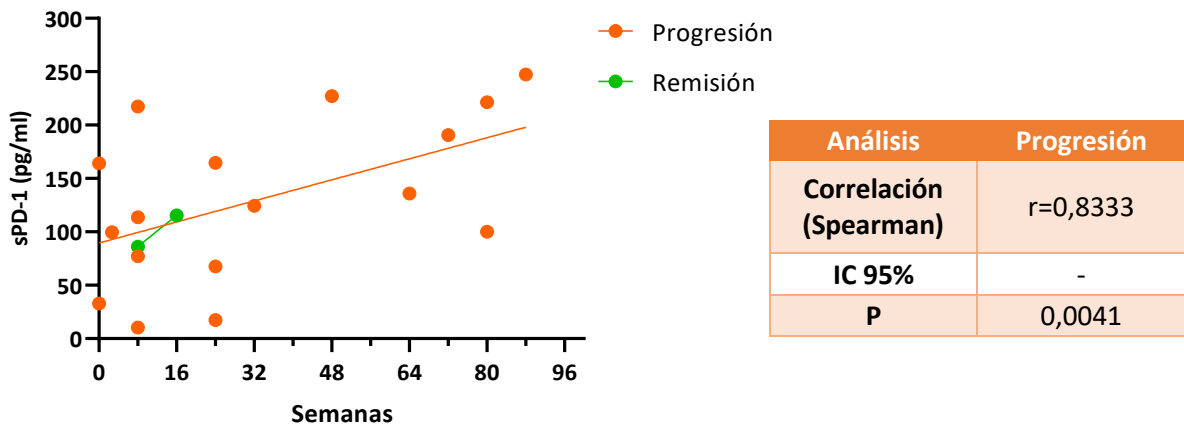


**Figura 12. Evolución de Tregs según desenlace clínico.**

Se muestra la correlación de Spearman entre semanas de tratamiento y niveles de Tregs. El paciente en remisión se incluye como caso individual (punto verde), sin ser parte del análisis.

La correlación entre los niveles de Tregs y el tiempo de tratamiento en pacientes con progresión no mostró significancia estadística (Spearman  $r=-0,2867$ ,  $P=0,1832$ ) (Figura 14).

## sPD-1

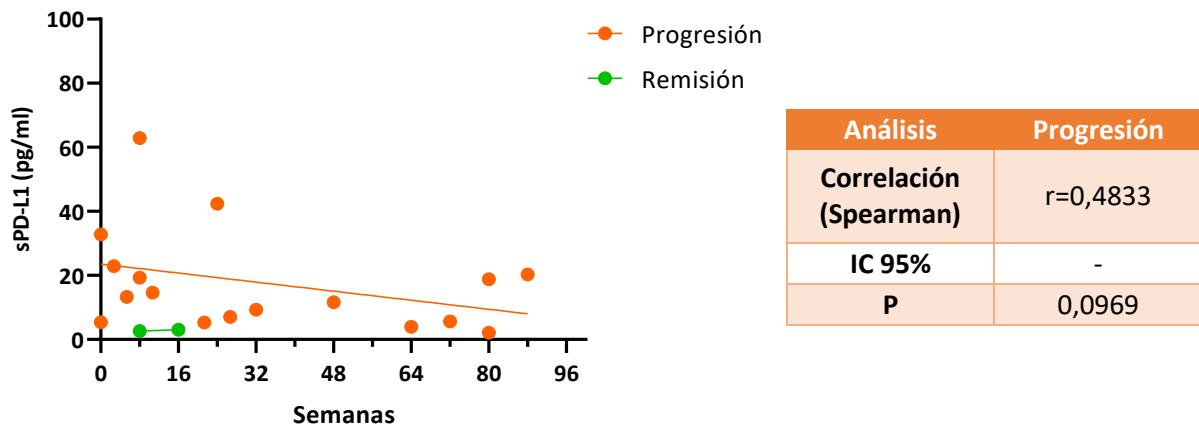


**Figura 13. Evolución de sPD-1 según desenlace clínico.**

Se muestra la correlación de Spearman entre semanas de tratamiento y niveles de sPD-1. El paciente en remisión se incluye como caso individual (punto verde), sin ser parte del análisis.

El análisis de correlación para el grupo de Progresión mostró una relación positiva significativa entre los niveles de sPD-1 y las semanas de tratamiento ( $r=0,8333$ ,  $P=0,0041$ ) (Figura 12).

## sPD-L1



**Figura 14. Evolución de sPD-L1 según desenlace clínico.**

Se muestra la correlación de Spearman entre semanas de tratamiento y niveles de sPD-L1. El paciente en remisión se incluye como caso individual (punto verde), sin ser parte del análisis.

El análisis de correlación para el grupo de Progresión no mostró una relación significativa entre los niveles de sPD-L1 y las semanas de tratamiento ( $r=-0,4833$ ,  $P=0,0969$ ) (Figura 13).

## DISCUSIÓN DE BIOMARCADORES EN PACIENTES RECAÍDOS/REFRACTARIOS

Los resultados obtenidos en este grupo de pacientes con enfermedad refractaria o recaída temprana destacaron la complejidad de estudiar biomarcadores en escenarios clínicos avanzados. Las condiciones sistémicas comprometidas y la elevada carga tumoral en estos pacientes representaron un desafío tanto para la obtención de muestras consistentes como para la interpretación precisa de los hallazgos.

A pesar de estas restricciones, los biomarcadores evaluados (CEC, CEP, VEGF-2, sVEGFR-2, TSP-1, bFGF, sPD-1, sPD-L1 y Tregs) ofrecen una ventana valiosa para caracterizar el comportamiento inmunológico y angiogénico en pacientes pediátricos con evolución desfavorable bajo quimioterapia metronómica. Los hallazgos obtenidos constituyen una base exploratoria que podría orientar futuras investigaciones sobre el monitoreo dinámico, la estratificación de riesgo y la predicción de desenlaces terapéuticos en contextos clínicos de alta complejidad.

### **Biomarcadores relacionados con angiogénesis**

El análisis de CEC y CEP (Figuras 6 y 7) evidenció una tendencia a la disminución a lo largo del tratamiento, aunque sin alcanzar significancia estadística. Estos marcadores, relacionados con la actividad angiogénica, podrían reflejar cambios dinámicos en la vasculatura tumoral bajo presión terapéutica; sin embargo, la heterogeneidad clínica y biológica del grupo limita una interpretación concluyente.

Respecto a VEGF-2 y sVEGFR-2 (Figuras 8 y 9), no se observaron correlaciones estadísticamente significativas con el tiempo de tratamiento. Aunque no fue posible determinar de forma concluyente la presencia de niveles persistentemente elevados de estos biomarcadores en los pacientes con recaída o refractariedad, la literatura ha vinculado la persistencia de VEGF-2 con un mal pronóstico en diversos tumores sólidos, incluyendo el carcinoma renal (Vasudev y Reynolds, 2014). Estos antecedentes sugieren que este fenómeno podría ser relevante y merece ser explorado en futuras investigaciones específicamente orientadas a evaluar estas asociaciones.

En cuanto a TSP-1 (Figura 10), no se evidenciaron correlaciones consistentes con el tiempo ni un patrón homogéneo en su comportamiento. Esta falta de regularidad podría estar relacionada con la elevada variabilidad interindividual observada en la cohorte y con el compromiso sistémico generalizado de los pacientes, factores que pueden haber enmascarado relaciones biológicas más específicas. En contraste, la concentración sérica de bFGF (Figura 11) mostró una disminución significativa a lo largo del tratamiento metronómico. Este descenso observado contrasta con lo descrito en la literatura (Ardizzone et al., 2023) y, dado el escaso número de determinaciones disponibles, no permite establecer conclusiones sólidas sobre su implicancia clínica.

## **Biomarcadores inmunológicos**

En relación con los biomarcadores inmunológicos, los Tregs (Figura 14) no mostraron un patrón de comportamiento que permita explicar la falta de respuesta de estos pacientes al esquema terapéutico administrado, lo que refuerza la complejidad de la modulación inmunológica en este contexto clínico.

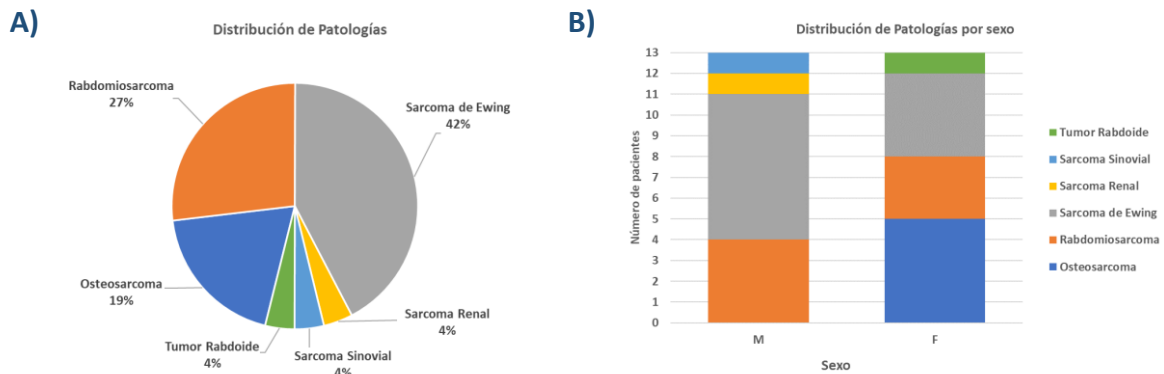
Por su parte, sPD-1 y sPD-L1 (Figuras 13 y 14) mostraron patrones divergentes: sPD-1 presentó una correlación positiva significativa con el tiempo de tratamiento, mientras que sPD-L1 no evidenció una relación clara. Este comportamiento podría reflejar una activación inmune desregulada o inefectiva, con mecanismos reguladores desincronizados, como se ha propuesto en tumores sólidos e infecciones crónicas. Se ha sugerido que el aumento de sPD-1 refleja un estado de agotamiento funcional de los linfocitos T citotóxicos (Gabrych et al., 2019), mientras que la disminución sostenida de sPD-L1 podría indicar una reducción de las señales inmunosupresoras en el microambiente tumoral. Este desequilibrio ha sido observado en modelos pediátricos con inmunidad alterada (Toledo et al., 2023).

La interpretación de estos resultados debe realizarse con cautela, debido a la limitada cantidad de datos disponibles, el tamaño reducido de la muestra y la falta de un grupo control adecuado. No obstante, este análisis exploratorio aporta información relevante sobre las dinámicas biológicas en pacientes con recaída o refractariedad, sirviendo como punto de referencia para contrastar perfiles biológicos con otros grupos clínicamente diferenciados, como el de pacientes de Alto Riesgo, cuyos resultados se presentan a continuación.

## ALTO RIESGO

En este estudio se incluyeron 26 pacientes pediátricos con diagnóstico de sarcomas y tumores sólidos malignos clasificados como de Alto Riesgo. La distribución por sexo fue equitativa, con 13 varones y 13 mujeres. La edad al momento del ingreso mostró una amplia variabilidad, con un rango que fue desde los 2,3 hasta los 18 años.

Los diagnósticos más frecuentes correspondieron a Sarcoma de Ewing, Sarcoma Sinovial, Osteosarcoma, Tumor Rabdoide, Rabdomiosarcoma Alveolar y Sarcoma Renal Anaplásico (Figura 15).



**Figura 15. Distribución porcentual de los tipos tumorales en el grupo de Alto Riesgo.**  
**A)** Distribución general de las patologías más frecuentes en los 26 pacientes del grupo de Alto Riesgo.  
**B)** Distribución de patologías según el sexo (masculino y femenino).

Las localizaciones tumorales fueron diversas, incluyendo huesos largos como fémur y tibia, vértebras, costillas, sacro, región nasal y retroperitoneal, entre otras.

Los pacientes fueron tratados con distintos protocolos de quimioterapia, destacando COG AEWS07P1 (Mascarenhas, 2016), GALOP 2011, GATLO 2006 y EPSSG RMS2005. La mayoría de los pacientes (20 de 26) recibió tratamiento quirúrgico y 17 de 26 fueron sometidos a radioterapia. La quimioterapia se administró mayoritariamente en una sola línea, aunque algunos casos requirieron dos líneas debido a recaídas tempranas, con remisión completa posterior.

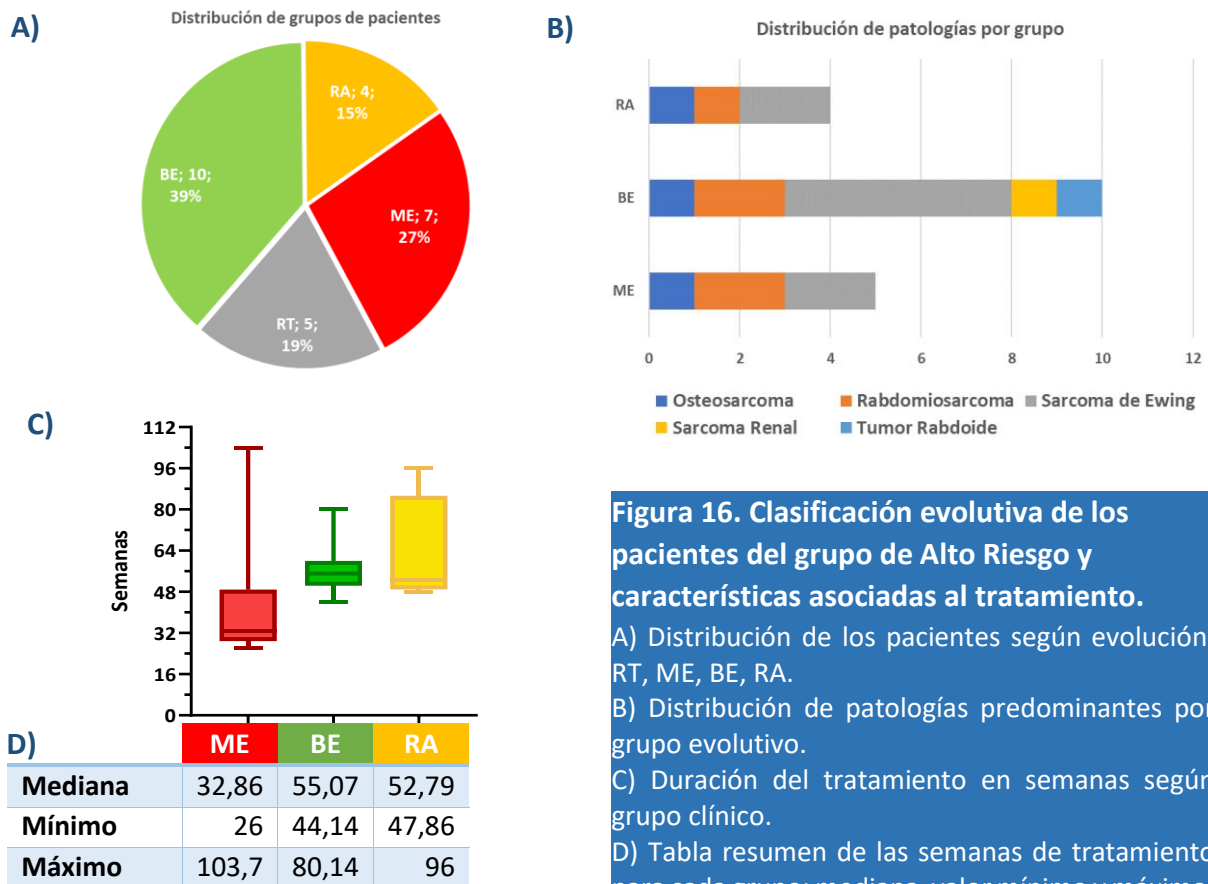
Los esquemas de quimioterapia incluyeron diferentes combinaciones de Ciclofosfamida (CFM), Vinblastina (VBL), Vinorelbine (VNR) y Metotrexato (MTX) las que se detallan a continuación:

- **Sarcoma de Ewing:** Ciclofosfamida 25mg/m<sup>2</sup>/dosis (25-50mg), vía oral, diario, en ciclos de 28 días; en algunos casos se redujo la dosis al 50% los fines de semana. Más, Vinblastina 3mg/m<sup>2</sup>/dosis EV *push*, semanal, en ciclos de 28 días. En algunos casos se redujo la dosis hasta un 25% según toxicidad.
- **Rabdomiosarcoma, Sarcoma Renal y Tumor Rabdoide:** Ciclofosfamida 25mg/m<sup>2</sup>/dosis (25-50mg), vía oral, diario, en ciclos de 28 días; en algunos casos se aumentó la dosis 50%

los fines de semana. Más, Vinorelbine 25mg/m<sup>2</sup>/dosis EV semanal, los días 1,8,15, luego descanso por 7 días.

- **Osteosarcoma:** Ciclofosfamida 25mg/m<sup>2</sup>/dosis (25-50mg), vía oral, diario, en ciclos de 28 días; en algunos casos se aumentó la dosis 50% los fines de semana. Más, Metotrexato 3mg/m<sup>2</sup>/día, vía oral, cada 12hs, 2 veces por semana (lunes y jueves).

De los 26 pacientes incluidos en el estudio, cinco (5) no pudieron ser evaluados debido a la suspensión de la QTM por una Recaída Temprana (RT) detectada en la primera evaluación trimestral de la enfermedad. Los 21 pacientes restantes continuaron con el tratamiento: siete (7) de ellos presentaron recaída durante la QTM, conformando el grupo de "Mala Evolución" (ME). Los catorce (14) pacientes restantes completaron exitosamente la QTM, con una duración promedio de tratamiento de 58,3 semanas (rango: 44,1–96 semanas) (Figura 16). Tras un seguimiento de dos años post-tratamiento, se observó recaída de la enfermedad en cuatro (4) de esos 14 pacientes, ocurrida después de más de seis meses de finalizada la QTM. Estos conformaron el grupo de "Recaída Alejada" (RA). Los diez (10) pacientes que no presentaron recaída oncológica durante el seguimiento conformaron el grupo de "Buena Evolución" (BE). Esta clasificación permitió estratificar a los pacientes según su respuesta al tratamiento y su evolución clínica a mediano plazo, proporcionando información valiosa sobre la eficacia de la QTM en esta cohorte. En el caso de los biomarcadores séricos evaluados en este grupo, se aplicaron consideraciones específicas para su agrupamiento, las cuales se describen en detalle en la sección de Resultados correspondiente.



**Figura 16. Clasificación evolutiva de los pacientes del grupo de Alto Riesgo y características asociadas al tratamiento.**  
 A) Distribución de los pacientes según evolución: RT, ME, BE, RA.  
 B) Distribución de patologías predominantes por grupo evolutivo.  
 C) Duración del tratamiento en semanas según grupo clínico.  
 D) Tabla resumen de las semanas de tratamiento para cada grupo: mediana, valor mínimo y máximo.

## Pacientes del grupo Alto Riesgo

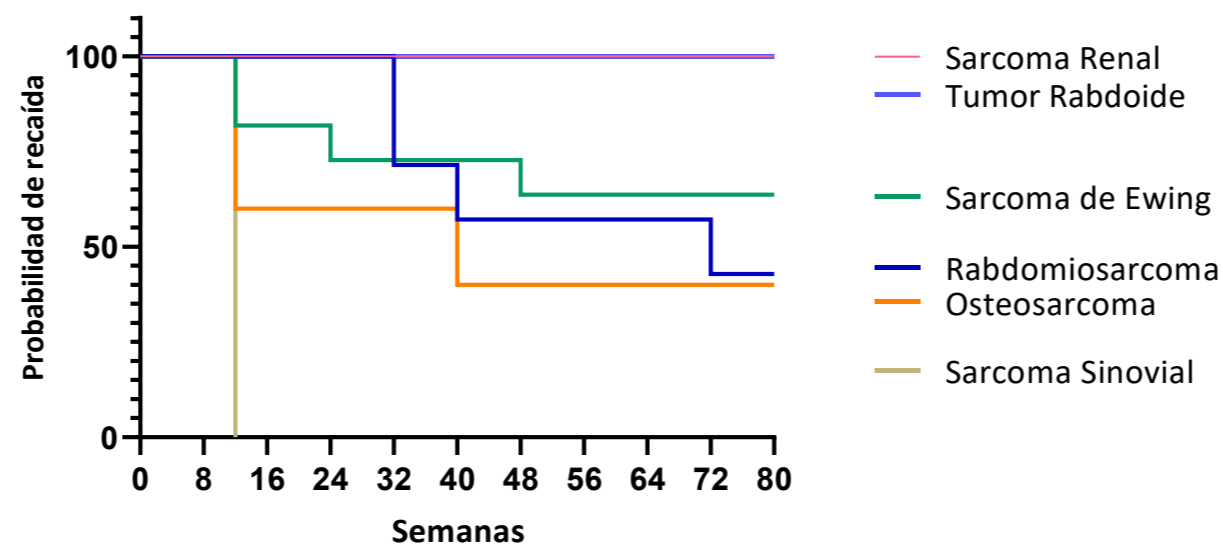
**Tabla 7. Características clínicas, tratamientos y evolución de los pacientes del grupo de Alto Riesgo.**

Se incluyen datos clínicos, esquemas terapéuticos aplicados, evolución final y complicaciones relacionadas a la QTM.

Paciente	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico	Localización	Metástasis	Protocolo QTC	Cirugía	Radio-terapia	Condición previa QTM	Esquema de QTM	Evolución final	Complicaciones durante QTM	Semanas de QTM	Días de QTM suspendida
1_SEw_ME	13,6	M	Sarcoma de Ewing	11a costilla izquierda	-	COG AEWSOP2P1	Si	Si	Remisión Completa	CFM + VBL	Recaída Local. Mala Evolución	Neutropenia G III y IV	28,86	29
2_SaS	8	M	Sarcoma Sinovial	Rodilla derecha	-	-	Si	-	Remisión Completa	Recaída Temprana <4 meses de QTM				
3_OS	7	F	Osteosarcoma Osteoblástico	Fémur derecho	-	-	Si	-	Remisión Completa	Recaída Temprana <4 meses de QTM				
4_SEw	18	M	Sarcoma de Ewing	Fémur izquierdo	-	COG AEWS0031	Si	Si	Remisión Completa	Recaída Temprana <4 meses de QTM				
5_SEw_RA	12,7	F	Sarcoma de Ewing	Óseo Retroperitoneal	-	GALOP 2011	Si	Si	Remisión Completa	CFM + VBL	Recaída Alejada. LMA 2ª a quimioterapia	Anemia G IV, Neutropenia G IV	52,29	67
6_OS	12,2	F	Osteosarcoma convencional	Tibia derecha	Pulmonar	GATLO 2006	Si	-	Remisión Completa	Recaída Temprana <4 meses de QTM				
7_SEw	16,6	M	Sarcoma de Ewing	Costal derecho	Pleural	GALOP 2011	Si	-	Remisión Completa	Recaída Temprana <4 meses de QTM				
8_Trab_BE	4,5	F	Tumor Rabdoide	Cervical, C6-T1	-	EPSSG NRSTS2005	Si	Si	Remisión Completa	CFM + VNR	Remisión Completa. Buena Evolución	Tox. Hemato. G III y IV, IRAB, ITU	44,14	92
9_SEw_BE	11,7	F	Sarcoma de Ewing	Sacro	Pulmonar	GALOP 2011	No	Si	Remisión con residuo tumoral. Remisión completa metastásica	CFM + VBL	Remisión Completa. Buena Evolución	Neutropenia G III, ITU	58	39
10_RMS_BE	13,9	F	Rabdomiosarcoma alveolar	Maxilar - masetero izquierdo	-	EPSSG RMS2005	No	Si	Remisión Completa	CFM + VNR	Remisión Completa. Buena Evolución	Neutropenia G III	56,14	7
11_SEw_BE	16	M	Sarcoma de Ewing	Vertebral, Lumbar 2	Pulmonar	GALOP 2011	No	Si	Remisión Completa	CFM + VBL	Remisión Completa. Buena Evolución	Neutropenia G III	53,29	7
12_SEw_ME	6,2	M	Sarcoma de Ewing	Tibia proximal derecha	-	GALOP 2011	Si	Si	Remisión Completa	CFM + VBL	Recaída local. Mala evolución	-	48,86	0
13_OS_BE	14,7	F	Osteosarcoma	Fémur distal derecho	-	GATLO 2006	Si	No	Remisión Completa	CFM + MTX	Remisión Completa. Buena Evolución	-	80,14	0
14_SEw_BE	13,1	M	Sarcoma de Ewing	Vertebral, Lumbar 5	-	GALOP 2011	No	si	Remisión Completa	CFM + VBL	Remisión Completa. Buena Evolución	-	47,86	0
15_SEw_BE	14,6	F	Sarcoma de Ewing	Nasal	-	GALOP 2011	No	Si	Remisión Completa	CFM + VBL	Remisión Completa. Buena Evolución	Neutropenia G IV, Herpes labio nasal, OEA maligna	54,14	25
16_OS_RA	11	F	Osteosarcoma	Fémur distal izquierdo	-	GATLO 2006	Si	No	Remisión Completa	CFM + MTX	Recaída Alejada. Pulmonar y ósea.	-	53,29	0
17_Sew_RA	5,7	M	Sarcoma de Ewing	Femoral izquierdo	-	GALOP 2011	Si	No	Remisión Completa	CFM + VBL	Recaída Alejada. Pulmonar, PCR en SP+	Neutropenia G III	47,86	21
18_RMS_ME	6,5	F	Rabdomiosarcoma alveolar	Antebrazo izquierdo	Ganglionar Axilar	EPSSG RMS2005	Si	Si	Remisión Completa	CFM + VNR	Recaída Local. Mala Evolución.	Neutropenia G III	103,7	7

19_OS_ME	13,6	F	Osteosarcoma	Fémur derecho	Pulmonar	GATLO 2006, ICE, Gemcitabina + Docetaxel	Si	No	Remisión Completa	CFM + MTX	Progresión Local, Recaída pulmonar. Mala Evolución.	Toxicidad Hepática G III	46,14	7
20_RMS_BE	11,2	M	Rabdomiosarcoma alveolar	Pantorrilla Derecha	Ganglionar y Óseo	EPSSG RMS2005	Si	Si	Remisión Completa	CFM + VNR	Recaída Alejada Local	Neutropenia G III y IV	96	14
21_RMS_BE	5,2	M	Rabdomiosarcoma alveolar	Pierna izquierda	Ganglionar y Óseo	EPSSG RMS2005	Si	Si	Remisión Completa	CFM + VNR	Remisión Completa. Buena Evolución	Neutropenia G III	66	21
22_SaR_BE	5	M	Sarcoma Renal Anaplásico	Riñón Izquierdo	Óseas (femoral, vertebral, temporal, supraorbitaria) y MO	EpSSG 2005	Si	Si	Remisión Completa	CFM + VNR	Remisión Completa. Buena Evolución	Neutropenia G III y IV	56	49
23_SEw_BE	15,6	F	Sarcoma de Ewing	Escapula Derecha	-	GALOP 2011	Si	Si	Remisión Completa	CFM + VBL	Remisión Completa. Buena Evolución	Neutropenia G III	51,29	65
24_RMS_BE	14,5	F	Rabdomiosarcoma alveolar	Mama derecha	Pleural, Ganglionar y MO	EPSSG RMS2005	No	Si	Remisión Completa	CFM + VNR	Recaída metastásica. Mala Evolución.	Neutropenia G III, Leucopenia G III, Neumonitis actínica	29,14	27
25_RMS_ME	2,7	M	Rabdomiosarcoma embrionario	Perineal	Ósea, ganglionar y MO	EPSSG mRMS2005	Si	Si	Enfermedad estable, Remisión completa MTT	CFM + VNR	Recaída Local, MO y MTT pulmonar. Mala Evolución	Neutropenia G III y IV, GEA	26	20
26_RMS_ME	2,3	M	Rabdomiosarcoma embrionario	Pelvis	Ganglionar	EPSSG mRMS2005	Si	Si	70%-Remisión Parcial local y Remisión completa ganglionar	CFM + VNR	Recaída local. Mala evolución	Neutropenia Febril G III	32,86	44

**Figura 17. Probabilidad acumulada de recaída durante el tratamiento metronómico según tipo de tumor en el grupo de Alto Riesgo.**  
Curvas de recaída oncológica a lo largo del tiempo, representadas en semanas, para los distintos diagnósticos incluidos.



## ANÁLISIS DE TOXICIDADES

En el marco de este estudio, se utilizó el sistema **CTCAE v4.0** (*Common Terminology Criteria for Adverse Events*), desarrollado por el Instituto Nacional del Cáncer (INC) de los Estados Unidos en 2009, para evaluar y clasificar los eventos adversos experimentados por los pacientes. Si bien existen versiones más recientes, se optó por esta edición por ser la empleada en los servicios de oncología de los hospitales participantes. Este sistema permite la clasificación estandarizada de una amplia gama de eventos adversos, incluyendo síntomas, signos clínicos, alteraciones de laboratorio y hallazgos radiológicos, mediante una escala que va del grado 1 (leve) al grado 5 (fatal).

En este estudio se evaluaron principalmente toxicidades hematológicas, renales y hepáticas. A lo largo del tratamiento se realizaron determinaciones seriadas de hematocrito, hemoglobina, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, plaquetas, creatininemia, uremia, TGO y TGP. Cada determinación fue considerada como un evento, y aquellos valores que excedieron los rangos de normalidad fueron clasificados según los criterios de toxicidad del CTCAE v4.0. En total, se analizaron entre 250 y 900 eventos por parámetro, permitiendo una evaluación exhaustiva y sistemática de la seguridad del tratamiento metronómico.

A continuación, se presentan los resultados del análisis de toxicidad asociado al tratamiento metronómico en pacientes pediátricos de Alto Riesgo, organizados por tipo de evento adverso, grupo clínico y cambios observados a lo largo del tratamiento.

## Análisis de toxicidad hematológica

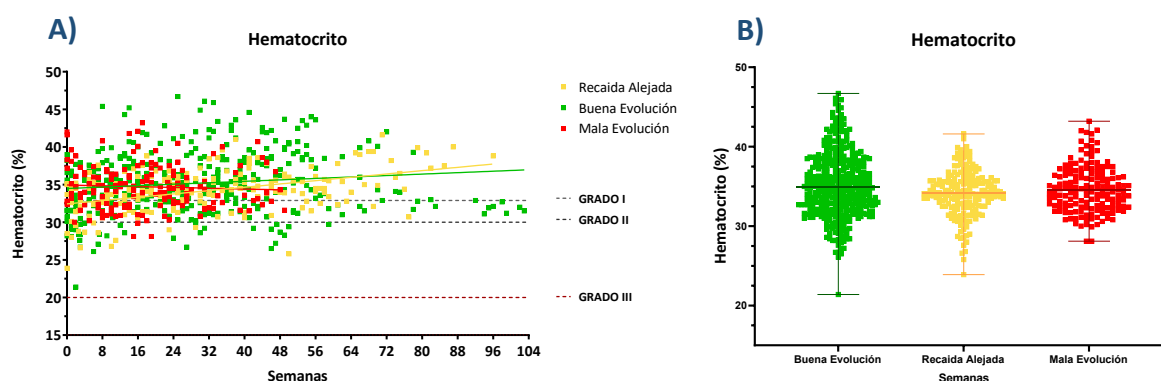
**Tabla 8. Análisis de toxicidad según valores de Hematocrito en pacientes con evolución clínica diferenciada**

A) Estadísticos descriptivos y comparativos para Hematocrito según grupo clínico.

B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad estandarizado.

A) Hematocrito		Buena Evolución	Recaída Alejada	Mala Evolución
		A	B	C
Eventos		372	194	159
Mediana (Rango)		34,9 (21,4-46,7)	34,2 (23,9-41,6)	34,5 (28,1-43,2)
Correlación (Semanas vs evolución)	r Spearman	0,178	0,4033	-0,06304
	P	0,0003	<0,0001	0,2149
ANOVA (Kruskall-Wallis)		p=0,0552		
Multiple Comparisons (Dunn's)		AvsB ns, AvsC ns, BvsC ns		
Regresión lineal simple	Slope	0,02395	0,05519	-0,01355
	Dif. de 0 (p)	<b>0,0143</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,4725

B)	TOTAL	725	Porcentaje
	NORMAL	502	69
	Grado 1: 30.0% - 32.9%	173	24
	Grado 2: 20.0% - 29.9%	50	7
	Grado 3: 15.0% - 19.9%	0	0
	Grado 4: Menos de 15.0%	0	0



**Figura 18. Evaluación de la toxicidad en función de los valores de hematocrito**

A) Dispersión de valores de hematocrito a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.

B) Representación de los valores individuales de hematocrito según grupo de evolución clínica.

Se registraron 725 eventos relacionados con hematocrito: 372 en el grupo de Buena Evolución (BE), 194 en Recaída Alejada (RA) y 159 en Mala Evolución (ME). Las medianas entre los grupos no difirieron significativamente ( $P=0,0552$ , Kruskal-Wallis), y las comparaciones múltiples no mostraron diferencias relevantes.

Se observó una correlación positiva y significativa entre semanas de tratamiento y niveles de hematocrito en BE ( $r=0,178$ ,  $P=0,0003$ ) y RA ( $r=0,4033$ ,  $P < 0,0001$ ), mientras que en ME fue débil y negativa ( $r=-0,06304$ ,  $P=0,21$ ). La regresión lineal confirmó un aumento significativo del hematocrito con el tiempo en BE y RA ( $P < 0,05$ ), sin cambios significativos en ME.

En cuanto a la clasificación por grados de toxicidad, la mayoría de los eventos se ubicaron en los grados 1 y 2. Se observaron pocos eventos en grados más severos (grados 3 y 4), lo que indica una muy baja incidencia de toxicidad hematológica grave relacionada con el hematocrito.

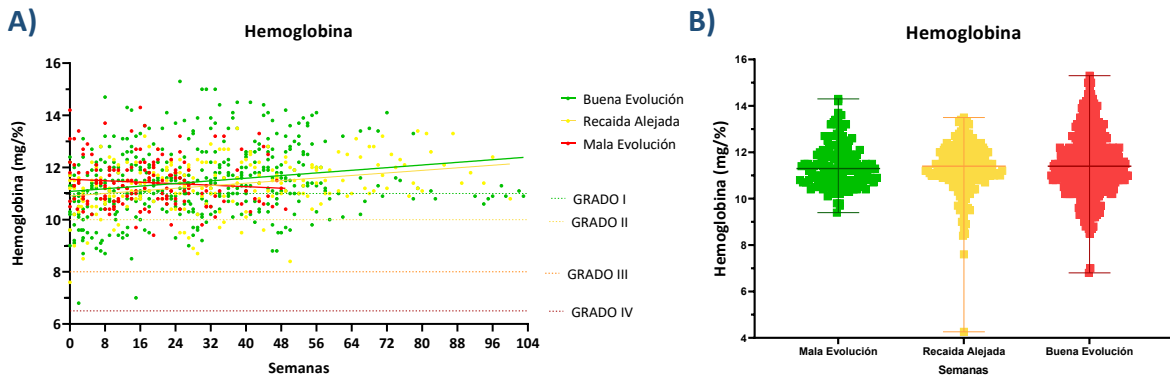
**Tabla 9. Análisis de toxicidad según valores de Hemoglobina en pacientes con evolución clínica diferenciada**

A) Estadísticos descriptivos y comparativos para Hemoglobina según grupo clínico.

B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad estandarizado.

A) Hemoglobina		Buena Evolución	Recaída Alejada	Mala Evolución
		A	B	C
Eventos		448	218	160
Mediana (Rango)		11,4 (6,8-15,3)	11,4 (4,26-13,5)	11,3 (9,4-14,3)
Correlación (Semanas vs. Evolución)	r Spearman	0,2266	0,296	-0,09592
	P	<0,0001	<0,0001	0,1138
ANOVA (Kruskall-Wallis)		0,8701		
Multiple Comparisons (Dunn's)		Ns		
Regresión lineal simple	Slope	0,01266	0,01227	-0,00713
	Dif. de 0 (p)	<0,0001	<0,0001	0,2244

B)	Total	826	Porcentaje
	Normal	554	67
	Grado 1: 10.0 - 10.9 g/dL	201	24
	Grado 2: 8.0 - 9.9 g/dL	67	8
	Grado 3: 6.5 - 7.9 g/dL	3	0,4
	Grado 4: <6.5 g/dL	1	0,1



**Figura 19. Evaluación de la toxicidad en función de los valores de hemoglobina**  
 A) Dispersión de valores de hemoglobina a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.  
 B) Representación de los valores individuales de hemoglobina según grupo de evolución clínica.

Se registraron 826 eventos relacionados con hemoglobina: 448 en el grupo de Buena Evolución (BE), 218 en Recaida Alejada (RA) y 160 en Mala Evolución (ME). Las medianas no mostraron diferencias significativas entre grupos ( $P=0,8701$ , Kruskal-Wallis), y las comparaciones múltiples tampoco revelaron diferencias relevantes.

Se observaron correlaciones positivas entre las semanas de tratamiento y los niveles de hemoglobina en BE ( $r=0,2266$ ,  $P<0,0001$ ) y RA ( $r=0,296$ ,  $P<0,0001$ ), mientras que en ME la correlación fue negativa y no significativa ( $r=-0,09592$ ,  $P=0,1138$ ). La regresión lineal confirmó un aumento significativo en los valores de hemoglobina con el tiempo en BE y RA, pero no en ME.

En cuanto a los grados de toxicidad, la mayoría de los eventos se clasificaron como valores normales ( $n = 554$ , 67,1%), seguidos por grado 1 ( $n = 201$ , 24,3%) y grado 2 ( $n = 67$ , 8,1%). Solo se observaron 4 eventos de mayor severidad: tres de grado 3 y uno de grado 4.

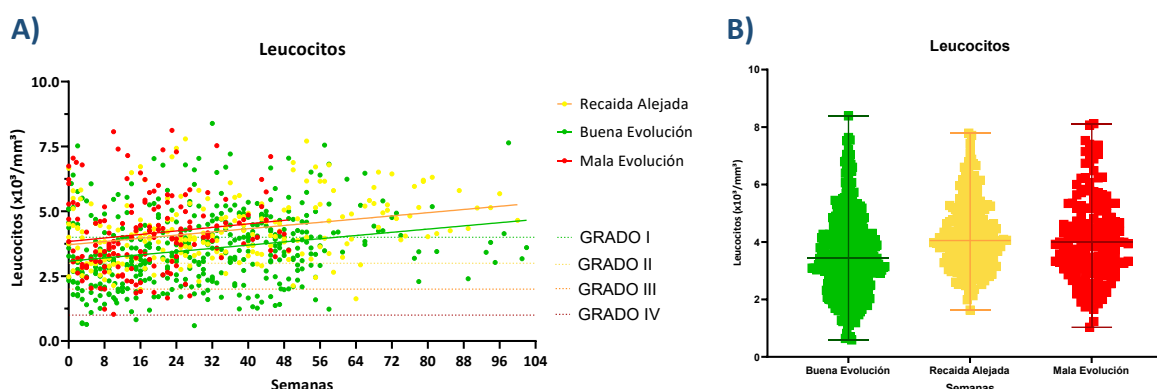
**Tabla 10, Análisis de toxicidad según valores de Leucocitos en pacientes con evolución clínica diferenciada**

A) Estadísticos descriptivos y comparativos para Leucocitos según grupo clínico.

B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad.

A) Leucocitos		Buena Evolución	Recaída Alejada	Mala Evolución
		A	B	C
Eventos		445	217	158
Mediana (Rango)		3,43 (0,59-8,39)	4,05 (1,63-7,79)	3,99 (1,03-8,12)
Correlación (Semanas vs. Evolución)	r Spearman	0,2636	0,3247	0,1939
	P	<0,0001	<0,0001	0,0073
ANOVA (Kruskall-Wallis)		<0,0001		
Multiple Comparisons (Dunn's)		A-B:<0,0001; A-C: <0,0001; B-C: ns		
Regresión lineal simple	Slope	0,01546	0,01545	0,017
	Dif. de 0 (p)	<0,0001	<0,0001	0,0686

B)	TOTAL	827	Porcentaje
	Normal	354	42,8
	Grado 1: 3,000 - 3,999/mm <sup>3</sup>	253	30,6
	Grado 2: 2,000 - 2,999/mm <sup>3</sup>	158	19,1
	Grado 3: 1,000 - 1,999/mm <sup>3</sup>	57	6,9
	Grado 4: Menos de 1,000/mm <sup>3</sup>	5	0,6



**Figura 20, Evaluación de la toxicidad en función de los valores de leucocitos**

A) Dispersión de valores de leucocitos a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.

B) Representación de los valores individuales de leucocitos según grupo de evolución clínica.

Se registraron 827 eventos: 445 en el grupo de Buena Evolución (BE), 217 en Recaída Alejada (RA) y 158 en Mala Evolución (ME). Las medianas variaron entre los grupos, y el análisis de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas ( $P < 0,0001$ ). Las comparaciones múltiples revelaron diferencias entre BE vs RA y BE vs ME, pero no entre RA y ME.

Se observaron correlaciones positivas entre semanas de tratamiento y niveles de leucocitos en todos los grupos: RA ( $r=0,3247$ ), BE ( $r=0,2636$ ), y ME ( $r=0,1939$ ), todas estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ). La regresión lineal confirmó un aumento significativo de leucocitos con el tiempo en BE y RA ( $P < 0,0001$ ), y un aumento no significativo en ME ( $P=0,0686$ ).

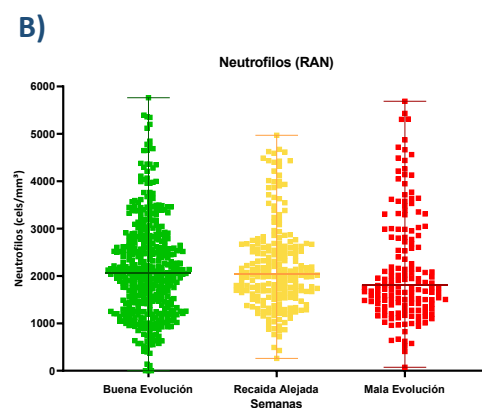
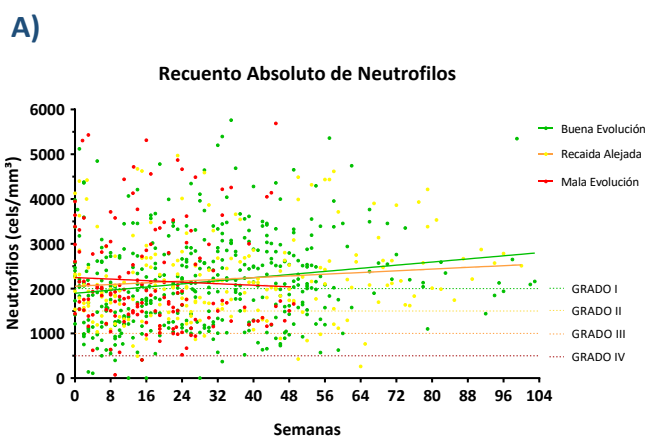
En la clasificación por grados de toxicidad, el 42,8% de los eventos se consideraron normales, mientras que el 30,6% y el 19,1% correspondieron a grados 1 y 2, respectivamente. Solo un 7,5% del total fueron grados 3 ó 4.

**Tabla 11. Análisis de toxicidad según valores de Neutrófilos en pacientes con evolución clínica diferenciada**

A) Estadísticos descriptivos y comparativos para Neutrófilos según grupo clínico.  
B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad.

A) Neutrófilos		Buena Evolución	Recaída Alejada	Mala Evolución
		A	B	C
Eventos		439	212	157
Mediana (Rango)		2061 (0-5762)	2047 (261-4709)	1800 (73-5615)
Correlación (Semanas vs. Evolución)	r Spearman	0,2021	0,1416	-0,1411
	P	<0,0001	0,0197	0,039
ANOVA (Kruskall-Wallis)		0,3422		
Multiple Comparisons (Dunn's)		ns		
Regresión lineal simple	Slope	8,715	4,776	-4,294
	Dif. de 0 (p)	0,0002	0,0683	0,561

B)	Total	817	Porcentaje
Normal	422		51,7
Grado 1: 1,500 - 1,999/mm <sup>3</sup>	178		21,8
Grado 2: 1,000 - 1,499/mm <sup>3</sup>	147		18,0
Grado 3: 500 - 999/mm <sup>3</sup>	56		6,9
Grado 4: Menos de 500/mm <sup>3</sup>	14		1,7



### Figura 21. Evaluación de la toxicidad en función de los valores de neutrófilos

A) Dispersión de valores de neutrófilos a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.

B) Representación de los valores individuales de neutrófilos según grupo de evolución clínica.

Se registraron 817 eventos: 439 en el grupo de Buena Evolución (BE), 212 en Recaída Alejada (RA) y 157 en Mala Evolución (ME). Las medianas de los recuentos no mostraron diferencias significativas entre los grupos ( $P=0,3422$ , Kruskal-Wallis), y las comparaciones múltiples tampoco revelaron diferencias relevantes.

Se observaron correlaciones positivas entre semanas de tratamiento y recuento de neutrófilos en BE ( $r=0,2021$ ,  $P<0,0001$ ) y RA ( $r=0,1416$ ,  $P=0,0197$ ), mientras que en ME la correlación fue negativa y significativa ( $r=-0,1411$ ,  $P=0,039$ ). La regresión lineal mostró un aumento significativo de neutrófilos con el tiempo en BE ( $P=0,0002$ ), pero no en RA ni ME.

La clasificación por grados de toxicidad mostró que el 51,6% de los eventos fueron normales, el 21,8% grado 1, y el 18% grado 2. Se observaron 56 eventos de grado 3 (6,9%) y 14 de grado 4 (1,7%). Cabe destacar que los episodios de neutropenia grado 3 (RAN  $<1000$ ) fueron la causa más frecuente de suspensión transitoria del tratamiento, con interrupciones de entre 2 y 7 días.

### Tabla 12. Análisis de toxicidad según valores de Linfocitos en pacientes con evolución clínica diferenciada

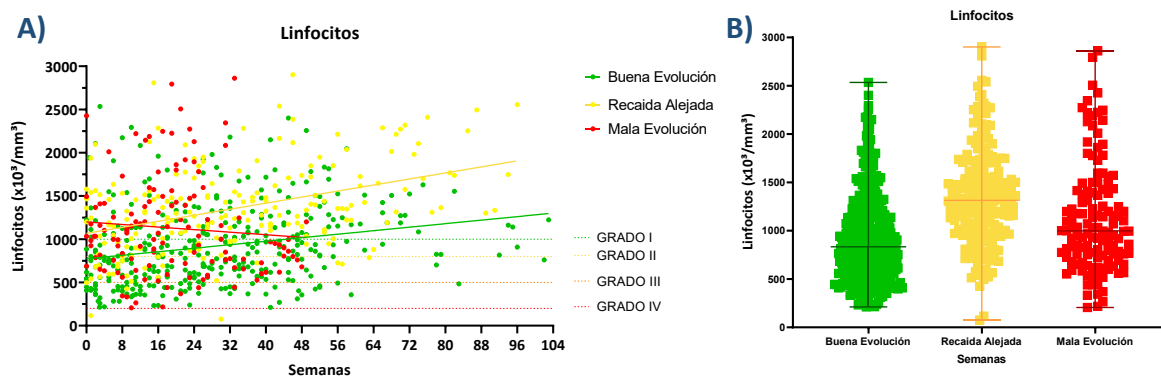
A) Estadísticos descriptivos y comparativos para Linfocitos según grupo clínico.

B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad estandarizado.

A)	Linfocitos	Buena Evolución	Recaída Alejada	Mala Evolución
		A	B	C
	Eventos	374	199	128
	Mediana (Rango)	834 (211-2535)	1314 (76-2902)	998(206-2861)
Correlación (Semanas vs. Evolución)	r Spearman	0,2946	0,3785	-0,09882
	P	$<0,0001$	$<0,0001$	0,1335
	ANOVA (Kruskall-Wallis)	$<0,0001$		
	Multiple Comparisons (Dunn's)	A-B: $<0,0001$ ; A-C: 0,0008; B-C: $<0,0001$		
Regresión lineal simple	Slope	5,077	8,736	-3,699
	Dif. de 0 (p)	$<0,0001$	$<0,0001$	0,3431

B)

	Total	706	Porcentaje
Normal	358		50,7
Grado 1: 800 - 999/mm <sup>3</sup>	110		15,6
Grado 2: 500 - 799/mm <sup>3</sup>	153		21,7
Grado 3: 200 - 499/mm <sup>3</sup>	83		11,8
Grado 4: Menos de 200/mm <sup>3</sup>	2		0,3



**Figura 22. Evaluación de la toxicidad en función de los valores de linfocitos**  
 A) Dispersión de valores de linfocitos a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.  
 B) Representación de los valores individuales de linfocitos según grupo de evolución clínica.

Se registraron 706 eventos: 374 en el grupo de Buena Evolución (BE), 199 en Recaída Alejada (RA) y 128 en Mala Evolución (ME). Las medianas de los recuentos mostraron diferencias significativas entre grupos ( $P < 0,0001$ , Kruskal-Wallis). Las comparaciones múltiples indicaron diferencias entre BE vs RA ( $p < 0,0001$ ) y BE vs ME ( $P=0,0008$ ), pero no entre RA y ME.

Las correlaciones entre semanas de tratamiento y recuentos de linfocitos fueron positivas y significativas en BE ( $r=0,2946$ ) y RA ( $r=0,3785$ ), mientras que en ME fueron negativas y no significativas ( $r=-0,09882$ ,  $P=0,1335$ ). La regresión lineal mostró un aumento significativo de linfocitos en BE y RA ( $P < 0,0001$ ), pero no en ME ( $P=0,3431$ ).

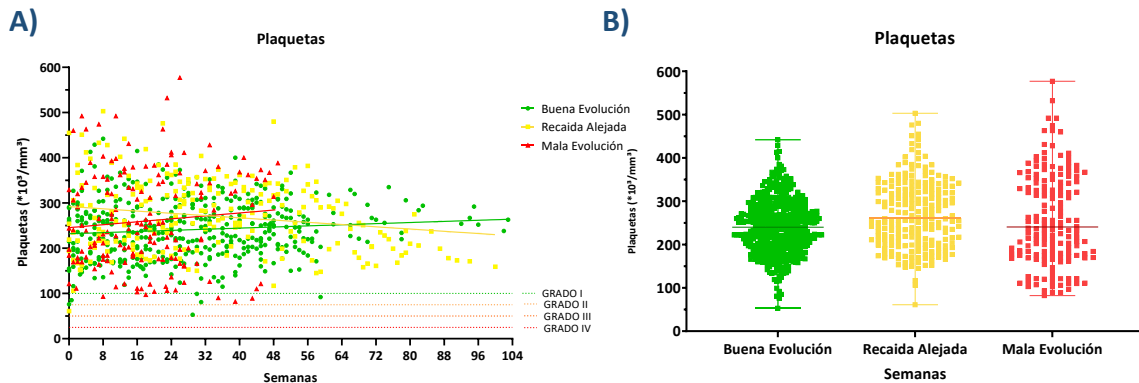
En cuanto a los grados de toxicidad, el 50,7% de los eventos fueron normales, el 15,6% grado 1 y el 21,7% grado 2. Se observaron 83 eventos de grado 3 (11,8%) y 2 eventos de grado 4 (0,3%), reflejando una distribución amplia con predominio de toxicidad leve a moderada.

**Tabla 13. Análisis de toxicidad según valores de plaquetas en pacientes con evolución clínica diferenciada**  
 A) Estadísticos descriptivos y comparativos para Plaquetas según grupo clínico.  
 B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad estandarizado.

A) Plaquetas	Buena Evolución			Recaída Alejada	Mala Evolución
	A	B	C		
Eventos	445	214	160		
Mediana (Rango)	240 (53-389)	261 (61-442)	240,5 (82-495)		
Correlación (Semanas vs. Evolución)	r Spearman	0,1155	-0,118	0,08189	
	P	0,0074	0,0425	0,1516	
ANOVA (Kruskall-Wallis)	0,0002				
Multiple Comparisons (Dunn's)	A-B: 0,0001, A-C: no, B-C: no				
Regresión lineal simple	Slope	0,3099	-0,6213	0,811	
	Dif. de 0 (p)	0,0352	0,0059	0,2371	

B)

	Total	819	Porcentaje
Normal	807		98,5
Grado 1: 75,000 - 99,000/mm <sup>3</sup>	10		1,2
Grado 2: 50,000 - 74,000/mm <sup>3</sup>	2		0,2
Grado 3: 25,000 - 49,000/mm <sup>3</sup>	0		0,0
Grado 4: Menos de 25,000/mm <sup>3</sup>	0		0,0



**Figura 23. Evaluación de la toxicidad en función de los valores de plaquetas**  
 A) Dispersión de valores de plaquetas a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.  
 B) Representación de los valores individuales de plaquetas según grupo de evolución clínica.

Se registraron 819 eventos: 445 en el grupo de Buena Evolución (BE), 214 en Recaída Alejada (RA) y 160 en Mala Evolución (ME). Las medianas de recuento de plaquetas mostraron diferencias significativas entre los grupos ( $P=0,0002$ , Kruskal-Wallis), con diferencias entre BE y RA ( $P=0,0001$ ), pero no entre BE y ME.

Las correlaciones entre semanas de tratamiento y recuento de plaquetas fueron débiles pero significativas en BE ( $r=0,1155$ ,  $P=0,0074$ ) y RA ( $r=-0,118$ ,  $P=0,0425$ ), mientras que en ME fueron no significativas ( $r=0,08189$ ,  $P=0,1516$ ). La regresión lineal mostró un aumento significativo en BE ( $P=0,0352$ ), una disminución significativa en RA ( $P=0,0059$ ), y sin cambios relevantes en ME ( $P=0,2371$ ).

En cuanto a los grados de toxicidad, el 98,4% de los eventos fueron normales. Solo se observaron 10 eventos de grado 1 (1,2%) y 2 de grado 2 (0,2%). No se registraron eventos de grado 3 ni 4, indicando una baja incidencia de trombocitopenia clínica significativa.

## Análisis de toxicidad renal y hepática

**Tabla 14. Análisis de toxicidad según niveles de Uremia en pacientes con evolución clínica diferenciada**

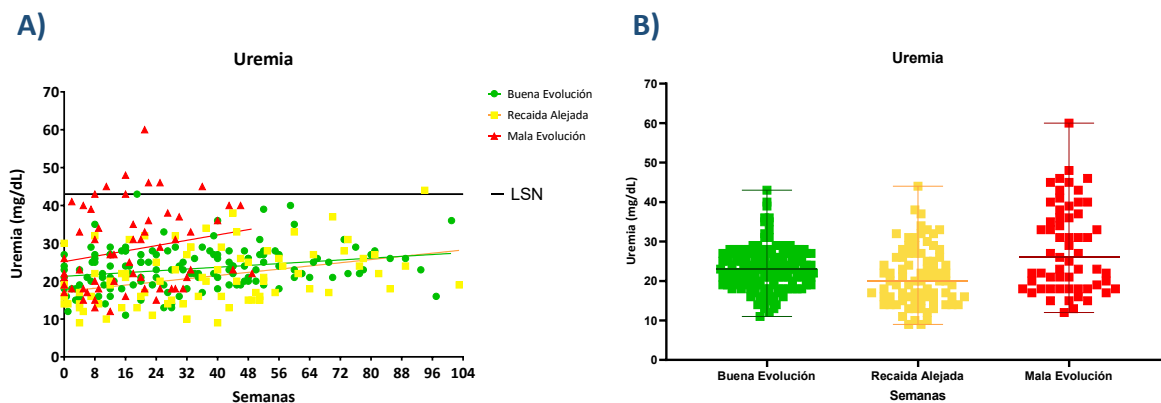
A) Estadísticos descriptivos y comparativos para Uremia según grupo clínico.

B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad estandarizado, relación con el límite superior de normalidad (LSN): 43 mg/dL.

A) Uremia		Buena Evolución	Recaída Alejada	Mala Evolución
		A	B	C
Eventos		146	81	59
Mediana (Rango)		23 (11-43)	20 (9-44)	26 (12-60)
Correlación (Semanas vs. Evolución)	r Spearman	0,2598	0,3781	0,2333
	P	0,0008	0,0003	0,0377
ANOVA (Kruskall-Wallis)		<0,0001		
Multiple Comparisons (Dunn's)		A-B: ns, A-C: ns, B-C: 0,0004		
Regresión lineal simple	Slope	0,05992	0,1053	0,1762
	Dif. de 0 (p)	0,0016	0,0009	0,1177

B)

	Total	Porcentaje
Normal	286	97,6
Entre LSN y G1	7	2,4
Grado 1: 1.5 - 2.9 veces el LSN	0	0
Grado 2: 3.0 - 5.0 veces el LSN	0	0
Grado 3: Más de 5.0 veces el LSN	0	0



**Figura 24. Evaluación de la toxicidad en función de los niveles de Uremia**

A) Dispersión de niveles de uremia a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.

B) Representación de los niveles individuales de uremia según grupo de evolución clínica.

Se registraron 286 eventos: 146 en el grupo de Buena Evolución (BE), 81 en Recaída Alejada (RA) y 59 en Mala Evolución (ME). Las medianas de uremia mostraron diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,0001$ , Kruskal-Wallis), con diferencias entre RA vs BE y RA vs ME ( $P=0,0004$  en ambos casos), pero no entre BE y ME.

Las correlaciones entre semanas de tratamiento y valores de uremia fueron positivas y significativas en BE ( $r=0,2598$ ,  $P=0,0008$ ), RA ( $r=0,3781$ ,  $P=0,0003$ ) y ME ( $r=0,2333$ ,  $P=0,0377$ ). La regresión lineal mostró un aumento significativo de uremia con el tiempo en BE y RA ( $P < 0,01$ ), pero no en ME ( $P=0,1177$ ).

En cuanto a los grados de toxicidad, el 97,6% de los eventos fueron normales. Solo se registraron 7 eventos por encima del LSN, pero sin alcanzar criterios de Grado 1. No se reportaron eventos de toxicidad grados 1 a 4, lo que sugiere baja incidencia de compromiso renal relevante en términos de uremia.

**Tabla 15. Análisis de toxicidad según niveles de Creatininemia en pacientes con evolución clínica diferenciada**

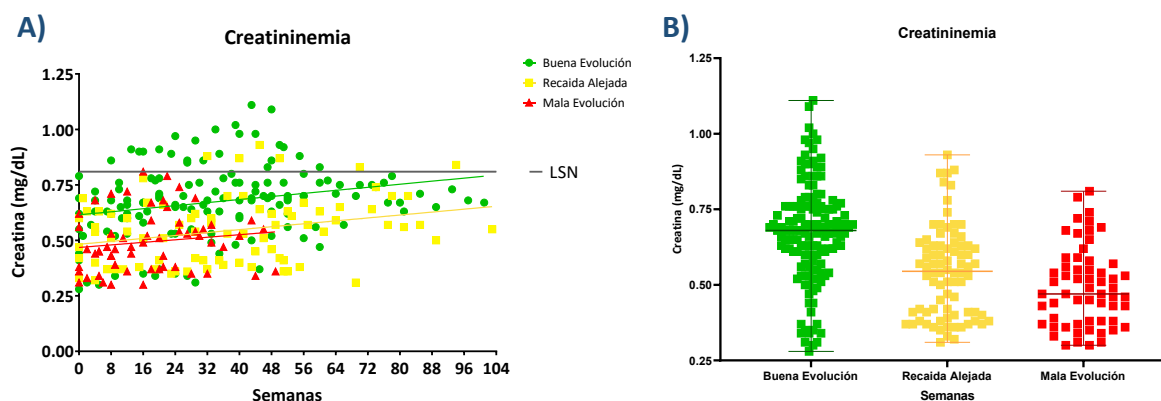
A) Estadísticos descriptivos y comparativos para Creatininemia según grupo clínico.

B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad estandarizado (relación con LSN: 0,8 mg/dL).

A) Creatininemia		Buena Evolución	Recaída Alejada	Mala Evolución
		A	B	C
Eventos		145	82	59
Mediana (Rango)		0,68 (0,28-1,11)	0,54 (0,31-0,93)	0,47 (0,3-0,81)
Correlación (Semanas vs. Evolución)	r Spearman	0,2982	0,2765	0,2269
	P	0,0001	0,006	0,042
ANOVA (Kruskall-Wallis)		<0,0001		
Multiple Comparisons (Dunn's)		A-B: <0,0001, A-C: <0,0001; B-C: no		
Regresión lineal simple	Slope	0,001724	0,001648	0,001438
	Dif. de 0 (p)	0,0026	0,0096	0,2855

B)

	Total	Porcentaje
Normal	286	89,5
Grado 1: 1.0 - 1.5 veces el LSN o aumento de 0.3 - 0.4 mg/dL	30	10,5
Grado 2: 1.6 - 2.0 veces el LSN o aumento de 0.5 - 0.9 mg/dL	0	0,0
Grado 3: 2.1 - 3.0 veces el LSN o aumento de 1.0 - 1.4 mg/dL	0	0,0
Grado 4: Más de 3.0 veces el LSN o aumento de más de 1.5 mg/dL	0	0,0



**Figura 25. Evaluación de la toxicidad en función de los niveles de Creatininemia**  
 A) Dispersión de niveles de creatininemia a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.  
 B) Representación de los niveles individuales de creatininemia según grupo de evolución clínica.

Se registraron 286 eventos: 145 en el grupo de Buena Evolución (BE), 82 en Recaída Alejada (RA) y 59 en Mala Evolución (ME). Las medianas de creatininemia mostraron diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,0001$ , Kruskal-Wallis), con diferencias significativas en todas las comparaciones múltiples: BE vs RA, BE vs ME, y RA vs ME.

Las correlaciones entre semanas de tratamiento y creatininemia fueron positivas y estadísticamente significativas en BE ( $r=0,2982$ ,  $P=0,0001$ ), RA ( $r=0,2765$ ,  $P=0,006$ ), y ME ( $r=0,2269$ ,  $P=0,042$ ). La regresión lineal mostró un aumento significativo en BE y RA ( $P=0,0026$  y  $P=0,0096$ , respectivamente), mientras que en ME no fue significativo ( $P=0,2855$ ).

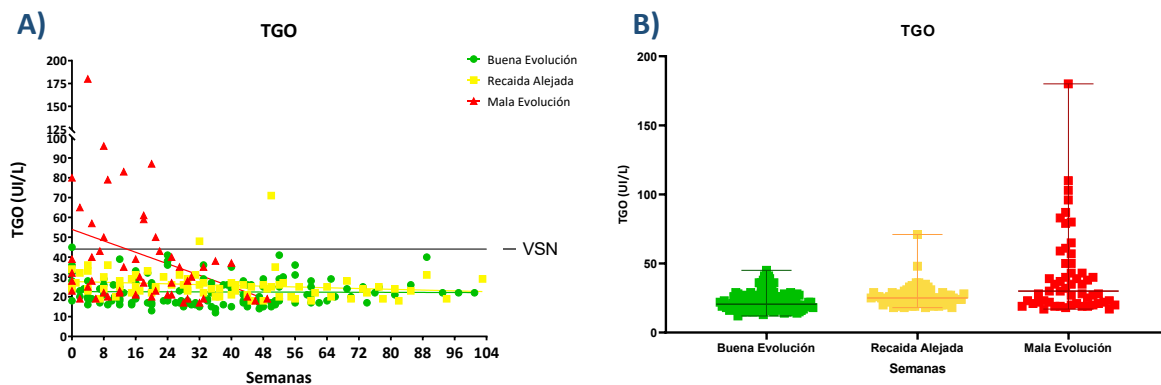
En cuanto a la toxicidad renal, el 89,5% de los eventos fueron normales, y el 10,5% restante correspondió a eventos de grado 1. No se registraron eventos de toxicidad renal en otros grados.

**Tabla 16. Análisis de toxicidad según niveles de TGO en pacientes con evolución clínica diferenciada**

A) Estadísticos descriptivos y comparativos para TGO según grupo clínico.  
 B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad estandarizado (relación con LSN: 44 UI/L).

A)	TGO	Buena Evolución	Recaída Alejada	Mala Evolución
		A	B	C
Eventos		130	78	54
Mediana (Rango)		20,5 (12-45)	25 (18-71)	30 (17-180)
Correlación (Semanas vs. Evolución)	r Spearman	-0,0217	-0,3152	-0,3289
	P	0,4032	0,0025	0,0076
ANOVA (Kruskall-Wallis)		<0,0001		
Multiple Comparisons (Dunn's)		A-B: 0,0005, A-C: <0,0001, B-C: ns		
Regresión lineal simple	Slope	-0,004839	-0,0493	-0,722
	Dif. de 0 (p)	ns	ns	ns

	Total	262	Porcentaje
Normal	245		93,5
Grado 1: 1.0 - 2.5 veces el LSN	16		6,1
Grado 2: 2.6 - 5.0 veces el LSN	1		0,4
Grado 3: 5.1 - 20.0 veces el LSN	0		0
Grado 4: Más de 20.0 veces el LSN	0		0



**Figura 26. Evaluación de la toxicidad en función de los niveles de TGO**  
 A) Dispersión de niveles de TGO a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.  
 B) Representación de los niveles individuales de TGO según grupo de evolución clínica.

Se registraron 262 eventos: 130 en el grupo de Buena Evolución (BE), 78 en Recaída Alejada (RA) y 54 en Mala Evolución (ME). Las medianas de TGO mostraron diferencias significativas entre grupos ( $P < 0,0001$ , Kruskal-Wallis), con diferencias entre BE vs RA ( $P=0,0005$ ) y BE vs ME ( $P < 0,0001$ ). No se observaron diferencias significativas entre RA y ME.

Las correlaciones entre semanas de tratamiento y niveles de TGO fueron negativas y significativas en RA ( $r=-0,3152$ ,  $P=0,0025$ ) y ME ( $r=-0,3289$ ,  $P=0,0076$ ), mientras que en BE no fueron significativas ( $r=-0,0217$ ,  $P=0,4032$ ). La regresión lineal no mostró pendientes significativas en ninguna categoría.

En cuanto a la clasificación por grados de toxicidad, el 93,5% de los eventos fueron normales y el 6,1% correspondieron a eventos de grado 1. No se registraron eventos de toxicidad grados 2 a 4.

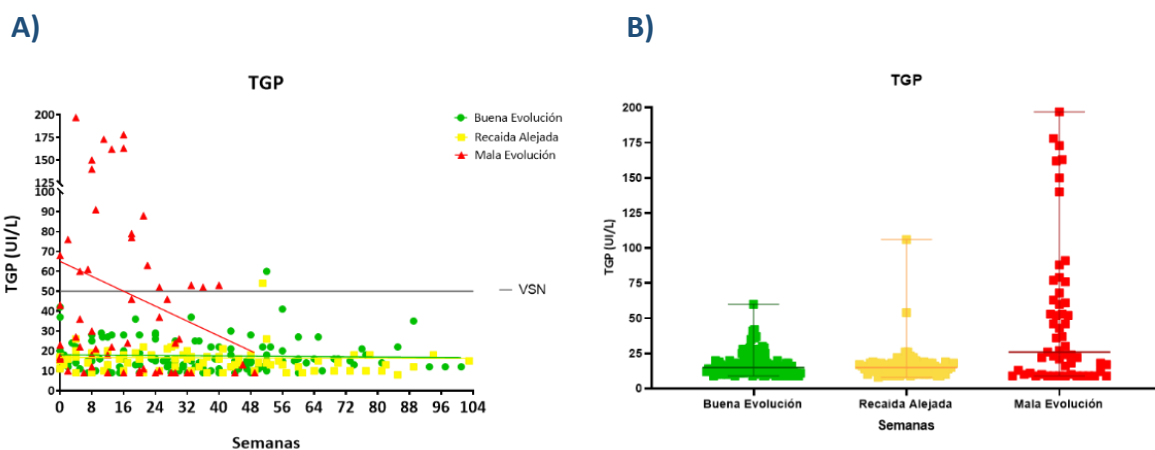
**Tabla 17. Análisis de toxicidad según niveles de TGP en pacientes con evolución clínica diferenciada**

A) Estadísticos descriptivos y comparativos para TGP según grupo clínico.

B) Clasificación de eventos según grado de toxicidad estandarizado (relación con LSN: 50 UI/L).

A) TGP		Buena Evolución	Recaída Alejada	Mala Evolución
		A	B	C
Eventos		132	78	55
Mediana (Rango)		15 (9-60)	15 (8-106)	26 (9-197)
Correlación (Semanas vs. Evolución)	r Spearman	-0,05067	-0,2035	-0,2534
	P	0,282	0,037	0,031
ANOVA (Kruskall-Wallis)		<0,0001		
Multiple Comparisons (Dunn's)		A-B:ns; A-C: 0,0047; B-C:0,0004		
Regresión lineal simple	Slope	-0,01393	-0,005408	-0,9373
	Dif. de 0 (p)	no	no	no

B)	Total	265	Porcentaje
Normal	242	91,3	
Grado 1: 1.0 - 2.5 veces el LSN	16	6,0	
Grado 2: 2.6 - 5.0 veces el LSN	7	2,6	
Grado 3: 5.1 - 20.0 veces el LSN	0	0,0	
Grado 4: Más de 20.0 veces el LSN	0	0,0	



**Figura 27. Evaluación de la toxicidad en función de los niveles de TGP**

A) Dispersión de niveles de TGP a lo largo de las semanas de tratamiento, diferenciados por grupo de evolución clínica, con líneas de regresión.

B) Representación de los niveles individuales de TGP según grupo de evolución clínica.

Se registraron 265 eventos: 132 en el grupo de Buena Evolución (BE), 78 en Recaída Alejada (RA) y 55 en Mala Evolución (ME). Las medianas de TGP mostraron diferencias

significativas entre grupos ( $P < 0,0001$ , Kruskal-Wallis), con diferencias entre BE vs ME ( $P=0,0047$ ) y RA vs ME ( $P=0,0004$ ). No se encontraron diferencias significativas entre BE y RA.

Las correlaciones entre semanas de tratamiento y niveles de TGP fueron negativas y significativas en RA ( $r=-0,2035$ ,  $P=0,037$ ) y ME ( $r=-0,2534$ ,  $P=0,031$ ), mientras que en BE no fueron significativas ( $r=-0,05067$ ,  $P=0,282$ ). La regresión lineal mostró pendientes no significativas en todas las categorías.

En cuanto a la toxicidad hepática, el 91,3% de los eventos fueron normales. Se observaron 16 eventos de grado 1 (6%) y 7 eventos de grado 2 (2,6%). No se registraron eventos de grado 3 ni 4.

## DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DE TOXICIDAD EN PACIENTES DE ALTO RIESGO

El análisis de toxicidad forma una parte crucial del presente estudio, dado que la QTM, si bien se caracteriza por su perfil de tolerabilidad favorable, podría generar efectos adversos acumulativos que impactan directamente en la continuidad del tratamiento. Evaluar de forma sistemática los eventos hematológicos, renales y hepáticos permitió no solo caracterizar la seguridad del esquema terapéutico, sino también detectar patrones de alteración asociados a la evolución clínica de los pacientes.

Durante el tratamiento se registraron múltiples eventos clínicos relacionados con la toxicidad esperada del esquema metronómico. La toxicidad hematológica fue la manifestación más frecuente, destacándose la neutropenia de grado III y IV como el evento más severo documentado. Aunque esperable dentro del marco terapéutico, en algunos casos requirió la suspensión transitoria del tratamiento, con posterior recuperación de los parámetros hematológicos.

Asimismo, se reportaron complicaciones infecciosas (respiratorias y urinarias), episodios de anemia y alteraciones hepáticas, que en conjunto motivaron interrupciones del tratamiento en aproximadamente 65% de los pacientes. La duración de estas suspensiones fue variable, con un rango de 2 a 92 días acumulados por individuo. Si bien no todas las interrupciones fueron continuas ni atribuibles exclusivamente a eventos tóxicos, estos constituyeron el motivo predominante.

A continuación, se analiza en detalle cada uno de los parámetros evaluados con el objetivo de integrar los hallazgos observados con su posible implicancia clínica en el contexto del tratamiento metronómico.

### **Hemoglobina y Hematocrito**

La medición de hemoglobina y hematocrito es fundamental en pacientes oncológicos pediátricos para detectar y monitorear anemia, una complicación frecuente durante el tratamiento citotóxico. La anemia puede deberse tanto a la mielosupresión inducida por quimioterapia como a la propia enfermedad de base, y se asocia con fatiga, hipoxia tisular y peor tolerancia al tratamiento (Green et al., 2010). El control periódico de estos parámetros permite ajustar esquemas terapéuticos, definir la necesidad de transfusión y evaluar la recuperación hematológica entre ciclos, siendo especialmente relevante en esquemas de QTM donde la continuidad del tratamiento es un objetivo clínico prioritario (Pasquier et al., 2010).

En este estudio, los valores de hemoglobina y hematocrito se mantuvieron en general dentro de rangos aceptables, con muy baja frecuencia de eventos de grado 2 o superior. La anemia observada fue leve en la mayoría de los casos, y no se asoció con suspensión prolongada del tratamiento. Se observaron correlaciones positivas entre el tiempo de tratamiento y la recuperación progresiva de ambos parámetros en los grupos de Buena Evolución y Recaída Alejada, mientras que en el grupo de Mala Evolución estas correlaciones fueron débiles o no significativas. Estos hallazgos respaldan la idea de que, en pacientes con

adecuada evolución clínica, el esquema metronómico permite mantener un equilibrio entre eficacia terapéutica y preservación de la función hematopoyética.

### **Leucocitos, Neutrófilos y Linfocitos**

El monitoreo de los glóbulos blancos —leucocitos totales, neutrófilos y linfocitos— es esencial en el contexto de la quimioterapia, ya que estos parámetros reflejan el estado inmunológico del paciente y su capacidad para enfrentar infecciones. Dentro de ellos, el recuento absoluto de neutrófilos ocupa un lugar central en la práctica clínica diaria, ya que niveles inferiores a  $1000/\text{mm}^3$  constituyen un criterio de neutropenia grado 3 según el CTCAE, y representan una indicación frecuente de suspensión del tratamiento (Blaney, Adamson, & Helman, 2021). En pacientes pediátricos bajo QTM, esta determinación se convierte en un marcador de seguridad clave, ya que permite continuar con esquemas metronómicos sin incurrir en inmunosupresión severa.

En nuestra cohorte, los eventos de neutropenia grado 3 fueron efectivamente la principal causa de suspensión temporal del tratamiento, aunque en todos los casos fueron transitorios y de resolución favorable. Se observó una correlación positiva entre el tiempo de tratamiento y la recuperación del recuento absoluto de neutrófilos (RAN) en los grupos de Buena Evolución y Recaída Alejada, mientras que en el grupo de Mala Evolución esta tendencia fue más errática. Estos hallazgos refuerzan el rol del RAN como parámetro de seguimiento dinámico, que no solo alerta sobre riesgos inmediatos (como infecciones bacterianas), sino que también refleja la recuperación hematológica general.

Por su parte, los leucocitos totales y linfocitos mostraron alteraciones de menor magnitud, aunque su control sigue siendo relevante. La linfopenia persistente, en especial en pacientes de evolución más desfavorable, podría reflejar un compromiso inmunológico más profundo, potencialmente asociado al efecto combinado del tratamiento y del estado clínico general. En conjunto, el análisis inmunológico hematológico evidencia que la QTM puede mantenerse con seguridad en la mayoría de los pacientes, siempre que se realice un seguimiento estrecho del RAN y se actúe tempranamente ante descensos críticos.

### **Plaquetas**

El recuento de plaquetas es un indicador esencial del estado de la médula ósea y de la capacidad hemostática del paciente. La trombocitopenia inducida por quimioterapia puede aumentar el riesgo de hemorragias clínicas y constituye una causa frecuente de modificación o suspensión de tratamiento en oncología pediátrica convencional (Gao et al., 2023). En el contexto de la QTM, donde se prioriza la administración continua a bajas dosis, el control regular del recuento plaquetario permite preservar la seguridad sin comprometer la eficacia del esquema.

En este estudio, los niveles de plaquetas se mantuvieron dentro de rangos normales en la mayoría de los casos, con una frecuencia muy baja de eventos clasificados como grados 1 o 2 y ausencia total de eventos de mayor gravedad. Las correlaciones observadas entre el recuento plaquetario y el tiempo de tratamiento fueron débiles, y las diferencias entre grupos

clínicos no alcanzaron una magnitud clínicamente significativa. Estos resultados refuerzan el buen perfil hematológico del esquema metronómico utilizado y sugieren que la trombocitopenia no representa un efecto adverso limitante en este contexto terapéutico.

### **Uremia y Creatininemia**

La función renal es un componente crítico en el manejo de pacientes oncológicos pediátricos, especialmente debido al riesgo de nefrotoxicidad asociado a ciertos agentes quimioterápicos, la deshidratación, el síndrome de lisis tumoral o las infecciones concomitantes. En este sentido, la creatininemia es un marcador directo del filtrado glomerular, mientras que la uremia refleja el estado general del metabolismo nitrogenado. Su monitoreo conjunto permite detectar alteraciones tempranas y prevenir progresiones a insuficiencia renal, lo cual es clave para sostener esquemas de tratamiento prolongados como los que propone la QTM (Kist-van Holthe et al., 2007).

En nuestra cohorte, tanto los valores de creatininemia como los de uremia se mantuvieron mayoritariamente dentro de rangos normales. Se observó un incremento leve pero progresivo a lo largo del tiempo en los grupos de Buena Evolución y Recaída Alejada, sin llegar a niveles clínicamente relevantes. En el grupo de Mala Evolución, las alteraciones fueron más dispersas, aunque tampoco se reportaron eventos de toxicidad renal grado 2 o superior. La baja frecuencia de eventos adversos renales en este estudio coincide con lo reportado en la literatura sobre QTM pediátrica, donde el perfil de nefrotoxicidad es generalmente bajo, especialmente en esquemas ajustados y con adecuada hidratación (Carcamo & Francia, 2022).

### **TGO y TGP**

Las enzimas hepáticas TGO (AST) y TGP (ALT) son marcadores sensibles de daño hepatocelular. Su monitoreo sistemático durante el tratamiento quimioterápico permite identificar toxicidad hepática temprana, ya sea por efecto directo de los fármacos, por interacciones medicamentosas, infecciones virales o infiltración tumoral. En esquemas metronómicos, donde se busca minimizar los efectos colaterales sin perder eficacia terapéutica, la vigilancia de estas enzimas cobra especial relevancia para sostener tratamientos prolongados sin comprometer la función hepática (André et al., 2011; Carcamo & Francia, 2022).

En este estudio, tanto TGO como TGP se mantuvieron dentro de valores normales en la mayoría de los pacientes, con una incidencia muy baja de eventos adversos grados 1 o 2, y ausencia de toxicidad grados 3 o 4. Se observaron correlaciones negativas significativas en los grupos de Recaída Alejada y Mala Evolución, lo cual indicaría una tendencia a la disminución de los niveles de transaminasas a lo largo del tiempo. Aunque las pendientes no fueron estadísticamente significativas en los análisis de regresión lineal, esta evolución sugiere estabilidad o incluso mejoría del perfil hepático, sin evidencia de deterioro progresivo.

### **Consideraciones finales sobre toxicidad**

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio respaldan el perfil de seguridad favorable de la quimioterapia metronómica en pacientes pediátricos. La baja incidencia de toxicidades grado 3 o superior, la predominancia de eventos leves y transitorios, y la estabilidad funcional de los sistemas hematopoyético, renal y hepático a lo largo del tratamiento refuerzan la aplicabilidad de este enfoque terapéutico en escenarios clínicos que requieren esquemas sostenidos y con baja carga tóxica. Estos hallazgos se alinean con la literatura previamente discutida y aportan evidencia local que respalda la tolerabilidad del régimen utilizado. La toxicidad hematológica, en particular la neutropenia grado 3, fue el principal evento adverso observado, aunque su resolución rápida y su adecuada respuesta a medidas de soporte permitieron sostener el tratamiento en la mayoría de los casos. Esta información resulta relevante no solo para el diseño de futuros protocolos metronómicos, sino también para la toma de decisiones clínicas en pacientes con características de vulnerabilidad.

## ANÁLISIS DE BIOMARCADORES

En esta sección se presentan los resultados del análisis de distintos biomarcadores evaluados en pacientes pediátricos con enfermedad de Alto Riesgo, tratados con QTM. El objetivo principal es explorar la evolución de estos marcadores biológicos a lo largo del tratamiento y su posible asociación con la evolución clínica de los pacientes, clasificados en tres grupos: buena evolución (BE), recaída alejada (RA) y mala evolución (ME).

Con el fin de organizar el análisis, responder a los objetivos planteados y facilitar la comparación entre biomarcadores, se definieron cuatro preguntas clave que estructuran esta sección:

### **1. ¿Los valores del biomarcador difieren significativamente entre los grupos, en los distintos momentos del tratamiento (inicio, mitad y final)?**

Este análisis busca identificar si existen diferencias significativas en los niveles del biomarcador a lo largo del tratamiento según la evolución clínica. Dado que la clasificación de los grupos fue realizada retrospectivamente, este enfoque podría aportar indicios sobre el valor potencialmente predictivo del biomarcador, permitiendo reconocer patrones tempranos asociados a distintos desenlaces.

Se analizaron los valores en tres momentos claves del tratamiento: al inicio, a la mitad (~6 meses/~24 semanas), y al finalizar (ya sea por recaída o finalización exitosa). Se utilizó el test de Kruskal-Wallis para identificar diferencias globales entre los grupos, seguido del test de Dunn para comparaciones específicas.

### **2. ¿Varían significativamente los valores del biomarcador a lo largo del tratamiento dentro de cada uno de los grupos clínicos?**

Este análisis tiene como objetivo explorar la dinámica del biomarcador durante el tratamiento, evaluando si, dentro de cada grupo clínico, se evidencian tendencias específicas de aumento o disminución que puedan reflejar una respuesta biológica característica o un patrón útil para el seguimiento clínico.

Se evaluó la evolución longitudinal dentro de cada grupo clínico mediante el test de Friedman para medidas repetidas. En ciertos casos, se complementó con el test de Wilcoxon para comparaciones pareadas entre momentos clave (inicio vs mitad, inicio vs final, etc.).

### **3. ¿Los valores iniciales del biomarcador predicen la probabilidad de suspender el tratamiento por recaída o finalizarlo exitosamente?**

Este análisis tuvo como objetivo evaluar el valor predictivo temprano del biomarcador, es decir, su capacidad para anticipar el desenlace del tratamiento en función de sus niveles iniciales. Para ello, se utilizó como punto de corte la mediana global de los valores basales, dividiendo a los pacientes en dos grupos: aquellos con concentraciones por encima y por debajo de dicha mediana.

Posteriormente, se evaluó si la distribución de desenlaces (suspensión del tratamiento por recaída *versus* finalización exitosa) difería entre ambos grupos de pacientes. Es decir, se

analizó si una mayor o menor concentración basal del biomarcador se asociaba a uno u otro desenlace clínico.

Para determinar la significación estadística de esta asociación se utilizó el test exacto de Fisher, y se calcularon medidas adicionales de rendimiento diagnóstico: odds ratio, riesgo relativo, sensibilidad, especificidad, valores predictivos (positivo y negativo) y razón de verosimilitud. Este enfoque permitió analizar el posible valor pronóstico temprano del biomarcador, independientemente del grupo clínico al que pertenecía cada paciente.

#### **4. ¿Los valores finales del biomarcador permiten anticipar la evolución clínica posterior en pacientes que finalizaron exitosamente el tratamiento (BE vs. RA)?**

Este análisis buscó determinar si los niveles finales del biomarcador, medidos al concluir la QTM, poseen valor pronóstico respecto de la evolución clínica posterior entre pacientes que, en apariencia, finalizaron exitosamente el tratamiento.

Tal como se describió previamente, los pacientes que completaron el esquema terapéutico sin signos clínicos de progresión ni recaída al momento del alta fueron clasificados, tras el seguimiento, en dos subgrupos: buena evolución (BE) y recaída alejada (RA). Esta condición clínica compartida al finalizar el tratamiento justifica su análisis conjunto como un único grupo (BE + RA), representando a aquellos que alcanzaron una respuesta inicial favorable.

Dado que la subdivisión entre BE y RA se realizó de forma retrospectiva, una vez conocido el desenlace clínico durante el seguimiento, se utilizó como referencia objetiva la mediana inicial combinada de todos los pacientes (ME, BE y RA). Esta elección metodológica permitió evitar sesgos en la comparación, ya que al momento de iniciar el tratamiento no era posible anticipar a qué grupo pertenecería cada paciente.

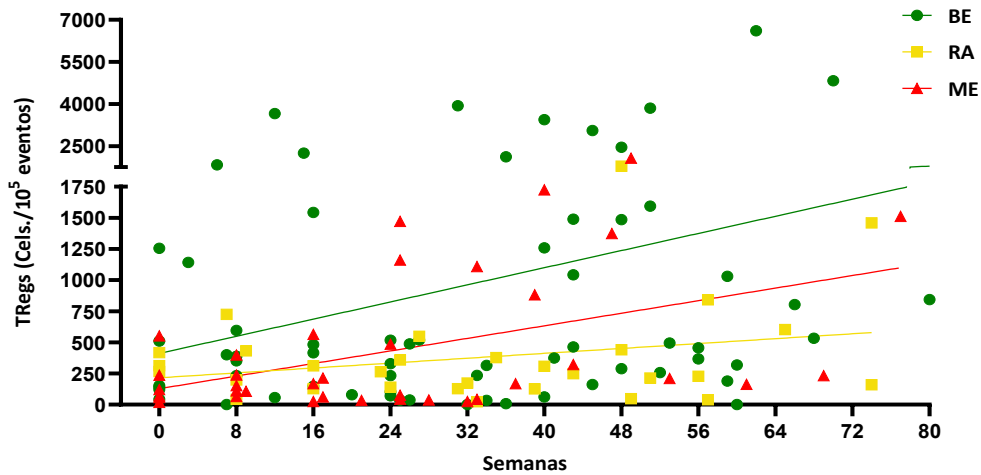
A partir de esa mediana basal común, se evaluó si los niveles finales del biomarcador en los grupos BE y RA mostraban diferencias significativas con respecto a dicho punto de partida. Posteriormente, se analizaron por separado los valores finales de cada subgrupo con el objetivo de identificar posibles diferencias subclínicas que pudieran anticipar la recaída en los pacientes de RA.

Las comparaciones se realizaron mediante el test de Mann-Whitney, tanto para evaluar los cambios intra-grupo entre momentos (inicio vs. final) como para contrastar los valores finales entre los grupos BE y RA. Este enfoque permitió explorar si alguno de los grupos presentaba alteraciones persistentes en el biomarcador al finalizar la QTM, pese a haber alcanzado una respuesta clínica completa.

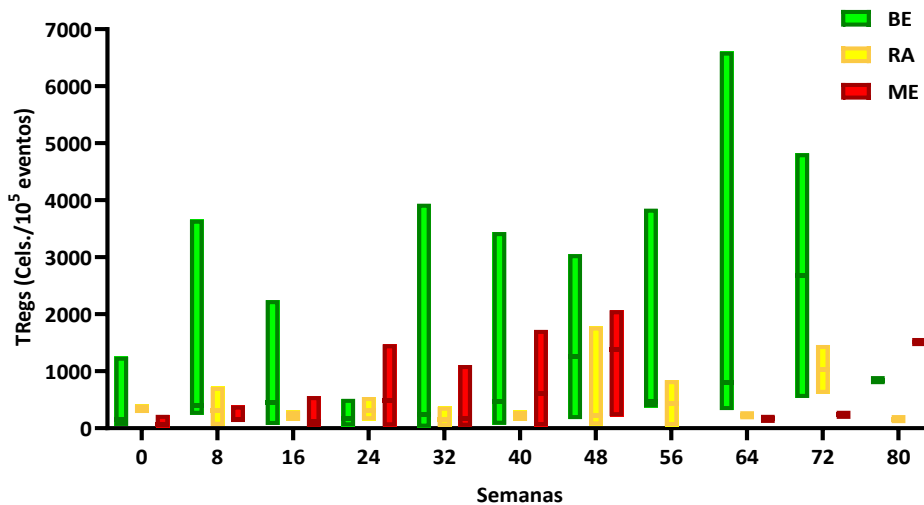
# ANÁLISIS DE BIOMARCADORES INMUNOLÓGICOS

## Linfocitos T Reguladores

A)



B)



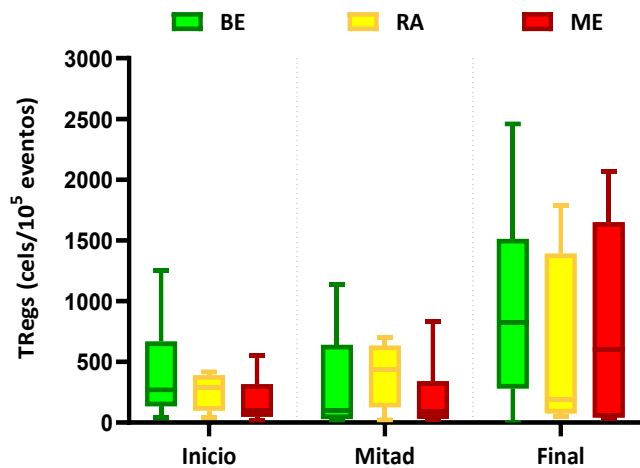
**Figura 28. Evolución de los valores de Tregs durante el tratamiento**

A) Dispersión semanal de Tregs en los tres grupos clínicos, con líneas de tendencia visuales.

B) Distribución y variabilidad semanal de Tregs por grupo clínico. Las barras indican mediana y rango.

La correlación de Spearman entre los niveles de Tregs y el tiempo en semanas de tratamiento mostró una asociación positiva y estadísticamente significativa en los grupos de BE ( $r=0,6091$ ,  $P=0,0260$ ) y ME ( $r=0,5636$ ,  $P=0,0481$ ). En ambos casos, estos resultados sugieren un aumento progresivo de los niveles de Tregs a lo largo del tratamiento. Por el contrario, en el grupo de Recaída Alejada no se observó una correlación significativa ( $r=0,0091$ ,  $P=0,4947$ ), indicando una evolución más variable de los niveles de Tregs en este subgrupo.

**Pregunta N°1:** Al comparar los valores de Tregs entre los grupos clínicos en los tres momentos clave del tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los resultados del test de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples de Dunn no revelaron diferencias en ninguno de los momentos evaluados (Tabla 18, Figura 29).



**Figura 29:** Valores de Tregs en los tres grupos clínicos en distintos momentos del tratamiento. Las barras indican la mediana y el rango.

Tabla 18: Análisis de Tregs según momento del tratamiento y evolución (Kruskal-Wallis y Dunn's Test)				
Momento del Tratamiento	Test Kruskal-Wallis	P	Comparaciones (Dunn)	P
Inicio	2,115	0,3623	ME_Ini vs BE_Ini	0,4402
			ME_Ini vs RA_Ini	>0,9999
			BE_Ini vs RA_Ini	>0,9999
Mitad	0,3448	0,8508	ME_Mid vs BE_Mid	>0,9999
			ME_Mid vs RA_Mid	>0,9999
			BE_Mid vs RA_Mid	>0,9999
Final	0,6933	0,7287	ME_Fin vs BE_Fin	>0,9999
			ME_Fin vs RA_Fin	>0,9999
			BE_Fin vs RA_Fin	>0,9999

**Pregunta N°2:** Los resultados muestran que los valores de Tregs no varían significativamente dentro de los grupos RA y ME a lo largo del tratamiento. En el grupo BE, se observó una diferencia significativa global ( $P=0,0303$ ), con un aumento significativo entre la mitad y el final del tratamiento ( $P=0,0219$ ), según el análisis de Friedman (Tabla 19). El análisis adicional con el test de Wilcoxon confirmó este hallazgo, mostrando un incremento significativo de Tregs al final del tratamiento en comparación con los valores al inicio y a la mitad ( $P=0,0098$  en ambas comparaciones). La consistencia de estos resultados se refleja también en la correlación moderada y significativa entre los valores de inicio y final ( $r=0,5758$ ,  $P=0,0441$ ), lo que indica una progresión ordenada del biomarcador en este grupo (Tabla 20).

Tabla 19. Análisis de Tregs en cada grupo de evolución clínica (Test de Friedman)				
Grupo	Friedman's test	P	Comparación	P (Dunn's)
BE	7,200	0,0303	Ini vs Mid	0,5391
			Ini vs Fin	0,5391
			Mid vs Fin	0,0219
RA	1,500	0,6528	Ini vs Mid	0,8665
			Ini vs Fin	>0,9999
			Mid vs Fin	0,8665
ME	1,333	0,5705	Ini vs Mid	>0,9999
			Ini vs Fin	>0,9999
			Mid vs Fin	0,7446

Tabla 20: Análisis entre valores de Tregs al Final vs Mitad e Inicio (Test de Wilcoxon)					
Comparación	P	Suma de Rangos firmados (W)	Mediana de las diferencias	Correlación de Spearman (rs)	P (Spearman)
Fin vs Mitad	0,0098	45,00	651,1	0,5030	0,0720
Fin vs Inicio	0,0098	45,00	432,8	0,5758	0,0441

**Pregunta N°3:** No se observó una asociación estadísticamente significativa entre los valores iniciales de Tregs (mayores o menores a la mediana) y la probabilidad de suspender el tratamiento por recaída o finalizarlo exitosamente ( $P=0,2585$ ). El odds ratio fue de 0,31 (IC95%: 0,05–2,28) y el riesgo relativo de 0,52, sin significancia estadística. La sensibilidad fue baja (20%) y la especificidad moderada (55,6%), con valores predictivos positivos (VPP) y negativos de 33,3% y 38,5% respectivamente. Estos resultados no evidencian una capacidad predictiva clara del biomarcador en esta etapa del tratamiento (Tabla 21).

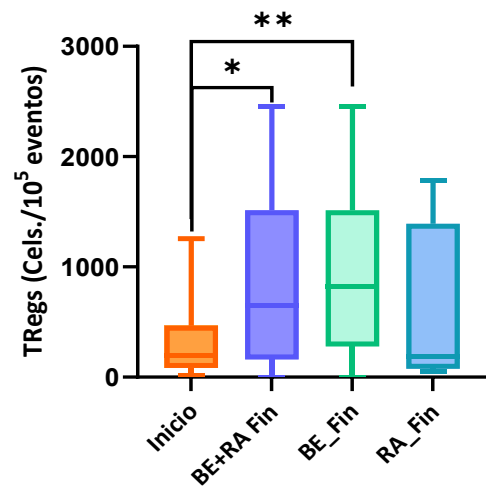
**Tabla 21. A) Relación entre los valores iniciales de Tregs y el desenlace clínico. B) Análisis estadístico de la relación entre los valores iniciales de Tregs y el desenlace clínico.**

A) Desenlace del tratamiento	Tregs Mayor	Tregs Menor	Total	B) Variable	Valor
Suspendió tratamiento por recaída	2	4	6	Valor P	0,2585
Finalizó tratamiento exitosamente	8	5	13	Riesgo Relativo	0,52 (0,15 – 142)
Total	10	9	19	Odds Ratio	0,31 (0,05 – 2,28)
				Sensibilidad	20% (0,04 – 0,51)
				Especificidad	55,6% (0,27 – 0,81)
				VPP	33,3% (0,06 – 0,7)
				VPN	38,5% (0,18 – 0,65)
				Razón de verosimilitud	0,45

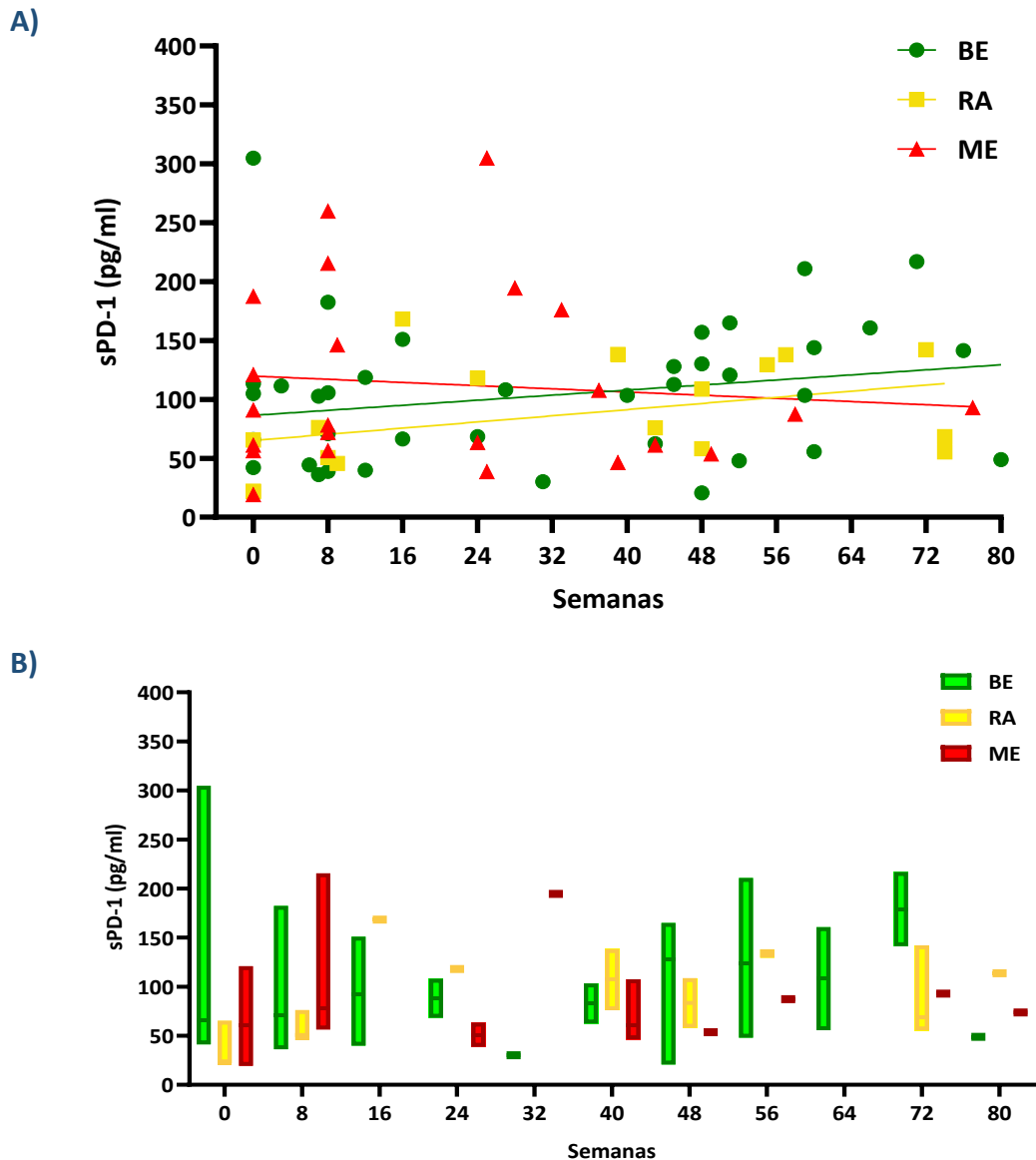
**Pregunta N°4:** Los análisis con el test de Mann-Whitney mostraron diferencias significativas en los valores de Tregs entre el inicio y el final del tratamiento en el grupo BE ( $P=0,0095$ ) y en el conjunto BE + RA ( $P=0,0256$ ). En el grupo RA no se observaron diferencias significativas ( $P=0,4259$ ). La mediana combinada inicial fue de 194,2, mientras que las medianas finales fueron de 823,6 en BE y 186,7 en RA. La diferencia de medianas fue positiva en BE y en BE + RA, pero no en RA. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos BE y RA al final del tratamiento ( $P=0,1868$ ) (Tabla 22 y Figura 30).

**Tabla 22. Comparación de Tregs al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA (Mann-Whitney)**

Comparación	BE+RA vs. Inicio	BE vs. Inicio	RA vs. Inicio
P	<b>0,0256</b>	<b>0,0095</b>	0,4259
Mediana de Grupo Final	648,9	823,6	186,7
Mediana Inicial	194,2		
Diferencia de Medianas	454,6	629,4	-7,550
U de Mann-Whitney	84	47	37



**Figura 30. Comparación de Tregs al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA**



**Figura 31. Evolución de los valores de sPD-1 durante el tratamiento**

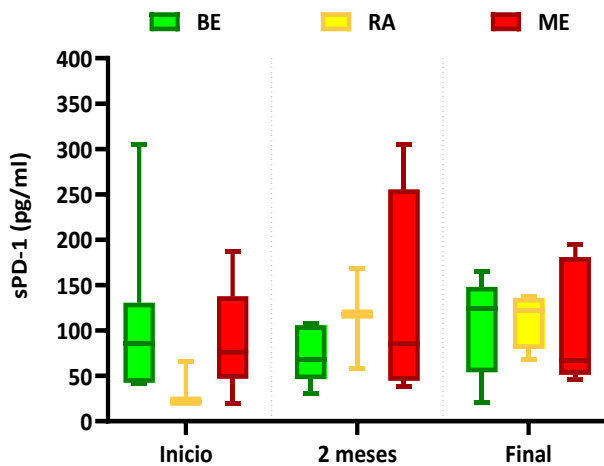
A) Dispersión semanal de sPD-1 en los tres grupos clínicos, con líneas de tendencia visuales.

B) Distribución y variabilidad semanal de sPD-1 por grupo clínico. Las barras indican mediana y rango.

La correlación de Spearman entre los valores de sPD-1 y el tiempo de tratamiento no mostró resultados estadísticamente significativos en ninguno de los grupos clínicos. En el grupo BE, el coeficiente de correlación fue  $r=0,2455$  ( $P=0,2342$ ), mientras que en RA fue  $r=0,3333$  ( $P=0,1927$ ) y en ME,  $r=0,1333$  ( $P=0,3718$ ). Estos resultados indican que no se observó una asociación significativa entre el tiempo de tratamiento y los niveles de sPD-1 en ninguno de los grupos evaluados.

*Nota aclaratoria: A diferencia de otros biomarcadores evaluados (CEC, CEP y Tregs), en el caso de sPD-1 se analizaron muestras correspondientes al inicio del tratamiento, a los 2 meses y al final del mismo. Esta decisión respondió a limitaciones en la disponibilidad de muestras y reactivos, lo que impidió realizar las determinaciones en el punto medio estándar (~24 semanas).*

**Pregunta N°1:** No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de sPD-1 entre los grupos clínicos (BE, RA y ME) en ninguno de los tres momentos evaluados del tratamiento: inicio ( $P=0,100$ ), a los dos meses ( $P=0,219$ ) y al final ( $P=0,940$ ). Asimismo, las comparaciones múltiples mediante el test de Dunn no revelaron diferencias significativas entre pares de grupos clínicos en ninguno de los momentos (Tabla 23, Figura 32).



**Figura 32: Valores de sPD-1 en los tres grupos clínicos en distintos momentos del tratamiento**  
Las barras indican la mediana y el rango.

Tabla 23: Análisis de sPD-1 según momento del tratamiento y evolución (Kruskal-Wallis y Dunn's Test)				
Momento del Tratamiento	Test Kruskal-Wallis	<i>P</i>	Comparaciones (Dunn)	<i>P</i>
Inicio	4,46	0,100	ME_Ini vs BE_Ini	0,999
			ME_Ini vs RA_Ini	0,319
			BE_Ini vs RA_Ini	0,111
2 meses	3,09	0,219	ME_2m vs BE_2m	0,248
			ME_2m vs RA_2m	0,797
			BE_2m vs RA_2m	0,999
Final	0,143	0,940	ME_Fin vs BE_Fin	0,999
			ME_Fin vs RA_Fin	
			BE_Fin vs RA_Fin	

**Pregunta N°2:** Los resultados del test de Friedman mostraron una diferencia significativa en los valores de sPD-1 a lo largo del tratamiento únicamente en el grupo RA ( $P=0,0417$ ), con un aumento significativo entre el inicio y el final del tratamiento ( $P=0,0400$ ), según el análisis post-hoc de Dunn. En los grupos BE ( $P=0,4907$ ) y ME ( $P=0,1416$ ), no se observaron diferencias significativas en ninguno de los momentos analizados (Tabla 24).

Posteriormente, se realizó un análisis adicional con el test de Wilcoxon para el grupo RA, que reveló una diferencia marginalmente significativa entre el inicio y el final del tratamiento ( $P=0,0625$ ), y no significativa entre los 2 meses y el final ( $P=0,1875$ ). La correlación de Spearman entre los valores de sPD-1 a los 2 meses y al final fue perfecta ( $r=1,000$ ,  $P=0,0417$ ), lo que sugiere una relación consistente en la evolución del biomarcador durante ese intervalo (Tabla 25).

Tabla 24: Análisis de sPD-1 en cada grupo de evolución clínica (Test de Friedman)				
Grupo	Friedman's test	P	Comparación	p (Dunn's)
BE	1,590	0,491	Ini vs 2m	>0,9999
			Ini vs Fin	>0,9999
			2m vs Fin	0,6563
RA	6,500	<b>0,0417</b>	Ini vs 2m	0,2313
			<b>Ini vs Fin</b>	<b>0,0400</b>
			2m vs Fin	>0,9999
ME	4,333	0,1416	Ini vs 2m	0,1299
			Ini vs Fin	>0,9999
			2m vs Fin	0,4467

Tabla 25: Análisis entre valores de sPD-1 al Final vs 2m e Inicio (Test de Wilcoxon)					
Comparación	P	Suma de Rangos firmados (W)	Mediana de las diferencias	Correlación de Spearman (rs)	P (Spearman)
Fin vs 2m	0,1875	6	38,09	1	0,0417
Fin vs Inicio	0,0625	10	78,06	0,6	0,2083

**Pregunta N°3:** El análisis de los valores iniciales de sPD-1 no mostró una asociación estadísticamente significativa con el desenlace clínico (suspensión por recaída o finalización exitosa del tratamiento) ( $P=ns$ ). Tanto el riesgo relativo como el odds ratio fueron de 1,000, sin diferencias entre los grupos. La sensibilidad fue del 30% y la especificidad del 70%, con valores predictivos positivos y negativos del 50%, lo que refleja una capacidad predictiva limitada del biomarcador en esta instancia. La distribución de pacientes con niveles altos y bajos de sPD-1 fue equitativa entre los grupos de desenlace (Tabla 26).

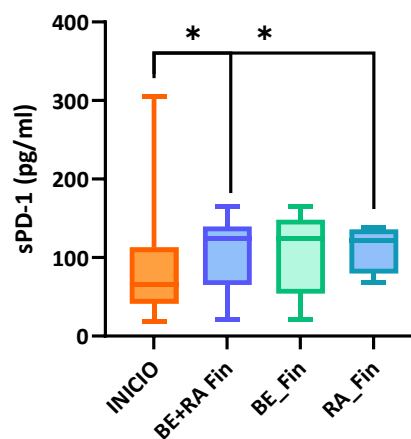
**Tabla 26. A) Relación entre los valores iniciales de sPD-1 y el desenlace clínico. B) Análisis estadístico de la relación entre los valores iniciales de sPD-1 y el desenlace clínico.**

A) Desenlace del tratamiento	sPD-1 Mayor	sPD-1 Menor	Total	B) Variable	Valor
Suspendió tratamiento por recaída	3	3	6	Valor P	-
Finalizó tratamiento exitosamente	7	7	14	Riesgo Relativo	1
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	Odds Ratio	1
				Sensibilidad	30% (0,11 - 0,60)
				Especificidad	70% (0,40 - 0,89)
				VPP	50%
				VPN	50% (0,27 - 0,73)
				Razón de verosimilitud	

**Pregunta N°4:** Los análisis con el test de Mann-Whitney mostraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de sPD-1 entre el inicio y el final del tratamiento en el grupo RA (P=0,0485) y en el conjunto BE + RA (P=0,0328). En el grupo BE no se alcanzó significancia (P=0,0914). La mediana combinada inicial fue de 65,31, mientras que las medianas finales fueron de 124,3 en ambos grupos (BE y RA). Las diferencias de medianas fueron positivas en todos los casos, con mayor magnitud en RA. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos BE y RA al final del tratamiento (Tabla 27, Figura 33).

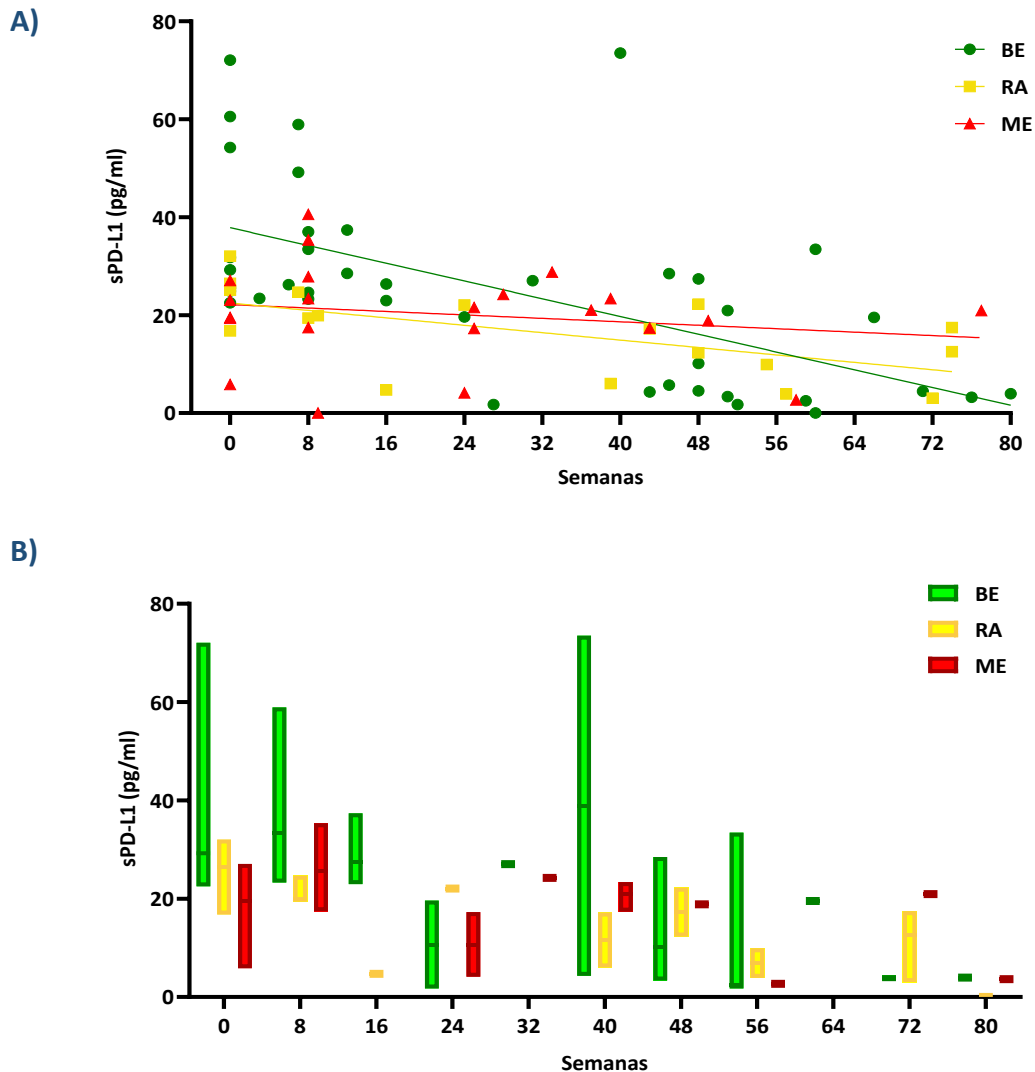
**Tabla 27. Comparación de sPD-1 al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA (Mann-Whitney)**

Comparación	BE+RA vs. Inicio	BE vs. Inicio	RA vs. Inicio
<b>P</b>	<b>0,0328</b>	0,0914	<b>0,0485</b>
<b>Mediana de Grupo Final</b>	124,3	124,3	121,6
<b>Mediana Inicial</b>	65,31		
<b>Diferencia de Medianas</b>	58,98	58,98	56,31
<b>U de Mann-Whitney</b>	87	69	18



**Figura 33. Comparación de sPD-1 al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA**

## soluble Programmed Death – Ligand 1



**Figura 34. Evolución de los valores de sPD-L1 durante el tratamiento**

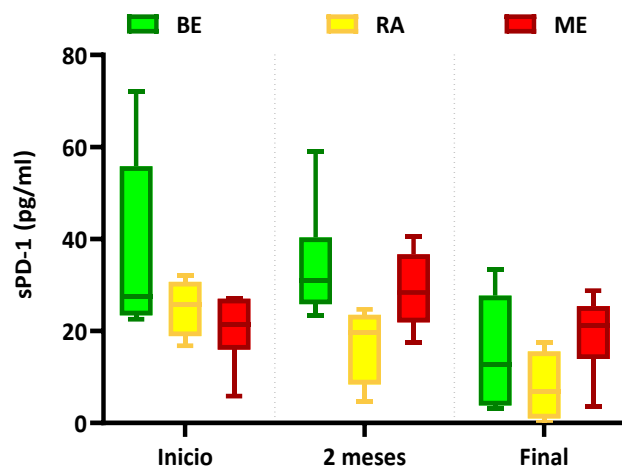
A) Dispersión semanal de sPD-L1 en los tres grupos clínicos, con líneas de tendencia visuales.

B) Distribución y variabilidad semanal de sPD-L1 por grupo clínico. Las barras indican mediana y rango.

La correlación de Spearman entre los niveles de sPD-L1 y el tiempo de tratamiento mostró una disminución significativa en los grupos de Buena Evolución ( $r=-0,7455$ ,  $P=0,0056$ ) y Recaída Alejada ( $r=-0,6833$ ,  $P=0,0252$ ), indicando una tendencia descendente de este biomarcador a lo largo del tratamiento. En el grupo de Mala Evolución, la correlación no fue significativa ( $r=-0,4333$ ,  $P=0,1250$ ).

*Nota aclaratoria: A diferencia de otros biomarcadores evaluados (CEC, CEP y Tregs), en el caso de sPD-L1 se analizaron muestras correspondientes al inicio del tratamiento, a los 2 meses y al final del mismo. Esta decisión respondió a limitaciones en la disponibilidad de muestras y reactivos, lo que impidió realizar las determinaciones en el punto medio estándar (~24 semanas).*

**Pregunta N°1:** Al comparar los valores de sPD-L1 entre los grupos clínicos (BE, RA y ME), no se encontraron diferencias significativas al inicio ( $P=0,1494$ ) ni al final del tratamiento ( $P=0,940$ ). Sin embargo, a los 2 meses, los niveles de sPD-L1 fueron significativamente mayores en el grupo BE en comparación con RA ( $P=0,0330$ , test de Dunn), lo que representa una diferencia transitoria entre ambos grupos durante esa etapa del tratamiento (Tabla 28, Figura 35).



**Figura 35: Valores de sPD-L1 en los tres grupos clínicos en distintos momentos del tratamiento**  
Las barras indican la mediana y el rango.

Tabla 28: Análisis de sPD-L1 según momento del tratamiento y evolución (Kruskal-Wallis y Dunn's Test)				
Momento del Tratamiento	Test Kruskal-Wallis	<i>P</i>	Comparaciones (Dunn)	<i>P</i>
Inicio	3,823	0,1494	ME_Ini vs BE_Ini	0,1524
			ME_Ini vs RA_Ini	>0,9999
			BE_Ini vs RA_Ini	>0,9999
2 meses	6,493	<b>0,0315</b>	ME_2m vs BE_2m	>0,9999
			ME_2m vs RA_2m	0,2207
			<b>BE_2m vs RA_2m</b>	<b>0,0330</b>
Final	0,143	0,940	ME_Fin vs BE_Fin	>0,9999
			ME_Fin vs RA_Fin	0,3191
			BE_Fin vs RA_Fin	0,6577

**Pregunta N°2:** Los resultados del test de Friedman mostraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos BE (P=0,0047) y RA (P=0,0417), y no significativas en el grupo ME (P=0,1416). En BE, las comparaciones post-hoc de Dunn indicaron una disminución significativa entre el inicio y el final (P=0,0304), y entre los 2 meses y el final del tratamiento (P=0,0156). En RA, se observó una diferencia significativa entre el inicio y el final (P=0,0400). El análisis adicional con el test de Wilcoxon mostró una disminución significativa de sPD-L1 en el grupo BE (P=0,0068) y una diferencia marginalmente significativa en el grupo RA (P=0,0625) (Tablas 29 y 30).

Tabla 29: Análisis de sPD-L1 en cada grupo de evolución clínica (Test de Friedman)				
Grupo	Friedman's test	P	Comparación	p (Dunn's)
BE	9,897	0,0047	Ini vs 2m	>0,9999
			Ini vs Fin	0,0304
			2m vs Fin	0,0156
RA	6,500	0,0417	Ini vs 2m	>0,9999
			Ini vs Fin	0,0400
			2m vs Fin	0,2313
ME	4,333	0,1416	Ini vs 2m	0,4467
			Ini vs Fin	>0,9999
			2m vs Fin	0,1299

Tabla 30: Análisis entre valores de sPD-L1 al Final vs Inicio (Test de Wilcoxon)					
Comparación Fin vs Inicio	P	Suma de Rangos firmados (W)	Mediana de las diferencias	Correlación de Spearman (rs)	P (Spearman)
BE	0,0068	-47,00	-21,01	-0,2606	0,2349
RA	0,0625	-10,00	-19,01	0,8	0,1667

**Pregunta N°3:** El test exacto de Fisher no mostró una asociación significativa (P=0,3142). El riesgo relativo fue de 0,5833 y el odds ratio de 0,3750, ambos sin alcanzar significancia. La sensibilidad fue del 20% y la especificidad del 60%, con un VPP de 33,3% y un VPN de 42,9%. Estos resultados no evidencian una capacidad predictiva adecuada del valor inicial de sPD-L1 para anticipar el desenlace del tratamiento (Tabla 31).

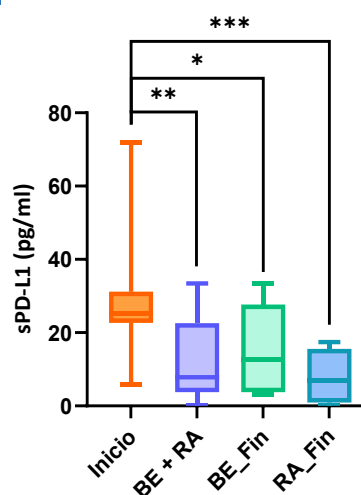
**Tabla 31: Relación entre los valores iniciales de sPD-L1 y la probabilidad de suspender por recaída o finalizar el tratamiento (Test Exacto de Fisher y Odds Ratio)**

A) Desenlace del tratamiento				B) Variable	
	sPD-L1 Mayor	sPD-L1 Menor	Total		Valor
Suspendió tratamiento por recaída	2	4	6	Valor p	0,3142
Finalizó tratamiento exitosamente	8	6	14	Riesgo Relativo	0,5833 (0,16 – 1,56)
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	Odds Ratio	0,375 (0,06 – 2,59)
				Sensibilidad	20% (0,03 - 0,51)
				Especificidad	60% (0,31 - 0,83)
				VPP	33% (0,06 – 0,7)
				VPN	43% (0,21 - 0,67)
				Razón de verosimilitud	0,5

**Pregunta N°4:** Los análisis con el test de Mann-Whitney mostraron una disminución significativa de los niveles de sPD-L1 entre el inicio y el final del tratamiento en el grupo BE (P=0,0175), en RA (P=0,0007) y en el conjunto BE + RA (P=0,0011). La mediana inicial combinada fue de 25,33, mientras que las medianas finales fueron de 12,62 en BE y 6,90 en RA. La diferencia de medianas fue negativa en todos los casos, reflejando una reducción sostenida del biomarcador hacia el final del tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos BE y RA al finalizar el tratamiento (Tabla 32, Figura 36).

**Tabla 32. Comparación de sPD-L1 al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA (Mann-Whitney)**

Comparación	BE+RA vs. Inicio	BE vs. Inicio	RA vs. Inicio
P	0,0011	0,0175	0,0007
Mediana de Grupo Final	7,8	12,62	6,90
Mediana Inicial	25,33		
Diferencia de Medianas	-17,53	-12,72	-18,43
U de Mann-Whitney	55	52	3



**Figura 36. Comparación de sPD-L1 al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA**

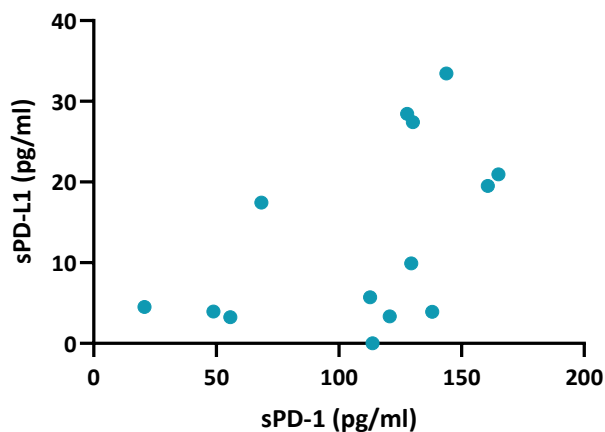
## Análisis conjunto de sPD-1 y sPD-L1

### Análisis de correlación de valores finales

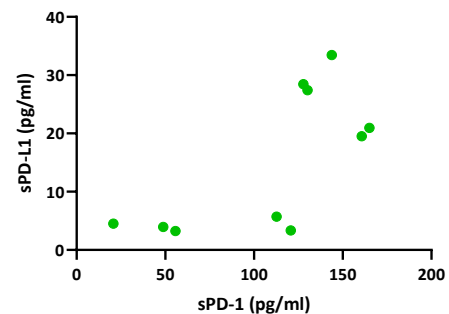
Se exploró la asociación entre los niveles finales de sPD-1 y sPD-L1 en los pacientes que finalizaron exitosamente la quimioterapia metronómica (grupos BE y RA), para evaluar si existe una relación funcional entre ambos biomarcadores al finalizar el tratamiento, lo cual podría aportar información sobre su comportamiento inmunológico conjunto.

El análisis de correlación de Spearman en el conjunto BE + RA mostró una correlación positiva significativa ( $r=0,504$ ,  $P=0,046$ ). Al analizar los grupos por separado, se observó una correlación positiva significativa en BE ( $r=0,660$ ,  $P=0,0438$ ), y una correlación negativa no significativa en RA ( $r=-0,400$ ,  $P=0,750$ ).

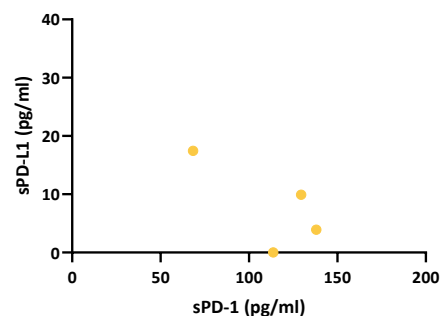
A)



B)



C)



**Figura 37: Análisis conjunto de sPD-1 y sPD-L1 al final del tratamiento en pacientes con buena evolución (BE) y recaída alejada (RA)**

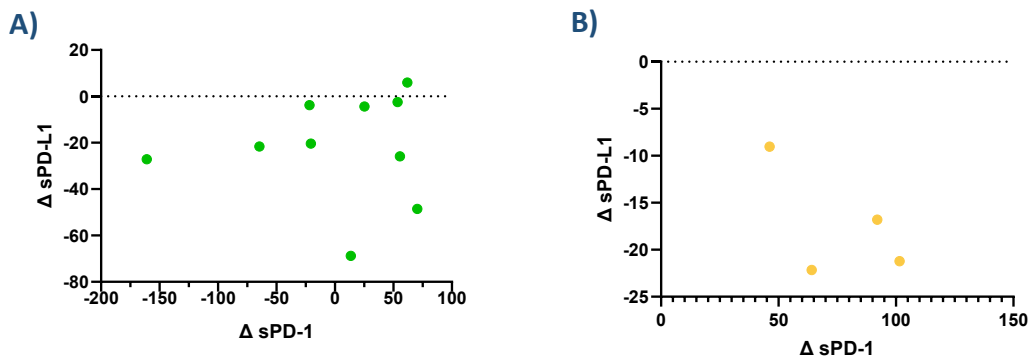
A) Correlación entre valores finales de sPD-1 y sPD-L1 en BE + RA, B) Correlación en el subgrupo BE y C) Correlación en el subgrupo RA

### Análisis de deltas entre sPD-1 y sPD-L1

Con el objetivo de explorar si existía una asociación entre los cambios individuales en los niveles de sPD-1 y sPD-L1 durante el tratamiento, se calculó el delta (valor final menos valor inicial) para cada biomarcador en los grupos BE y RA. Posteriormente, se analizó la correlación entre los deltas de ambos marcadores utilizando el test de Spearman.

Este enfoque permite evaluar si los pacientes que presentaron un aumento o disminución en sPD-1 tendieron a mostrar un cambio proporcional en sPD-L1, y viceversa, más

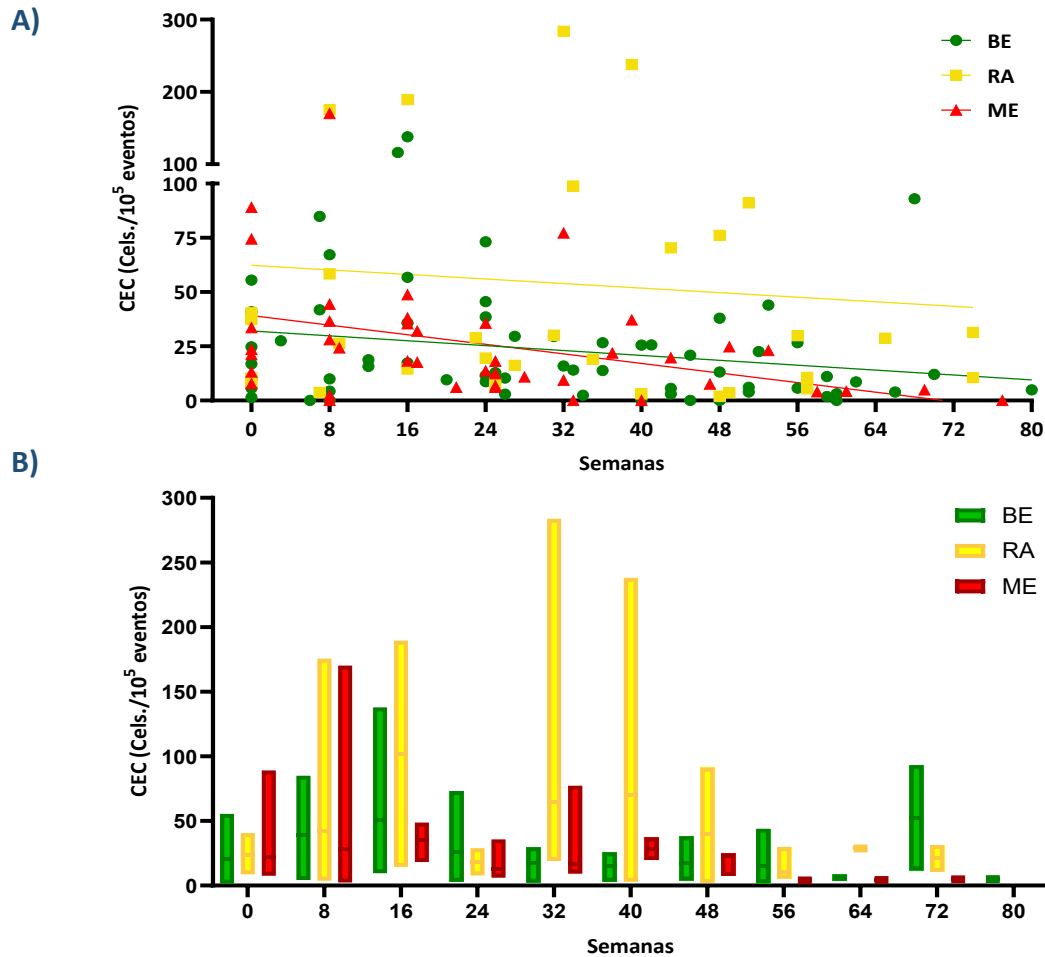
allá de los valores absolutos observados al final del tratamiento, con el objetivo de identificar patrones de cambio dinámico potencialmente relevantes. El análisis no mostró correlaciones estadísticamente significativas entre los deltas de sPD-1 y sPD-L1 en ninguno de los grupos clínicos evaluados.



**Figura 38. Correlación entre los cambios individuales (deltas) de sPD-1 y sPD-L1 en pacientes con buena evolución (BE) y recaída alejada (RA)**  
A) Dispersión de deltas en pacientes BE  
B) Dispersión de deltas en pacientes RA

# ANÁLISIS DE BIOMARCADORES RELACIONADOS A LA ANGIOGÉNESIS

## Células Endoteliales Circulantes



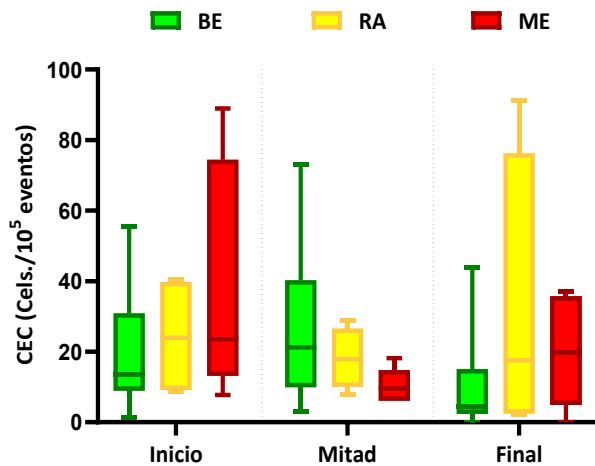
**Figura 39. Evolución de los valores de CEC durante el tratamiento**

A) Dispersión semanal de CEC en los tres grupos clínicos, con líneas de tendencia visuales.

B) Distribución y variabilidad semanal de CEC por grupo clínico. Las barras indican mediana y rango.

La correlación de Spearman entre los recuentos de CEC y el tiempo en semanas mostró una disminución significativa en el grupo de Mala Evolución ( $r=-0,8424$ ,  $P=0,0019$ ), indicando una tendencia descendente marcada a lo largo del tratamiento. En los grupos de Buena Evolución y Recaída Alejada también se observaron correlaciones negativas ( $r=-0,5000$  y  $r=-0,2848$ , respectivamente), pero estas no alcanzaron significancia estadística ( $P=0,0609$  y  $P=0,2135$ ). (Figura 39A).

**Pregunta N°1:** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos clínicos en ninguno de los tres momentos evaluados. El test de Kruskal-Wallis no mostró diferencias globales ( $P > 0,49$  en todos los casos), y las comparaciones post-hoc mediante el test de Dunn tampoco identificaron contrastes significativos entre pares de grupos. Estos resultados sugieren que los valores absolutos de CEC, en cada uno de los momentos considerados, no difirieron de manera significativa según la evolución clínica posterior del paciente. (Tabla 33 Figura 40).



**Figura 40: Valores de CEC en los tres grupos clínicos en distintos momentos del tratamiento**  
Las barras indican la mediana y el rango.

Tabla 33: Análisis de CEC según momento del tratamiento y evolución (Kruskal-Wallis y Dunn's Test)				
Momento del Tratamiento	Test Kruskal-Wallis	<i>P</i>	Comparaciones (Dunn)	<i>P</i>
Inicio	1,318	0,5371	ME_Ini vs BE_Ini	0,7571
			ME_Ini vs RA_Ini	>0,9999
			BE_Ini vs RA_Ini	>0,9999
Mitad	1,300	0,5443	ME_Mid vs BE_Mid	0,7806
			ME_Mid vs RA_Mid	>0,9999
			BE_Mid vs RA_Mid	>0,9999
Final	1,485	0,4919	ME_Fin vs BE_Fin	0,7323
			ME_Fin vs RA_Fin	>0,9999
			BE_Fin vs RA_Fin	>0,9999

**Pregunta N°2:** No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de CEC a lo largo del tratamiento en ninguno de los tres grupos clínicos. El test de Friedman no mostró cambios globales significativos entre los tres momentos (inicio, mitad y final), y las comparaciones post-hoc mediante el test de Dunn tampoco revelaron diferencias entre pares de momentos dentro de cada grupo (Tabla 34).

Tabla 34. Análisis de CEC en cada grupo de evolución clínica (Test de Friedman)				
Grupo	Friedman's test	<i>p</i>	Comparación	<i>p</i> (Dunn's)
BE	4,200	0,1352	Ini vs Mid	0,5391
			Ini vs Fin	>0,9999
			Mid vs Fin	0,1325
RA	0,5000	0,9306	Ini vs Mid	>0,9999
			Ini vs Fin	>0,9999
			Mid vs Fin	>0,9999
ME	2,571	0,3046	Ini vs Mid	0,3264
			Ini vs Fin	>0,9999
			Mid vs Fin	>0,9999

**Pregunta N°3:** No se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los valores iniciales de CEC y la probabilidad de suspender el tratamiento por recaída o finalizarlo exitosamente ( $P=0,2214$ ). Sin embargo, el odds ratio estimado fue de 3,33 y el riesgo relativo de 1,667, lo que sugiere que los pacientes con valores elevados de CEC al inicio tendrían un mayor riesgo de suspensión del tratamiento, aunque sin alcanzar significancia estadística (IC95%: 0,56–20,10).

Por otro lado, el VPP indica que los pacientes con CEC elevados al inicio tienen una probabilidad del 71,4% de suspender el tratamiento por recaída. En contraste, el VPN fue del 57,1%, indicando una probabilidad moderada de finalizar exitosamente el tratamiento en aquellos con valores bajos de CEC (Tabla 35).

**Tabla 35. A) Relación entre los valores iniciales de CEC y el desenlace clínico. B) Análisis estadístico de la relación entre los valores iniciales de CEC y el desenlace clínico**

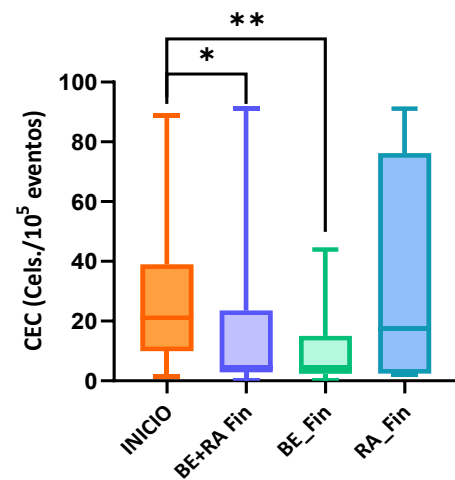
A) Desenlace del tratamiento	CEC Mayor	CEC Menor	Total
Suspendió tratamiento por recaída	5	2	7
Finalizó tratamiento exitosamente	6	8	14
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>21</b>

B) Variable	Valor
Valor <i>p</i>	0,2214
Riesgo Relativo	1,667 (0,72 – 3,64)
Odds Ratio	3,33 (0,56 – 20,10)
Sensibilidad	0,45 (0,21 – 0,72)
Especificidad	0,8 (0,49 – 0,96)
VPP	71,43% (0,36 - 0,95)
VPN	57,14% (0,33 – 0,79)
Razón de verosimilitud	2,273

**Pregunta N°4:** Los análisis con el test de Mann-Whitney mostraron una reducción significativa en los valores de CEC entre el inicio y el final del tratamiento en el conjunto de pacientes que finalizaron exitosamente la QTM (BE + RA) (P=0,0110). Esta disminución fue particularmente significativa en el grupo BE (P=0,0034), mientras que en RA no se alcanzó significancia estadística (P=0,3739). La mediana inicial combinada fue de 21,16, en comparación con una mediana final de 4,45 en BE, y de 17,56 en RA. No se observaron diferencias significativas entre los valores finales de CEC en los grupos BE y RA (P=0,6124) (Tabla 36, Figura 41).

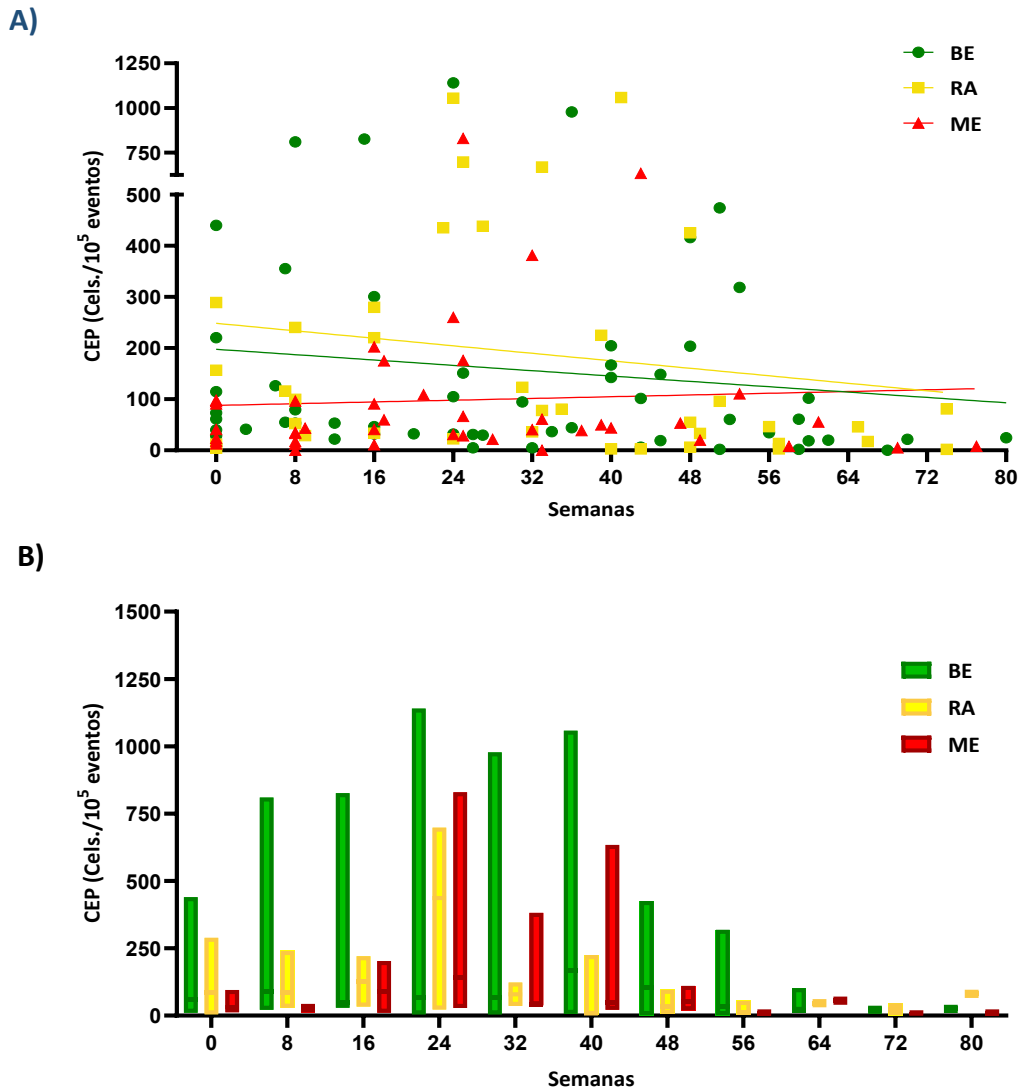
**Tabla 36. Comparación de CEC al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA (Mann-Whitney)**

Comparación	BE+RA vs. Inicio	BE vs. Inicio	RA vs. Inicio
P	0,0110	0,0034	0,3739
Mediana de Grupo Final	4,45	4,45	17,56
Mediana Inicial	21,16		
Diferencia de Medianas	-16,71	-16,71	-3,60
de Mann-Whitney	79,50	42,20	37



**Figura 41. Comparación de CEC al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA**

## Células Endoteliales Progenitoras



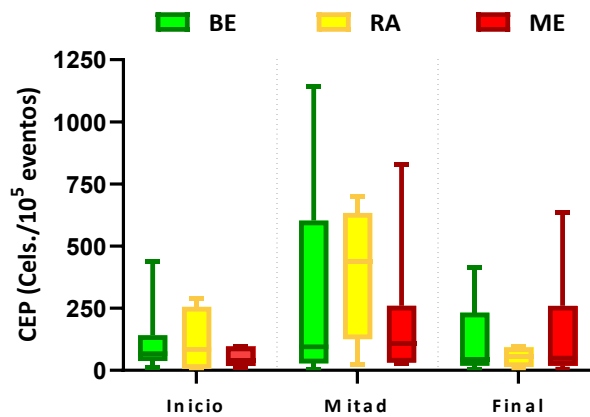
**Figura 42. Evolución de los valores de CEP durante el tratamiento**

A) Dispersión semanal de CEP en los tres grupos clínicos, con líneas de tendencia visuales.

B) Distribución y variabilidad semanal de CEP por grupo clínico. Las barras indican mediana y rango.

La correlación de Spearman entre los recuentos de CEP y el tiempo en semanas mostró una tendencia descendente en los tres grupos de evolución clínica. Esta disminución fue estadísticamente significativa en los grupos de Buena Evolución ( $r=-0,6545$ ,  $P=0,0168$ ) y Recaída Alejada ( $r=-0,6818$ ,  $P=0,0126$ ), indicando un descenso sostenido de CEP durante el tratamiento en ambos casos. En el grupo de Mala Evolución, si bien también se observó una correlación negativa ( $r=-0,4636$ ), esta no fue estadísticamente significativa ( $P=0,0773$ ).

**Pregunta N°1:** No se observaron diferencias significativas en ninguno de los momentos evaluados (inicio:  $P=0,6519$ ; mitad:  $P=0,7473$ ; final:  $P=0,9823$ ). Las comparaciones múltiples tampoco revelaron diferencias significativas entre los grupos BE, RA y ME (Tabla 37, Figura 43).



**Figura 43:** Valores de CEP en los tres grupos clínicos en distintos momentos del tratamiento  
Las barras indican la mediana y el rango.

Tabla 37: Análisis de CEP según momento del tratamiento y evolución (Kruskal-Wallis y Dunn's Test)				
Momento del Tratamiento	Test Kruskal-Wallis	$p$	Comparaciones (Dunn)	$P$
Inicio	0,9139	0,6519	ME_Ini vs BE_Ini	>0,9999
			ME_Ini vs RA_Ini	
			BE_Ini vs RA_Ini	
Mitad	0,6367	0,7473	ME_Mid vs BE_Mid	
			ME_Mid vs RA_Mid	
			BE_Mid vs RA_Mid	
Final	0,04082	0,9823	ME_Fin vs BE_Fin	
			ME_Fin vs RA_Fin	
			BE_Fin vs RA_Fin	

**Pregunta N°2:** No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de CEP a lo largo del tratamiento en ninguno de los tres grupos clínicos. El test de Friedman no mostró cambios globales significativos entre los tres momentos (inicio, mitad y final), y las comparaciones post-hoc mediante el test de Dunn tampoco revelaron diferencias entre pares de momentos dentro de cada grupo (Tabla 38).

Tabla 38: Análisis de CEP en cada grupo de evolución clínica (Test de Friedman)				
Grupo	Friedman's test	p	Comparación	P (Dunn's)
BE	1,400	0,6013	Ini vs Mid	0,7907
			Ini vs Fin	>0,9999
			Mid vs Fin	>0,9999
RA	3,500	0,2731	Ini vs Mid	0,4719
			Ini vs Fin	>0,9999
			Mid vs Fin	0,2313
ME	1,852	0,4230	Ini vs Mid	>0,9999
			Ini vs Fin	>0,9999
			Mid vs Fin	0,5443

**Pregunta N°3:** No se observó una asociación estadísticamente significativa entre los valores iniciales de CEP (mayores o menores a la mediana) y la probabilidad de suspender el tratamiento por recaída o finalizarlo exitosamente (P=0,4381). El odds ratio fue de 0,56 (IC95%: 0,11–3,20) y el riesgo relativo de 0,75, sin diferencias significativas. La sensibilidad fue baja (27%) y la especificidad moderada (60%), con valores predictivos positivos y negativos de 42,86%. En conjunto, estos resultados no muestran evidencia concluyente de asociación entre los niveles iniciales de CEP y el desenlace clínico final (Tabla 39).

**Tabla 39. A) Relación entre los valores iniciales de CEP y el desenlace clínico. B) Análisis estadístico de la relación entre los valores iniciales de CEP y el desenlace clínico**

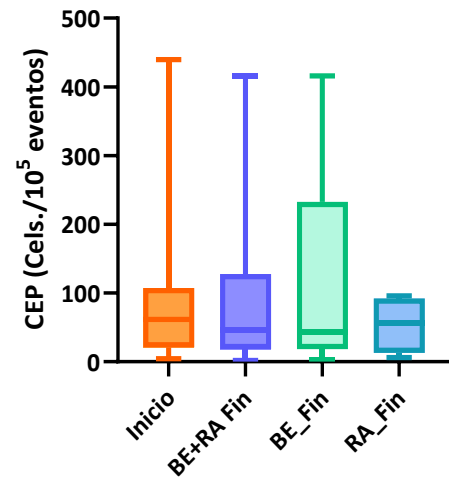
A) Desenlace del tratamiento	CEP Mayor	CEP Menor	Total	B) Variable	Valor
Suspendió tratamiento por recaída	3	4	7	Valor p	0,4381
Finalizó tratamiento exitosamente	8	6	14	Riesgo Relativo	0,75 (0,26 - 1,74)
Total	11	10	21	Odds Ratio	0,56 (0,11 - 3,20)
				Sensibilidad	0,27 (0,09 - 0,57)
				Especificidad	0,60 (0,31 - 0,83)
				VPP	42,86% (0,16 - 0,75)
				VPN	42,86 (0,21 - 0,67)
				Razón de verosimilitud	0,682

**Pregunta N°4:** Los análisis con el test de Mann-Whitney no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de CEP entre el inicio y el final del tratamiento en los grupos BE (P=0,4917), RA (P=0,2960) ni en el conjunto BE + RA (P=0,3880). La mediana combinada inicial fue de 61,46, mientras que las medianas finales fueron de 42,86 en BE y 56,93 en RA. Las diferencias de medianas fueron negativas en ambos casos, pero no

alcanzaron significancia estadística. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos BE y RA al final del tratamiento (P=0,6421) (ver Tabla 40 y Figura 44).

**Tabla 40, Comparación de CEP al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA (U de Mann-Whitney)**

Comparación	BE+RA vs. Inicio	BE vs. Inicio	RA vs. Inicio
<b>P</b>	0,388	0,4917	0,2960
<b>Mediana de Grupo Final</b>	46,98	42,86	56,93
<b>Mediana Inicial</b>	61,46		
<b>Diferencia de Medianas</b>	-14,48	-18,6	-4,53
<b>U de Mann-Whitney</b>	138	104	34



**Figura 44. Comparación de CEP al inicio y final del tratamiento en grupos BE y RA**

## ANÁLISIS BIOMARCADORES SÉRICOS RELACIONADOS A LA ANGIOGÉNESIS

En esta sección se presentan los resultados correspondientes a los biomarcadores VEGF-2, sVEGFR-2, TSP-1 y bFGF, seleccionados por su papel en la regulación de la angiogénesis y el microambiente tumoral. A diferencia de los biomarcadores analizados previamente, el número de determinaciones disponibles fue considerablemente menor debido a la disponibilidad limitada de kits comerciales y a la cantidad restringida de muestras procesadas. En total, se analizaron muestras correspondientes a 9 pacientes, distribuidos de la siguiente manera: 2 del grupo ME, 2 del grupo RA y 5 del grupo BE.

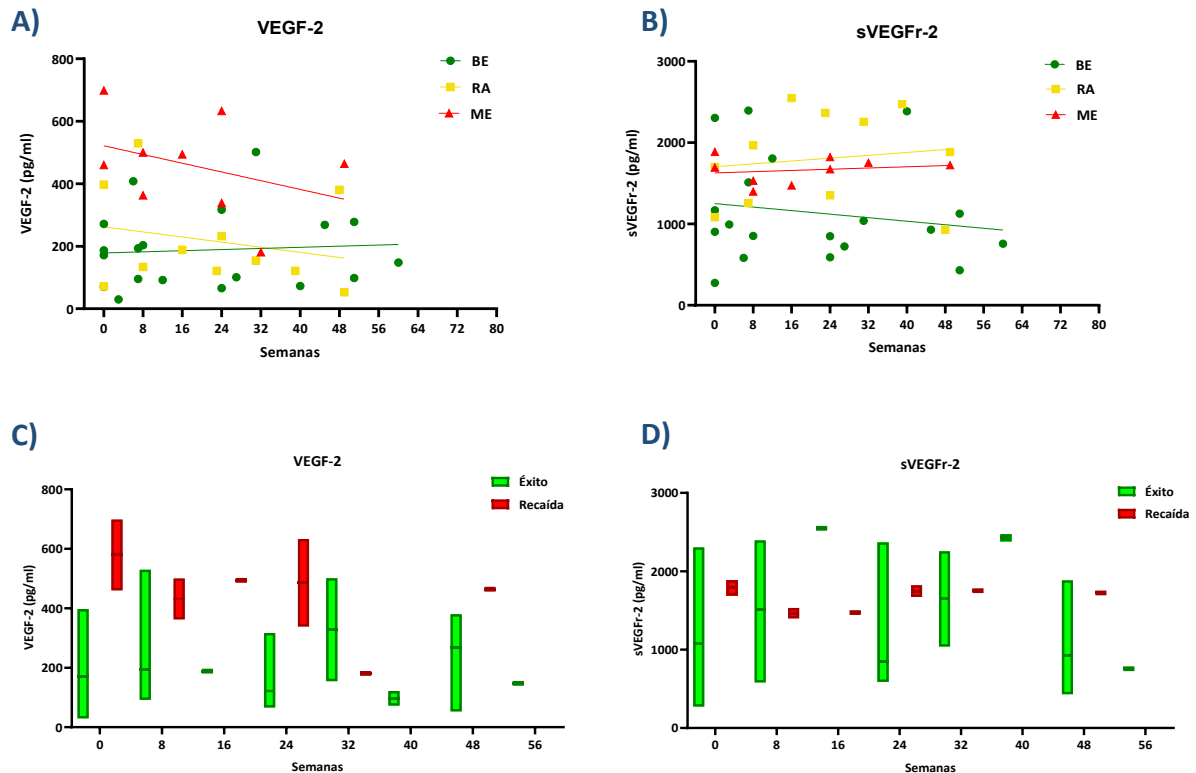
Dado el tamaño reducido de la cohorte y la ausencia de datos completos al finalizar la QTM, resultó inviable realizar una discriminación confiable según los tres grupos clínicos previamente establecidos (ME, BE y RA). Por ello, se adoptó una estrategia de reagrupamiento, clasificando a los pacientes en dos categorías según su desenlace clínico durante el tratamiento: Éxito (finalizaron el tratamiento sin recaída, n=7) y Recaída (n=2). Esta estratificación permite una interpretación más directa de los biomarcadores en relación con la respuesta terapéutica observada.

Frente a estas limitaciones metodológicas, se adoptó un enfoque estadístico ajustado, basado en pruebas de correlación (Spearman), análisis de varianza de dos vías (2-way ANOVA) y comparación de medianas mediante la prueba de U de Mann-Whitney. Esta estrategia permitió aprovechar al máximo la información disponible, manteniendo el rigor analítico necesario para explorar posibles tendencias, sin perder de vista las limitaciones existentes para la interpretación y extrapolación clínica de los hallazgos.

Cabe señalar que algunos de los análisis exploratorios estuvieron condicionados por el reducido número de muestras en el subgrupo de pacientes que posteriormente recayeron. Esto afectó la estabilidad de las medidas centrales (como medianas o medias), redujo la potencia estadística de los test aplicados y limitó la posibilidad de generalizar los resultados. Sin embargo, se incluyen estos análisis por su potencial utilidad para generar hipótesis clínicas futuras, en particular sobre el posible rol de los biomarcadores angiogénicos como predictores tempranos de recaída.

## VEGF-2 & sVEGFr-2

Ambos biomarcadores fueron evaluados de forma conjunta debido a su participación complementaria en la regulación del proceso angiogénico. El análisis simultáneo de sus niveles permite explorar posibles desbalances en la señalización angiogénica que podrían estar vinculados al desenlace clínico de los pacientes tratados con quimioterapia metronómica.



**Figura 45. Evaluación de VEGF-2 y sVEGFR-2 durante el tratamiento**

A) y B) Dispersión de valores de VEGF-2 y sVEGFR-2 a lo largo del tratamiento en los grupos clínicos.

C) y D) Distribución de valores de VEGF-2 y sVEGFR-2 agrupados por semana y grupo clínico.

Las barras indican la mediana y el rango para cada punto de tiempo.

Para profundizar la interpretación de los patrones observados en la Figura 45, se evaluó la asociación entre los niveles de VEGF-2 y sVEGFR-2 y el tiempo de tratamiento mediante el coeficiente de correlación de Spearman en cada grupo clínico (Tabla 41). No se observaron correlaciones estadísticamente significativas, aunque se identificaron coeficientes negativos en ambos biomarcadores, con mayor magnitud en el grupo Recaída.

**Tabla 41. Correlación entre biomarcadores y el tiempo de tratamiento (r Spearman)**

Correlación	VEGF-2 (Éxito)	VEGF-2 (Recaída)	sVEGFR-2 (Éxito)	sVEGFR-2 (Recaída)
<b>r Spearman</b>	-0,3095	-0,5429	-0,4286	-0,0286
<b>P</b>	0,2309	0,1486	0,1496	0,5000

A continuación, se aplicó un análisis de varianza de dos vías (2-way ANOVA) para determinar el impacto del grupo clínico y del tiempo sobre los niveles de cada biomarcador. Para VEGF-2, se evidenció un efecto significativo del grupo clínico ( $P=0,0002$ ), sin efecto del tiempo ( $P=0,9833$ ). En sVEGFR-2, no se encontraron efectos significativos, aunque el tiempo explicó un mayor porcentaje de variación que el grupo (Tabla 42).

**Tabla 42. Análisis de varianza de dos vías (2-way ANOVA) para VEGF-2 y sVEGFR-2 según grupo clínico y tiempo de tratamiento**

Biomarcador	Fuente de Variación	% de Variación Total	P	F (DFn, DFd)
<b>VEGF-2</b>	Semanas	2,684	0,9833	F (7,30) = 0,1990
	<b>Grupo</b>	35,19	<b>0,0002</b>	F (1,30) = 18,26
<b>sVEGFR-2</b>	Semanas	25,90	0,1806	F (7,30) = 1,577
	Grupo	3,317	0,2438	F (1,30) = 1,413

Se evaluó si los niveles iniciales de VEGF-2 y sVEGFR-2 diferían entre los grupos clínicos al momento de iniciar el tratamiento. Para ello, se aplicó una prueba de U de Mann-Whitney de una cola, basada en la hipótesis de que los pacientes que recayeron presentarían valores más elevados desde el inicio. Los resultados se presentan en la Tabla 43.

**Tabla 43. Comparación de los valores iniciales de VEGF-2 y sVEGFR-2 entre los grupos Éxito y Recaída mediante la prueba de Mann-Whitney (una cola).**

Biomarcador	Grupo Recaída (mediana)	Grupo Éxito (mediana)	p	Diferencia de medianas	Hodges-Lehmann
<b>VEGF-2</b>	579,4	171,5	<b>0,0278</b>	407,9	408,4
<b>sVEGFR-2</b>	1790,0	1084,0	0,1667	706,2	709,6

Finalmente, y considerando que el análisis de varianza mostró un efecto significativo del grupo clínico sobre los niveles de VEGF-2 sin interacción con el tiempo, se planteó la hipótesis de que los pacientes con recaída podrían haber presentado valores más elevados de VEGF-2 y sVEGFR-2 a lo largo del tratamiento.

**Tabla 44. Comparación global de todos los valores de VEGF-2 y sVEGFR-2 entre los grupos Éxito y Recaída mediante la prueba de Mann-Whitney (una cola)**

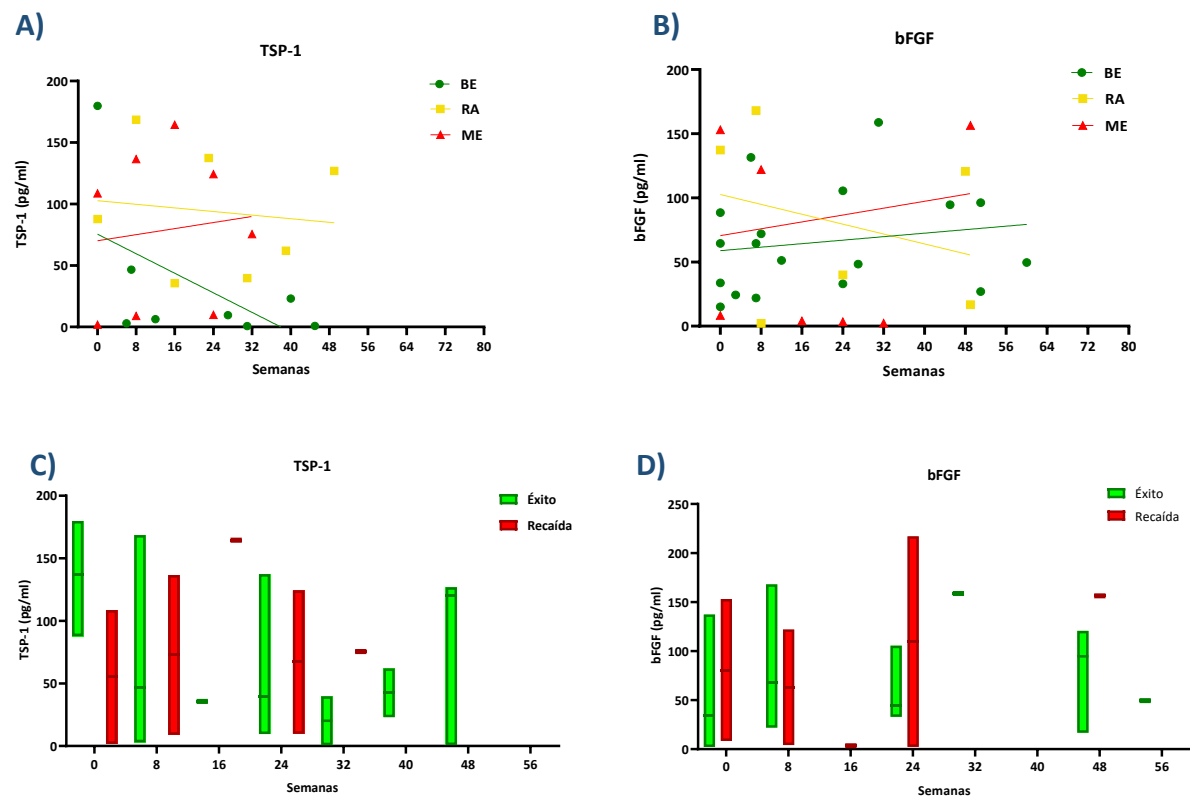
Biomarcador	Grupo Recaída (mediana)	Grupo Éxito (mediana)	p	Diferencia de medianas	Hodges-Lehmann
<b>VEGF-2</b>	494,1	163,0	<b>0,0001</b>	331,1	263,8
<b>sVEGFR-2</b>	1752	1147	0,0887	605,7	494,1

Para explorar esta diferencia, se realizó una prueba de U de Mann-Whitney de una cola, agrupando todas las determinaciones disponibles según grupo clínico, sin discriminar el momento del tratamiento. Se observó una diferencia estadísticamente significativa para

VEGF-2 ( $P=0,0001$ ), con valores más altos en el grupo Recaída. En el caso de sVEGFR-2, la diferencia no fue significativa ( $P=0,0887$ ), aunque los valores también fueron mayores en Recaída (Tabla 44). Este análisis complementario refuerza los hallazgos previos y confirma diferencias observables entre los grupos clínicos en los niveles de estos biomarcadores angiogénicos.

## TSP-1 & bFGF

De manera análoga al análisis previo, se evaluaron los niveles de TSP-1 y bFGF en pacientes clasificados según su evolución clínica en Recaída y Éxito.



**Figura 46. Evaluación de TSP-1 y bFGF durante el tratamiento**

A) y B) Dispersión de valores de TSP-1 y bFGF a lo largo del tratamiento en los grupos clínicos.  
 C) y D) Distribución de valores de TSP-1 y bFGF agrupados por semana y grupo clínico.  
 Las barras indican la mediana y el rango para cada punto de tiempo.

La Figura 46 muestra la evolución de los niveles de TSP-1 y bFGF durante el tratamiento, diferenciados por grupo clínico. Para explorar si existían tendencias temporales o diferencias asociadas al desenlace clínico, se realizaron análisis estadísticos complementarios.

Se evaluó la asociación entre los niveles de TSP-1 y bFGF y el tiempo de tratamiento mediante el coeficiente de correlación de Spearman (Tabla 45). No se observaron correlaciones estadísticamente significativas, aunque bFGF mostró una tendencia positiva en Recaída ( $r=0,6000$ ), y TSP-1 también presentó coeficientes positivos en Recaída.

**Tabla 45. Correlación entre biomarcadores y el tiempo de tratamiento (r Spearman)**

Correlación	VEGF-2 (Éxito)	VEGF-2 (Recaída)	sVEGFR-2 (Éxito)	sVEGFR-2 (Recaída)
<b>r Spearman</b>	-0,2857	0,5000	-0,1429	0,6000
<b>P</b>	0,2780	0,2250	0,4014	0,1750

El análisis de varianza de dos vías (Tabla 46) no reveló efectos significativos del grupo clínico ni del tiempo sobre los niveles de TSP-1 (P=0,9841 y P=0,8614, respectivamente) ni de bFGF (P=0,2790 y P=0,5294).

**Tabla 46. Análisis de varianza de dos vías (2-way ANOVA) para TSP-1 y bFGF según grupo clínico y tiempo de tratamiento**

Biomarcador	Fuente de Variación	% de Variación Total	P	F (DFn, DFd)
<b>TSP-1</b>	Semanas	11,51	0,8614	F (6, 19) = 0,4127
	Grupo	0,002	0,9841	F (1, 19) = 0,0004
<b>bFGF</b>	Semanas	17,71	0,5294	F (6, 24) = 0,8725
	Grupo	4,51	0,2790	F (1, 24) = 1,2270

Se evaluó si los niveles iniciales de TSP-1 y bFGF diferían entre los grupos clínicos mediante la prueba de Mann-Whitney de una cola (Tabla 47). No se encontraron diferencias significativas. En bFGF se observó una mediana más alta en el grupo Recaída, mientras que en TSP-1 fue más alta en Éxito, aunque sin alcanzar significación estadística.

**Tabla 47. Comparación de los valores iniciales de TSP-1 y bFGF entre los grupos Éxito y Recaída mediante la prueba de Mann-Whitney (una cola)**

Biomarcador	Grupo Recaída (mediana)	Grupo Éxito (mediana)	p	Diferencia de medianas	Hodges-Lehmann
<b>TSP-1</b>	55,17	137,3	0,200	82,11	78,65
<b>bFGF</b>	80,70	33,74	0,444	-46,96	-10,98

Finalmente, se compararon todas las determinaciones disponibles de TSP-1 y bFGF entre los grupos Éxito y Recaída, sin discriminar el momento del tratamiento, mediante la prueba de U de Mann-Whitney de una cola (Tabla 48). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas, aunque se mantuvo una tendencia hacia mayores niveles de bFGF en Recaída.

**Tabla 48. Comparación global de todos los valores de TSP-1 y bFGF entre los grupos Éxito y Recaída mediante la prueba de Mann-Whitney (una cola)**

Biomarcador	Grupo Recaída (mediana)	Grupo Éxito (mediana)	p	Diferencia de medianas	Hodges-Lehmann
<b>TSP-1</b>	92,03	46,55	0,4896	-45,49	-0,656

<b>bFGF</b>	65,17	57,88	0,4374	-7,283	8,915
-------------	-------	-------	--------	--------	-------

## DISCUSIÓN

### DISCUSIÓN DE BIOMARCADORES EN PACIENTES DE ALTO RIESGO

En los últimos años, la oncología pediátrica ha avanzado hacia enfoques terapéuticos más individualizados, que integran datos clínicos y moleculares con el objetivo de optimizar la respuesta al tratamiento y mejorar los desenlaces. Sin embargo, la identificación de biomarcadores robustos que permitan predecir la evolución tumoral y guiar decisiones terapéuticas sigue representando un desafío central en esta población (Lawler et al., 2024). A diferencia de los adultos, los tumores pediátricos presentan particularidades biológicas y respuestas inmunológicas diferenciadas, lo que exige validaciones específicas para esta población (Kuhlen & Frühwald, 2025).

En este contexto, la quimioterapia metronómica —basada en la administración frecuente y sostenida de fármacos en dosis bajas sin períodos prolongados de descanso— ha emergido como una estrategia terapéutica prometedora. Sus mecanismos trascienden el efecto citotóxico directo, incluyendo acciones antiangiogénicas e inmunomoduladoras (André & Pasquier, 2014). En modelos pediátricos, diversos estudios han sugerido que la QTM puede inducir un remodelado favorable del microambiente tumoral, modulando la vascularización y regulando poblaciones celulares inmunes como los linfocitos T reguladores (Tregs) y la vía PD-1/PD-L1 (Peyrl et al., 2023). Si bien los resultados clínicos reportados en distintos estudios son alentadores, la falta de biomarcadores validados limita la posibilidad de monitorear la respuesta terapéutica y personalizar el tratamiento en la población pediátrica, en concordancia con revisiones recientes que subrayan el carácter aún exploratorio de estos indicadores en oncología infantil (Banchi et al., 2022; Chou et al., 2024).

Sus mecanismos trascienden el efecto citotóxico directo, incluyendo acciones antiangiogénicas e inmunomoduladoras (André & Pasquier, 2014). En modelos pediátricos, diversos estudios han sugerido que la QTM puede inducir un remodelado favorable del microambiente tumoral, modulando la vascularización y regulando poblaciones celulares inmunes como los linfocitos T reguladores (Tregs) y la vía PD-1/PD-L1 (Peyrl et al., 2023)

En línea con estos hallazgos, biomarcadores circulantes como VEGF-2, sVEGFR-2, TSP-1, bFGF, Tregs, sPD-1 y sPD-L1 han adquirido relevancia por su potencial para reflejar dinámicamente el estado tumoral y la respuesta terapéutica, sin necesidad de procedimientos invasivos. Su caracterización funcional comienza a consolidarse como una vía posible para personalizar las intervenciones, mejorar el monitoreo y anticipar desenlaces clínicos adversos en oncología pediátrica (Marayati et al., 2019; Lau et al., 2024).

Este estudio propone contribuir a ese proceso, explorando un modelo integrado de evaluación basado en biomarcadores seleccionados por su relevancia funcional en el

microambiente tumoral pediátrico. La discusión se centró especialmente en los hallazgos obtenidos en el subgrupo de pacientes con enfermedad de alto riesgo, donde se analizaron, de manera descriptiva y exploratoria, la dinámica de estos marcadores y su posible valor clínico.

Dado que las respuestas tumorales e inmunológicas en niños pueden diferir sustancialmente de las observadas en adultos, esta investigación aportó observaciones preliminares sobre el comportamiento de los biomarcadores en un contexto pediátrico real, aún poco explorado. Si bien se trata de un estudio con alcance exploratorio, los resultados obtenidos sugieren tendencias que podrían orientar futuras investigaciones, particularmente en el desarrollo de estrategias de monitoreo más personalizadas para pacientes con enfermedad de alto riesgo.

En conjunto, los hallazgos no pretenden establecer conclusiones definitivas, sino proponer un enfoque de análisis que permita identificar patrones biológicos potencialmente útiles en la práctica clínica. Este trabajo sienta así una base inicial sobre la cual avanzar hacia validaciones posteriores en cohortes más amplias, con el objetivo final de contribuir a una mejor comprensión del valor clínico de los biomarcadores seleccionados en la oncología pediátrica.

La adecuada clasificación de los biomarcadores es esencial para interpretar su valor clínico y definir su aplicabilidad en oncología pediátrica. Un biomarcador pronóstico aporta información sobre el riesgo de evolución adversa, independientemente del tratamiento, y permite estratificar a los pacientes desde el inicio. Un biomarcador predictivo de respuesta indica la probabilidad de que un paciente responda favorablemente a una terapia específica, orientando decisiones personalizadas. Por último, un biomarcador dinámico o de monitoreo refleja cambios biológicos a lo largo del tiempo y permite evaluar, en tiempo real, el impacto del tratamiento o anticipar recaídas subclínicas.

Esta distinción, lejos de ser un ejercicio académico, resulta clave en el contexto de la quimioterapia metronómica, donde los mecanismos de acción son progresivos y multifactoriales, y donde un uso adecuado de biomarcadores podría transformar la forma en que se monitorea, ajusta y predice la respuesta terapéutica en niños con cáncer.

Bajo este marco, los resultados de este estudio se analizarán considerando el valor pronóstico, predictivo o dinámico de cada biomarcador, integrando su interpretación dentro de un modelo funcional coherente. Antes de abordar el análisis individual, se presentarán las consideraciones metodológicas y clínicas que, en este contexto, pueden influir de forma significativa en la variabilidad observada y en la lectura de los resultados.

## Consideraciones metodológicas y clínicas en la interpretación de biomarcadores

La interpretación de los resultados obtenidos en este estudio debe contemplar una serie de factores técnicos y clínicos transversales que pudieron haber influido en la variabilidad de los biomarcadores evaluados. Si bien los procedimientos de recolección y procesamiento fueron estandarizados en la medida de lo posible, el contexto clínico de los pacientes pediátricos oncológicos y la logística interinstitucional del estudio introducen ciertas limitaciones que deben ser consideradas.

Las extracciones de sangre fueron realizadas en los hospitales participantes por personal entrenado, incluyendo enfermeros y bioquímicos. En el Hospital Vilela (Rosario), las muestras fueron procesadas el mismo día en el laboratorio local, asegurando su análisis en fresco. En cambio, las muestras recolectadas en el Hospital Garrahan (Buenos Aires) eran enviadas refrigeradas en envases apropiados, aunque en ciertas ocasiones el suero llegó parcialmente descongelado debido a demoras logísticas o condiciones climáticas. A pesar de que los protocolos indicaban que las muestras podían conservarse hasta 48 horas, aquellas que no cumplían con estas condiciones eran congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y almacenadas hasta su análisis mediante ensayos tipo ELISA. Este procesamiento diferido podría haber afectado a algunos biomarcadores séricos sensibles, como bFGF y TSP-1, aunque no se observaron diferencias relevantes entre tandas de ELISA en la cuantificación de sPD-1, sPD-L1, VEGF-2 o sVEGFR-2.

Todas las muestras fueron procesadas en el mismo laboratorio central, con volúmenes estandarizados (~3 ml de sangre total), utilizando tubos con EDTA para citometría de flujo o tubos secos para la obtención de suero. No se implementaron controles de calidad formales durante el transporte ni se documentaron las condiciones exactas de temperatura al arribo, lo cual representa una limitación metodológica relevante. En el caso de los biomarcadores celulares, como CEC y CEP, las determinaciones por citometría se realizaron de forma inmediata o dentro del rango recomendado.

A la luz de estas consideraciones, se reconoce que algunas variaciones observadas en los niveles de biomarcadores podrían estar relacionadas, al menos en parte, con factores técnicos y logísticos, más allá de la fisiopatología tumoral o la evolución clínica. Por ello, la discusión de cada biomarcador será realizada considerando estos aspectos comunes, sin reiterarlos en cada sección individual.

## Condiciones y limitaciones en la toma de muestras

El protocolo original establecía la toma de muestras cada ocho semanas, en paralelo con los controles clínicos planificados. Sin embargo, en la práctica, este intervalo no siempre pudo ser respetado estrictamente, debido a diversas situaciones clínicas y logísticas propias del contexto pediátrico y multicéntrico del estudio. Si bien todos los pacientes fueron evaluados semanalmente, muchos de ellos residían en otras provincias y no siempre acudían

al hospital de referencia en la fecha programada. En esos casos, las extracciones se realizaban en la visita hospitalaria más próxima disponible, o bien se priorizaban otros aspectos clínicos cuando la situación lo requería.

Asimismo, se evitó la toma de muestras durante procesos infecciosos agudos febriles o internaciones, dado que tales condiciones podrían alterar significativamente los biomarcadores circulantes. Esta precaución fue tomada especialmente en casos de infecciones respiratorias, neutropenias febriles, u otros cuadros descritos en la sección de Toxicidad Hematológica y en la Tabla 7. A pesar de estas circunstancias, el rango de variación en la periodicidad de las tomas se mantuvo dentro de un margen aceptable ( $\pm 2$  semanas), con muy pocos casos de tomas omitidas de forma definitiva.

Todas las extracciones se realizaron en condiciones de ayuno, ya que coincidían con otras determinaciones bioquímicas de rutina requeridas en el seguimiento de estos pacientes. Esto contribuye a la homogeneidad del contexto metabólico al momento de la recolección y fortalece la validez comparativa de las muestras entre pacientes y momentos del tratamiento.

### **Intercurrencias clínicas y adherencia terapéutica durante la QTM**

El desarrollo del tratamiento con quimioterapia metronómica en población pediátrica implica necesariamente la exposición a eventos intercurrentes que pueden interferir en la farmacodinamia de los agentes utilizados y en la interpretación de biomarcadores circulantes. En el presente estudio, si bien se logró una alta tasa de cumplimiento terapéutico y un seguimiento sistemático, se documentaron algunas situaciones clínicas que podrían haber influido sobre los niveles medidos.

Entre ellas, la neutropenia fue el hallazgo adverso más frecuente, aunque con una incidencia relativamente baja si se considera la cantidad total de pacientes y de tomas realizadas. Se adoptó una estrategia precautoria, evitando la extracción de muestras durante episodios de neutropenia febril, hospitalización o cuadros infecciosos agudos. No obstante, sí se registraron situaciones clínicas banales como infecciones de vías aéreas superiores, gastroenteritis, vómitos o traumatismos menores, que en algunos casos llevaron a la suspensión temporal del tratamiento por decisión médica o familiar. Estas interrupciones fueron transitorias, generalmente menores a una semana.

Además, en ocasiones aisladas, la ausencia de stock de ciclofosfamida en farmacia generó retrasos breves en la continuidad del esquema, lo cual fue resuelto dentro de los días siguientes. Asimismo, se reportaron pocos casos en los que el paciente, por decisión propia o familiar, se negó a ingerir la medicación, lo que también derivó en pérdidas puntuales de dosis. A pesar de estas situaciones, la adherencia global al tratamiento fue adecuada, tal como se desprende de los registros clínicos semanales y del seguimiento continuo por parte del equipo tratante.

Estas consideraciones resultan relevantes a la hora de interpretar los niveles de biomarcadores circulantes, especialmente aquellos sensibles a condiciones inflamatorias o inmunológicas transitorias. Si bien su impacto fue probablemente marginal en el análisis global, subrayan la necesidad de considerar el contexto clínico integral al evaluar fluctuaciones inesperadas o resultados sin correlato clínico evidente.

Por último, antes de iniciar la discusión detallada de los biomarcadores analizados, resulta indispensable recuperar una perspectiva que atraviesa todo este estudio: cada paciente representa una unidad compleja, irreductible a una cifra o un valor de laboratorio. En ellos confluyen no solo variables clínicas objetivas —edad, diagnóstico, tratamientos previos, estado inmunológico— sino también aspectos emocionales, contextuales y familiares que, aunque no siempre cuantificables, influyen de manera decisiva en su evolución.

Esta diversidad interindividual, lejos de ser una limitación, forma parte intrínseca del fenómeno clínico que se busca comprender. En ocasiones, los valores de significancia estadística no logran capturar por completo las dinámicas que subyacen a una buena o mala respuesta terapéutica. Por ello, este trabajo no se propone extraer verdades absolutas a partir de un número acotado de pacientes, sino detectar patrones consistentes que, incluso en medio de la heterogeneidad, puedan reflejar señales útiles para entender el comportamiento biológico de la enfermedad.

A pesar de la variabilidad propia de esta población —en edad, comorbilidades, adherencia, condiciones sociofamiliares— se lograron obtener datos que, en muchos casos, mostraron una coherencia clínica relevante. Esta convergencia entre el análisis estadístico y la evolución observada refuerza el valor exploratorio del estudio y sienta las bases para nuevas preguntas más específicas que permitan avanzar hacia una medicina verdaderamente personalizada.

## **Discusión de biomarcadores inmunológicos**

### **Linfocitos T Reguladores**

Los linfocitos T reguladores, caracterizados fenotípicamente por la expresión de CD4+, CD25<sup>hi</sup> y FOXP3+, desempeñan un papel central en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la modulación de la respuesta inflamatoria (Sakaguchi et al., 2008; Baecher-Allan et al., 2006). En el contexto tumoral, el rol de los Tregs ha sido objeto de debate, ya que su expansión puede facilitar mecanismos de evasión inmunológica por parte del tumor. No obstante, también se ha propuesto que dicho aumento podría formar parte de una fase fisiológica de resolución postinflamatoria o de procesos de regeneración tisular controlada (Sakaguchi et al., 2008; Facciabene et al., 2012).

En el presente estudio, los niveles de Tregs no mostraron diferencias significativas entre los grupos clínicos (ME, RA, BE) ni se asociaron a los desenlaces terapéuticos al inicio del

tratamiento. Sin embargo, al analizar la evolución intra-grupo, se observó un aumento estadísticamente significativo de Tregs exclusivamente en el grupo de Buena Evolución entre el inicio y el final del tratamiento ( $P=0,0095$ ; Tabla 22; Figura 30), sin cambios comparables en los otros grupos. Este hallazgo fue consistente en diferentes análisis: el test de Friedman mostró una tendencia creciente a lo largo del tratamiento ( $P=0,0303$ ; Tabla 19; Figura 29) y el test de Wilcoxon confirmó la diferencia entre inicio y final en BE ( $P=0,0098$ ) (Tabla 20). El análisis con el test de Mann–Whitney también evidenció diferencias significativas entre el inicio y el final en el conjunto BE+RA ( $P=0,0256$ ), pero no en RA de forma aislada ( $P=0,4259$ ) (Figura 30). Las medianas finales fueron notablemente más altas en BE (823,6) que en RA (186,7) (Tabla 22), lo que confirma que el incremento de Tregs se concentró en los pacientes con buena evolución clínica.

Aunque podría resultar contraintuitivo asociar un aumento de Tregs con una buena evolución clínica, una interpretación plausible es que dicho incremento represente un fenómeno de reequilibrio inmunológico inducido por la QTM. Este fenómeno ha sido descrito en modelos donde la disminución del estímulo antigénico y proinflamatorio permite la expansión compensatoria de células reguladoras, con un rol homeostático más que inmunosupresor (Facciabene et al., 2012). La hipótesis se ve respaldada por el hecho de que este aumento no se observó en pacientes con recaída o mala evolución, lo cual sugiere que no se trata de una expansión inmunosupresora facilitadora de evasión tumoral.

Por otra parte, no puede descartarse que la expansión observada de Tregs en BE represente un fenómeno de reposición postinflamatoria o incluso la proliferación de una subpoblación no funcional (anérgica o inmadura), como ha sido descrito en escenarios de control tumoral donde persiste la necesidad de regulación periférica (Sakaguchi et al., 2008). Esta posibilidad se alinea con estudios que muestran que un aumento en el número de Tregs no implica necesariamente una función inmunosupresora activa, ya que estas células pueden encontrarse en estados de anergia o representar formas inmaduras sin actividad represiva efectiva (Facciabene et al., 2012; Manjili & Butler, 2016). Esta interpretación es particularmente relevante en nuestro estudio, que evaluó únicamente la cantidad de Tregs, sin análisis funcionales, lo que constituye una limitación metodológica clave.

En este contexto, la evolución de Tregs como marcador dinámico parece reflejar no un estado de inmunosupresión tumoral activa, sino una transición hacia un entorno inmunológico regulado y estable, como parte del proceso de resolución. Esta lectura se alinea con la buena evolución clínica del grupo BE y refuerza la idea de que, al igual que en los fenómenos de cicatrización o inflamación controlada, la expansión de Tregs puede tener un rol fisiológico beneficioso en la etapa final del tratamiento metronómico.

En conclusión, el comportamiento ascendente de Tregs en pacientes con buena evolución plantea un escenario interpretativo que trasciende su rol clásico como marcador de inmunosupresión tumoral. En este estudio, su aumento se correlacionó con una evolución favorable, sugiriendo que, bajo ciertas condiciones terapéuticas como la QTM, los Tregs

podrían participar en la resolución inmunológica más que en la evasión. Futuros estudios que evalúen subtipos y funcionalidad podrían ayudar a esclarecer definitivamente su valor en el monitoreo inmunológico de pacientes pediátricos oncológicos.

## sPD-1

La proteína de muerte celular programada 1 soluble es una isoforma circulante del receptor PD-1, generada por *splicing* alternativo o clivaje proteolítico. Puede interferir con la interacción entre PD-1 y su ligando PD-L1, y por lo tanto modular la respuesta inmunológica antitumoral. Su rol es dual: puede reflejar una activación inmunológica efectiva o una desregulación progresiva con agotamiento funcional de células T, dependiendo del contexto clínico e inmunológico (Gabrych et al., 2019; Bevan, 2023).

En nuestra cohorte, los niveles de sPD-1 fueron analizados en relación al tiempo y a la evolución clínica. No se observaron correlaciones significativas entre sPD-1 y el tiempo de tratamiento en los grupos BE, RA o ME. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tres momentos del tratamiento al analizar cada grupo clínico con el test de Kruskal-Wallis (Tabla 23), ni con el test de Friedman (Tabla 24), excepto en el grupo RA, donde se evidenció un aumento significativo ( $P=0,0417$ ) entre los distintos momentos del tratamiento. En particular, el análisis post-hoc reveló una diferencia significativa entre el inicio y el final del tratamiento ( $P=0,0400$ ).

Posteriormente, se aplicó el test de Wilcoxon para el grupo RA, que mostró una diferencia marginalmente significativa entre el inicio y el final del tratamiento ( $P=0,0625$ ), y no significativa entre 2 meses y el final ( $P=0,1875$ ) (Tabla 25). En ese mismo grupo, la correlación de Spearman entre los valores de sPD-1 a los 2 meses y al final fue perfecta ( $r=1,000$ ,  $P=0,0417$ ), lo que sugiere una elevación consistente del biomarcador en ese intervalo. Además, el análisis con el test de Mann-Whitney mostró diferencias significativas entre el inicio y el final en el grupo RA ( $P=0,0485$ ), y en el conjunto BE + RA ( $P=0,0328$ ), pero no en BE de forma aislada ( $P=0,0914$ ) (Tabla 27; Figura 33).

Desde una perspectiva fisiopatológica, estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que el aumento de sPD-1 podría reflejar una respuesta inmunológica sostenida ante una carga tumoral persistente, como ocurre en pacientes con recaída. Se ha propuesto que niveles elevados de sPD-1 podrían actuar bloqueando PD-L1 y restaurando la activación de células T, o representar un intento del sistema inmune de contrarrestar una señal inhibitoria mantenida (Gabrych et al., 2019). Este comportamiento no fue observado en el grupo BE, donde ningún análisis mostró un incremento significativo del biomarcador.

En conjunto, sPD-1 no demostró utilidad como biomarcador basal, pero su aumento significativo al final del tratamiento en pacientes con recaída alejada (RA), junto con la ausencia de cambios consistentes en BE, sugiere su posible utilidad como marcador dinámico de vigilancia inmunológica subclínica. Esta diferencia se fundamenta no solo en la mediana final compartida entre ambos grupos, sino en el hecho de que en BE ningún análisis respaldó

estadísticamente una elevación hacia el final del tratamiento. Su integración con otros marcadores inmunológicos podría ampliar su valor interpretativo en futuros modelos combinados.

El análisis conjunto con sPD-L1 y otros biomarcadores del eje inmunológico se abordará más adelante para explorar su valor en modelos predictivos combinados.

## **sPD-L1**

El ligando de muerte celular programada 1 soluble es una forma secretada del ligando PD-L1, cuya función puede reflejar fenómenos de inmunosupresión sistémica, evasión tumoral o, en ciertos contextos, un mecanismo de autorregulación homeostática. En pacientes oncológicos, su modulación dinámica puede ofrecer información relevante sobre la evolución de la respuesta inmunitaria antitumoral y el impacto del tratamiento.

En el presente estudio, los niveles de sPD-L1 mostraron una correlación negativa con el tiempo de tratamiento en los grupos de BE ( $r=-0,7455$ ,  $P=0,0056$ ) y RA ( $r=-0,6833$ ,  $P=0,0252$ ), mientras que en el grupo ME no se alcanzó significación ( $r=-0,4333$ ,  $P=0,1250$ ) (Figura 34). Este hallazgo indica una tendencia descendente de sPD-L1 en aquellos pacientes que completaron la QTM, con mayor intensidad en BE.

Al comparar los valores entre grupos clínicos en distintos momentos, no se encontraron diferencias significativas al inicio ( $P=0,1494$ ) ni al final del tratamiento ( $P=0,940$ ). Sin embargo, a los 2 meses de iniciado el esquema, los niveles de sPD-L1 fueron significativamente mayores en el grupo BE comparado con RA ( $P=0,0330$ ), según el análisis post-hoc de Dunn (Tabla 28, Figura 35). Esta diferencia transitoria podría reflejar una respuesta inmunológica más activa en BE durante esa etapa.

Se evidenciaron diferencias significativas a lo largo del tratamiento en BE ( $P=0,0047$ ) y RA ( $P=0,0417$ ) (Tabla 29). En BE, las comparaciones post-hoc indicaron una disminución significativa entre el inicio y el final ( $P=0,0304$ ), y entre los 2 meses y el final ( $P=0,0156$ ). En RA, se observó una diferencia significativa entre el inicio y el final ( $P=0,0400$ ). El test de Wilcoxon mostró una disminución significativa de sPD-L1 en BE ( $P=0,0068$ ) y una diferencia marginalmente significativa en RA ( $P=0,0625$ ) (Tabla 30). Estos resultados indican una disminución sostenida de sPD-L1 durante el tratamiento, especialmente en BE, con una tendencia similar en RA.

Por otro lado, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre los valores iniciales de sPD-L1 y la evolución clínica final ( $P=0,3142$ ), con sensibilidad del 20% y valor predictivo positivo del 33,3%, lo que indica una baja utilidad como marcador basal (Tabla 31).

Se observó una disminución significativa de sPD-L1 entre el inicio y el final del tratamiento en el grupo BE ( $P=0,0175$ ), en RA ( $P=0,0007$ ), y en el conjunto BE + RA ( $P=0,0011$ ). La mediana inicial combinada fue de 25,33, mientras que las medianas finales fueron de 12,62

en BE y 6,90 en RA. La diferencia de medianas fue negativa en todos los casos, reflejando una reducción sostenida del biomarcador hacia el final del tratamiento (Tabla 32, Figura 36). No se observaron diferencias significativas entre los grupos BE y RA al finalizar el tratamiento.

Estos hallazgos consolidan a sPD-L1 como un biomarcador con dinámica descendente en pacientes que completan el tratamiento, con potencial valor en el monitoreo del entorno inmunológico.

Dado que los biomarcadores inmunológicos no actúan de forma aislada, y que su interpretación puede enriquecerse al considerarlos de manera integrada, a continuación, se analizan conjuntamente los resultados de sPD-1, sPD-L1 y Tregs, con el objetivo de identificar perfiles inmunológicos característicos de cada grupo clínico.

La respuesta inmunológica antitumoral es un proceso altamente regulado que involucra fases de activación, modulación y resolución. En condiciones fisiológicas, la activación de células T efectoras frente a antígenos tumorales se encuentra contrabalanceada por mecanismos de inmunorregulación periférica, incluyendo la acción de células T reguladoras y la señalización inhibitoria mediada por PD-1 y su ligando PD-L1. En el contexto del cáncer, este equilibrio suele verse alterado: los tumores inducen un microambiente inmunosupresor crónico que favorece la evasión inmunológica (Hanahan, 2022; Facciabene et al., 2012; Bevan, 2023).

Los biomarcadores sPD-1, sPD-L1 y Tregs, al ser medidos en sangre periférica, pueden reflejar indirectamente estos procesos dinámicos. sPD-L1 representa una forma soluble del ligando inmunosupresor, capaz de neutralizar PD-1 o actuar como biomarcador de carga tumoral; sPD-1, por su parte, puede actuar como inhibidor competitivo del eje PD-1/PD-L1 o como marcador de activación/agotamiento T, dependiendo del contexto (Gabrych et al., 2019). Por último, Tregs circulantes, si bien son esenciales para mantener la tolerancia inmunológica, pueden desempeñar funciones opuestas en cáncer, actuando como mediadores de inmunosupresión o como moduladores de la resolución postinflamatoria (Sakaguchi et al., 2008; Facciabene et al., 2012). Analizados en conjunto, estos biomarcadores permitieron identificar firmas inmunológicas divergentes al final de la QTM, incluso en pacientes que clínicamente eran indistinguibles.

En el grupo BE, se observó una disminución significativa de sPD-L1, una tendencia no significativa al aumento de sPD-1 y un aumento sostenido de Tregs. Este patrón sugiere una restauración inmunológica regulada, con resolución del estímulo inhibitorio tumoral y expansión compensatoria de Tregs funcionales. Este tipo de patrón ha sido interpretado en la literatura como un marcador de resolución postinflamatoria efectiva (Facciabene et al., 2012).

En contraste, el grupo de RA también presentó una disminución significativa de sPD-L1, pero acompañada por un aumento significativo de sPD-1 y ausencia de incremento de Tregs. Esta firma podría representar un estado de activación inmune persistente sin mecanismos efectivos de contención, lo que podría explicar el riesgo latente de recaída, a

pesar de haber finalizado clínicamente el tratamiento. Este fenómeno ha sido asociado en otros estudios con disfunción inmunológica subclínica o agotamiento funcional de células T CD4<sup>+</sup>, incluyendo subpoblaciones reguladoras como las Tregs (Gabrych et al., 2019; Bevan, 2023; Miggelbrink et al., 2021).

Por último, en el grupo ME, no se observaron cambios relevantes en ninguno de los tres biomarcadores, lo que sugiere un sistema inmunológico indiferente o no reactivo a la intervención terapéutica. Esta homeostasis inmunológica inefectiva podría estar relacionada con múltiples factores, tales como una carga tumoral intrínsecamente resistente, secuelas de tratamientos previos inmunosupresores, linfodepleción persistente, estados inflamatorios crónicos de base o una disfunción regulatoria adquirida del eje PD-1/PD-L1 y Tregs. Este perfil sugiere que, en estos pacientes, la QTM no logró revertir el estado de disfunción inmunológica, lo cual resalta aún más la gravedad de este patrón: un sistema inmune que, incluso frente a un estímulo terapéutico con potencial inmunomodulador, permanece inerte o bloqueado funcionalmente.

Para profundizar en el comportamiento inmunológico combinado de estos biomarcadores, se evaluó la relación funcional entre los niveles finales de sPD-1 y sPD-L1 al concluir la QTM, en los grupos que finalizaron exitosamente el tratamiento (BE y RA). El objetivo fue identificar posibles patrones de coordinación o disociación en la dinámica de estos marcadores, que pudieran aportar información adicional sobre el riesgo de recaída subclínica.

El análisis de correlación de Spearman en el grupo combinado BE + RA mostró una asociación positiva significativa ( $r=0,504$ ,  $P=0,046$ ). Al analizar los grupos por separado, se observó una correlación significativa en el grupo BE ( $r=0,660$ ,  $P=0,0438$ ), pero no en RA ( $r=-0,400$ ,  $P=0,750$ ) (Figura 37). Esta diferencia refuerza la hipótesis de que BE mantiene una inmunorregulación coordinada, mientras que en RA el sistema inmune muestra una activación no regulada, posiblemente disfuncional.

Adicionalmente, se exploraron los cambios individuales (deltas) de sPD-1 y sPD-L1 durante el tratamiento, con el fin de identificar patrones de variación paralela (Figura 38). Aunque no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas, se observó que algunos pacientes presentaban trayectorias de cambio proporcionales, lo cual podría tener valor en futuros estudios con mayor poder estadístico. Este enfoque sugiere que, más allá de los valores absolutos finales, el análisis dinámico del eje sPD-1/sPD-L1 puede revelar patrones inmunológicos relevantes.

Esta diferenciación funcional entre los grupos clínicos permite sintetizar, al final del tratamiento, tres perfiles inmunológicos dinámicos que reflejan estados funcionales del sistema inmune:

- **BE:** Tregs $\uparrow$  / sPD-L1 $\downarrow$  / sPD-1 $\leftrightarrow$   $\rightarrow$  restauración inmunológica regulada
- **RA:** Tregs $\leftrightarrow$  / sPD-L1 $\downarrow$  / sPD-1 $\uparrow$   $\rightarrow$  activación persistente no regulada
- **ME:** Tregs $\leftrightarrow$  / sPD-L1 $\leftrightarrow$  / sPD-1 $\leftrightarrow$   $\rightarrow$  inmunoestasis inefectiva

Estos hallazgos refuerzan la noción de que el análisis integrado de biomarcadores inmunológicos no solo aporta información descriptiva, sino que permite detectar patrones funcionales que diferencian estados inmunitarios cualitativamente distintos en pacientes clínicamente similares. La capacidad de identificar una activación persistente no regulada frente a una restauración inmunológica coordinada abre un campo de oportunidad para estrategias de seguimiento y eventual intervención post-QTM, especialmente en escenarios de riesgo latente de recaída.

El hallazgo de variaciones significativas en sPD-1 y sPD-L1 adquiere especial relevancia al considerar la escasez de estudios clínicos que hayan explorado estas vías inmunorreguladoras en el contexto pediátrico. Hasta la fecha, la mayoría de los trabajos sobre PD-1/PD-L1 en quimioterapia metronómica se han realizado en modelos adultos o preclínicos, y su extrapolación a la población infantil sigue siendo limitada. En este sentido, la presente cohorte constituye una de las primeras aproximaciones clínicas que demuestra la asociación entre los niveles circulantes de sPD-1/sPD-L1 y la evolución clínica bajo QTM, aportando evidencia funcional sobre su posible valor pronóstico. Esta contribución adquiere aún mayor significado considerando que, si bien se han reportado los efectos inmunomoduladores generales de la QTM —incluyendo la modulación de vías de control inmunitario como PD-1/PD-L1— (Muraro et al., 2023), los ensayos clínicos pediátricos no habían logrado incorporar la medición sistemática de estos marcadores. Incluso en los estudios más recientes que combinan QTM con inmunoterapia, como el ensayo fase I METRO-PD1, se enfatiza la necesidad de contar con biomarcadores inmunológicos específicos que orienten la selección y el seguimiento de los pacientes (André et al., 2024). En este marco, los resultados aquí presentados amplían el conocimiento disponible y ofrecen una primera evidencia concreta de que los niveles circulantes de sPD-1 y sPD-L1 podrían reflejar la interacción entre la respuesta inmune adaptativa y el control tumoral en niños tratados con QTM, configurándose como potenciales indicadores pronósticos de valor clínico.

En síntesis, el eje inmunológico evaluado mediante Tregs, sPD-1 y sPD-L1 permitió caracterizar perfiles funcionales contrastantes entre los grupos BE, RA y ME, revelando que la aparente estabilidad clínica al finalizar la QTM puede enmascarar dinámicas inmunitarias divergentes. Este hallazgo respalda la incorporación de estos biomarcadores en modelos combinados que integren componentes inmunológicos y angiogénicos, dado que ambos procesos se encuentran estrechamente interrelacionados en la fisiopatología tumoral. A partir de esta base, el análisis de los biomarcadores del eje angiogénico busca ampliar la comprensión del microambiente tumoral y aportar nuevas piezas al modelo funcional propuesto.

## **Discusión de biomarcadores relacionados con la angiogénesis**

Tras abordar los biomarcadores vinculados al eje inmunológico, resulta igualmente relevante analizar aquellos asociados a la angiogénesis, un proceso biológico esencial para el

desarrollo tumoral. La formación de nuevos vasos sanguíneos no solo sostiene el crecimiento y la diseminación de las células malignas, sino que también influye en la respuesta al tratamiento. La quimioterapia metronómica (QTM) ha sido propuesta como una estrategia capaz de ejercer efectos antiangiogénicos sostenidos, actuando sobre el microambiente vascular tumoral más que sobre la masa tumoral en sí (Hanahan, 2022).

En esta sección, el análisis se organiza en dos bloques complementarios:

1. **Biomarcadores celulares evaluados por citometría de flujo**, que incluyen células endoteliales circulantes y células endoteliales progenitoras, ambos indicadores potenciales de actividad y daño vascular.
2. **Biomarcadores séricos determinados por ELISA**, que exploran componentes moleculares clave de la regulación angiogénica: VEGF-2, sVEGFR-2, TSP-1 y bFGF.

Este orden busca presentar primero la información de naturaleza celular —más directa en la detección de cambios vasculares—, para luego integrar los datos moleculares, aportando una visión más amplia del eje angiogénico y su modulación por la QTM.

## Células Endoteliales Circulantes

Las CEC han sido propuestas como biomarcadores dinámicos de daño endotelial y angiogénesis tumoral. Estas células derivadas del endotelio vascular se liberan a la circulación en respuesta a procesos de estrés vascular, inflamación o remodelado tumoral. Su relevancia en oncología se sustenta en su asociación con la progresión tumoral y su potencial valor pronóstico, especialmente en terapias con mecanismos antiangiogénicos como la quimioterapia metronómica (Pasquier et al., 2010).

En el presente estudio, los análisis comparativos de CEC no revelaron diferencias significativas entre los grupos clínicos en los tres momentos del tratamiento (inicio, mitad y final), ni variaciones internas consistentes en los grupos RA o ME. Sin embargo, el grupo de Buena Evolución (BE) mostró una disminución significativa de los niveles de CEC entre el inicio y el final del tratamiento ( $P=0,0034$ ), con una reducción de la mediana de 21,16 a 4,45 células por volumen analizado (Tabla 36, Figura 41).

Este hallazgo adquiere relevancia en el contexto de la hipótesis central del estudio, que propone que ciertos biomarcadores reflejan no solo la evolución tumoral sino también la respuesta vascular al tratamiento. La caída de CEC en pacientes con desenlace favorable podría interpretarse como un indicador de menor daño vascular, menor inflamación sistémica sostenida o un control efectivo del entorno angiogénico tumoral, lo cual concuerda con estudios previos que reportaron descensos similares en contextos de respuesta terapéutica (Najjar et al., 2014; Gendron & Smadja, 2016).

No obstante, la interpretación de los niveles de CEC requiere cautela. Múltiples factores no tumorales pueden modificar su concentración, como infecciones intercurrentes,

inflamación sistémica, traumatismos menores o incluso venopunciones frecuentes. Estas situaciones, si bien fueron mitigadas mediante una estrategia de muestreo cautelosa, no pudieron ser completamente controladas, especialmente considerando las condiciones logísticas del transporte de muestras y la naturaleza ambulatoria del tratamiento. La sensibilidad de las CEC a eventos no tumorales, como inflamación sistémica, infecciones, trauma vascular o procedimientos médicos, ha sido documentada previamente (Gendron & Smadja, 2016), lo cual limita su especificidad como marcador estrictamente tumoral.

Por otra parte, aunque no se halló una asociación estadísticamente significativa entre los valores iniciales de CEC y el desenlace clínico ( $P=0,2214$ ), el VPP fue del 71,4%, sugiriendo que niveles elevados al inicio podrían asociarse con una mayor probabilidad de suspensión del tratamiento por recaída (Tabla 35). Esta observación, si bien exploratoria, podría guiar estudios futuros con mayor poder estadístico o mayor frecuencia de muestreo.

En conjunto, las CEC presentan una utilidad limitada como biomarcador estático único, dada su falta de especificidad y la variabilidad inducida por factores extrínsecos. No obstante, el descenso significativo observado en pacientes con buena evolución clínica apoya su potencial como marcador dinámico complementario para monitorear la respuesta antiangiogénica durante la QTM, especialmente si se interpreta en combinación con otras variables y bajo condiciones controladas.

Dado que las CEC comparten origen endotelial y dinámica funcional con las células endoteliales progenitoras, a continuación, se analizará su comportamiento comparativo en el mismo contexto clínico.

## **Células Endoteliales Progenitoras**

Las CEP son células derivadas de la médula ósea que participan activamente en procesos de neovascularización y reparación endotelial. Su movilización al torrente sanguíneo se activa principalmente en respuesta a estímulos de hipoxia tisular, daño vascular e inflamación, por lo que se han propuesto como biomarcadores de actividad angiogénica en distintos contextos patológicos, incluyendo el cáncer. En oncología pediátrica, su estudio ha despertado interés como posibles indicadores de respuesta a terapias antiangiogénicas, dada su capacidad para reflejar indirectamente la activación del eje hipoxia/angiogénesis.

En el presente estudio, se evidenció una correlación negativa entre el tiempo y los niveles de CEP en los grupos BE ( $r = -0,4857$ ,  $P = 0,0465$ ) y RA ( $r = -0,5038$ ,  $P = 0,0417$ ), lo que sugiere una tendencia descendente asociada al curso del tratamiento (Figura 42). Sin embargo, esta tendencia no fue respaldada por los análisis globales ni por las comparaciones intragrupo formales (Tablas 37 - 40), en los que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Esta discrepancia podría deberse a la mayor sensibilidad, pero menor especificidad, de los análisis de correlación en cohortes pequeñas o con valores intermedios variables. En conjunto, los datos no permiten afirmar con certeza una evolución sistemática de las CEP en función del tiempo o del grupo clínico.

Uno de los principales desafíos en la interpretación de los niveles circulantes de CEP reside en su sensibilidad a múltiples influencias fisiológicas ajenas al proceso tumoral. Se ha documentado que la hipoxia, la presencia de anemia, las infecciones intercurrentes, los estados inflamatorios sistémicos y las alteraciones hematológicas inducidas por quimioterapia —como la neutropenia o trombocitopenia— pueden modular su número en sangre periférica. Esta variabilidad limita su especificidad como marcador tumoral aislado, y exige un análisis contextual que tenga en cuenta los múltiples estímulos que regulan su movilización desde la médula ósea.

A pesar de estas limitaciones, estudios recientes como el de Najjar et al. (2024) han respaldado el valor de las CEP como biomarcadores angiogénicos útiles en la estratificación y seguimiento de pacientes oncológicos, especialmente cuando se interpretan en conjunto con otros marcadores del eje vascular. En ese contexto, la tendencia descendente observada en el grupo BE podría estar reflejando un control más eficiente del entorno angiogénico tumoral o una menor activación del eje hipoxia-regeneración en pacientes con buena respuesta clínica.

En síntesis, aunque las CEP no demostraron cambios estadísticamente significativos a lo largo del tratamiento en esta cohorte, su comportamiento descendente en pacientes con buena evolución clínica aporta elementos exploratorios de interés. La alta sensibilidad de estas células a estímulos sistémicos no tumorales impone una interpretación prudente de sus niveles aislados, pero su análisis integrado podría ofrecer valor pronóstico en estudios futuros más focalizados.

Mientras CEC y CEP reflejan la dimensión celular del eje angiogénico, los biomarcadores séricos determinados por ELISA permiten evaluar componentes moleculares de la regulación vascular tumoral. Este enfoque complementario amplía la comprensión de cómo la QTM puede modular el microambiente vascular, incorporando factores proangiogénicos, receptores reguladores e inhibidores endógenos.

Los biomarcadores seleccionados para esta sección —VEGF-2, sVEGFR-2, TSP-1 y bFGF— representan distintos componentes funcionales del eje angiogénico: VEGF-2 como principal factor proangiogénico tumoral, sVEGFR-2 como receptor soluble que actúa como regulador negativo, TSP-1 como inhibidor endógeno de angiogénesis, y bFGF como factor de crecimiento asociado a vías angiogénicas y de remodelación tisular.

A diferencia del análisis realizado para los biomarcadores inmunológicos, en este caso se adoptó una clasificación dicotómica basada en la evolución clínica, dividiendo a los pacientes en dos grupos: aquellos que lograron finalizar exitosamente la QTM (Éxito) y aquellos que presentaron recaída durante el tratamiento (Recaída), lo que motivó la suspensión anticipada de la terapia. Esta decisión metodológica buscó priorizar el análisis funcional del desenlace real del tratamiento desde la perspectiva del eje angiogénico.

Por otro lado, debido a limitaciones operativas vinculadas a la disponibilidad de muestras, la estabilidad del material biológico y la variabilidad en la obtención de kits

específicos, no todos los biomarcadores fueron medidos en las mismas condiciones analíticas ni con la misma frecuencia. Por tal motivo, se aplicó un enfoque metodológico exploratorio y adaptado a la realidad del estudio, que incluyó:

- Análisis descriptivo por grupo clínico.
- Comparaciones puntuales entre momentos o grupos (U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis).
- Correlaciones con el tiempo de tratamiento, cuando fue posible.

Este abordaje no impide extraer interpretaciones funcionales relevantes; por el contrario, favorece la identificación de patrones que, al analizarse en conjunto y a la luz de los perfiles clínicos, pueden sentar las bases para modelos más complejos de monitoreo angiogénico. Dichos modelos se propondrán al final de esta tesis como una perspectiva metodológica futura.

## **VEGF-2**

El factor de crecimiento endotelial vascular es el principal factor proangiogénico involucrado en la formación y mantenimiento de los vasos sanguíneos tumorales. Su sobreexpresión, inducida por hipoxia y señales de crecimiento, ha sido asociada con mayor agresividad, progresión tumoral y menor respuesta terapéutica en diversos tipos de cáncer, incluyendo sarcomas pediátricos. En el contexto de la QTM, que ejerce un efecto antiangiogénico sostenido, se espera que sus niveles disminuyan o se mantengan estables si el tratamiento logra controlar el microambiente tumoral.

Los niveles circulantes de VEGF-2 no mostraron correlaciones significativas con el tiempo de tratamiento en ninguno de los grupos. Sin embargo, fueron sistemáticamente más altos en el grupo Recaída a lo largo de todo el seguimiento (Tabla 41).

El análisis de varianza (2-way ANOVA) mostró una diferencia significativa entre los grupos clínicos ( $P=0,0002$ ), sin efecto del tiempo ( $P=0,9833$ ), lo cual indica que las diferencias entre grupos se mantuvieron estables durante el tratamiento (Tabla 42). La comparación puntual de los valores iniciales mostró una diferencia significativa entre Éxito y Recaída ( $P=0,0278$ , Tabla 43), y esta diferencia se mantuvo al considerar todos los valores disponibles ( $P=0,0001$ , Tabla 44).

El análisis de VEGF-2 mostró niveles significativamente más elevados en el grupo de recaída desde el inicio del tratamiento y durante el seguimiento, con una asociación clara entre valores altos y peor evolución clínica. Estos resultados indican que VEGF-2 se comportó como un biomarcador estático de mal pronóstico, probablemente reflejando un microambiente tumoral más activo desde el punto de vista angiogénico y menos sensible al efecto antiangiogénico de la QTM. Este comportamiento coincide con lo reportado en diversos tumores sólidos, donde la sobreexpresión de VEGF se vincula con un fenotipo más

agresivo y peor pronóstico (Peyrl et al., 2023; Carcamo & Francia, 2022; Vasudev y Reynolds, 2014; Nowicki et al., 2007).

A diferencia de lo informado por Pramanik et al. (2020), quienes no observaron diferencias significativas en los niveles de VEGF entre pacientes tratados con QTM y placebo, en nuestra cohorte las variaciones longitudinales permiten inferir su valor como biomarcador dinámico y pronóstico, al evidenciarse una correlación sostenida entre niveles elevados y evolución desfavorable.

## **sVEGFR-2**

sVEGFR-2 es la forma soluble del principal receptor del VEGF-2 en células endoteliales. Su función como receptor señuelo permite regular negativamente el eje angiogénico al secuestrar VEGF libre en circulación. En contextos tumorales, sus niveles pueden reflejar tanto la actividad vascular como una respuesta adaptativa frente a la angiogénesis sostenida. Se ha propuesto que niveles elevados de sVEGFR-2 podrían estar asociados a una mayor remodelación vascular y a una progresión tumoral más agresiva, como lo sugieren los hallazgos de Perroud et al. (2013).

En este estudio, los niveles circulantes de sVEGFR-2 no mostraron correlaciones significativas con el tiempo de tratamiento. No obstante, se observó una tendencia descendente en el grupo Éxito, mientras que en el grupo Recaída los niveles se mantuvieron más elevados y con menor variabilidad (Tabla 41).

El análisis de varianza (ANOVA de dos vías) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos ni entre momentos del tratamiento (Tabla 42). Sin embargo, la comparación inicial entre grupos mostró una diferencia no significativa, pero con tendencia, y al considerar todos los valores disponibles, el grupo Recaída presentó niveles consistentemente más elevados que el grupo Éxito (Tablas 43 y 44).

Si bien sVEGFR-2 no alcanzó significación estadística en los análisis realizados, se observó una tendencia a la disminución en el grupo Éxito, que resulta compatible con una modulación del eje angiogénico en respuesta a la QTM. En el grupo Recaída, la persistencia de niveles elevados de sVEGFR-2, en conjunto con los niveles también altos de VEGF-2, podría reflejar un entorno proangiogénico activo no controlado por el tratamiento. Aunque no se demostró una relación directa significativa entre ambos biomarcadores, esta observación refuerza su posible valor funcional como componentes complementarios dentro del mismo eje biológico. Este patrón también ha sido descrito en el contexto del tumor de Wilms, donde la interacción entre VEGF-C y VEGFR-2 se ha asociado con una neovascularización tumoral activa y peor pronóstico (Nowicki et al., 2007).

## TSP-1 & bFGF

Trombospondina-1 y el factor de crecimiento fibroblástico básico son biomarcadores con funciones opuestas en el contexto angiogénico. TSP-1 actúa como un inhibidor natural de la angiogénesis, mientras que bFGF promueve la proliferación endotelial y la neovascularización. En modelos de cáncer, se ha observado que la pérdida de TSP-1 y el aumento de bFGF pueden favorecer la progresión tumoral, aunque su utilidad como biomarcadores clínicos en oncología pediátrica aún no está claramente establecida. En un estudio reciente en pacientes pediátricos tratados con quimioterapia metronómica, se observó un descenso de TSP-1 en los pacientes respondedores; sin embargo, tanto TSP-1 como VEGF no demostraron ser biomarcadores confiables de respuesta al tratamiento (Pramanik et al., 2020).

En este estudio, ambos marcadores fueron evaluados en relación con la evolución clínica, pero su análisis estuvo limitado por la cantidad de datos disponibles. La correlación de Spearman entre los niveles y el tiempo de tratamiento no mostró significación estadística para ninguno de los dos biomarcadores (Tabla 45), aunque bFGF presentó un coeficiente positivo en el grupo Recaída ( $r=0,6000$ ), sugiriendo una posible tendencia ascendente.

El análisis de varianza de dos vías (Tabla 46) tampoco evidenció efectos significativos del grupo clínico ni del tiempo para TSP-1 ni bFGF. En la comparación inicial (Tabla 47), los pacientes que recayeron mostraron una mediana de bFGF más alta que los de evolución favorable, diferencia que no alcanzó significación. Esta tendencia se mantuvo en el análisis global de todos los valores (Tabla 48), reforzando la posibilidad de una elevación sostenida en el grupo Recaída.

Aunque no se observaron resultados estadísticamente concluyentes, los hallazgos de bFGF sugieren un comportamiento potencialmente relevante desde el punto de vista funcional. La limitada disponibilidad de muestras para estos biomarcadores representa una restricción metodológica importante, que deberá ser contemplada en estudios futuros para evaluar con mayor precisión su utilidad pronóstica en el contexto de quimioterapia metronómica.

## Discusión conjunta de biomarcadores CEC, VEGF-2 y sVEGFR-2

Los biomarcadores relacionados con la angiogénesis cumplen un rol clave en la caracterización del microambiente tumoral, especialmente en el contexto de la QTM, cuyo principal mecanismo de acción incluye la inhibición sostenida de la neovascularización. En este estudio, se evaluó el comportamiento dinámico de tres marcadores relevantes: CEC, VEGF-2 y sVEGFR-2, con el objetivo de explorar su utilidad como indicadores de respuesta o riesgo de recaída.

Los niveles de CEC mostraron una disminución significativa en el grupo Éxito, tanto en el análisis combinado como dentro del grupo ( $P=0,0110$  para BE+RA,  $P=0,0034$  para BE), sin cambios en Recaída. Esta reducción progresiva podría reflejar una disminución del daño endotelial en pacientes que responden favorablemente a la QTM, lo que otorga a CEC valor

como biomarcador dinámico de respuesta vascular. Su comportamiento contrastó con el observado en VEGF-2, lo que refuerza la hipótesis de que estos biomarcadores capturan dimensiones complementarias del estado vascular.

VEGF-2, por su parte, mostró niveles significativamente más altos en pacientes con recaída desde el inicio ( $P=0,0278$ ), diferencia que se mantuvo a lo largo del tratamiento ( $P=0,0001$  en el análisis global). No se observaron variaciones significativas con el tiempo, lo que sugiere que VEGF-2 actúa como un biomarcador estático pronóstico, más que como un indicador dinámico de respuesta. Este hallazgo coincide con estudios previos que han vinculado niveles elevados de VEGF-2 con progresión tumoral y resistencia terapéutica en oncología pediátrica.

El comportamiento de sVEGFR-2, aunque no alcanzó significación estadística, mostró una tendencia a valores más altos en Recaída y una evolución más estable en Éxito, con leve descenso. Esta trayectoria sugiere que podría tener valor como regulador funcional del eje VEGF-2, y que su integración a modelos combinados podría aportar información adicional sobre el estado angiogénico. Las diferencias entre grupos no fueron significativas ( $P=0,0887$ ), pero la dirección del cambio fue coherente con su rol biológico como receptor señuelo.

En conjunto, estos tres biomarcadores aportan perspectivas distintas y complementarias sobre la modulación del sistema vascular en el marco de la QTM. CEC se posiciona como un marcador dinámico de respuesta, mientras que VEGF-2 y sVEGFR-2 podrían actuar como predictores de mal pronóstico cuando se mantienen elevados. Su análisis conjunto refuerza el valor de evaluar perfiles angiogénicos integrados, en lugar de depender de indicadores aislados.

Aunque CEP no mostraron resultados estadísticamente significativos, su correlación negativa con el tiempo en el grupo Éxito sugiere un posible papel en la evaluación longitudinal del estado vascular. Su inclusión en modelos combinados junto con CEC, VEGF-2 y sVEGFR-2 podría explorarse en estudios con mayor tamaño muestral, permitiendo refinar la caracterización angiogénica de la respuesta a QTM.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la necesidad de integrar parámetros angiogénicos con los perfiles inmunológicos previamente descritos, a fin de construir firmas biológicas más robustas para la predicción y el monitoreo en oncología pediátrica.

## **Aplicabilidad clínica y propuesta metodológica de seguimiento**

Como lo planteamos previamente, comprender las diferencias entre biomarcadores pronósticos, predictivos y dinámicos no solo es clave para la clasificación académica, sino también para definir cómo y cuándo deben utilizarse en la práctica clínica. Sin embargo, su implementación efectiva enfrenta desafíos técnicos y clínicos importantes, especialmente en el ámbito pediátrico.

En la literatura reciente, los estudios que analizan biomarcadores en el contexto de la quimioterapia metronómica pediátrica, son escasos y heterogéneos; diversas revisiones coinciden en que, pese a los avances clínicos, la búsqueda de marcadores predictivos y de monitoreo continúa siendo esencialmente experimental y sin validaciones concluyentes (Chou et al., 2024; Peinemann et al., 2024). En este escenario, el presente estudio constituye, hasta donde alcanza la evidencia disponible, el primer abordaje longitudinal y multiparamétrico que combina biomarcadores angiogénicos e inmunológicos en una cohorte pediátrica tratada con QTM, aportando una base metodológica reproducible para su aplicación clínica. Esta perspectiva se alinea con las tendencias actuales en oncología pediátrica, que promueven la integración de terapias metronómicas con estrategias inmunomoduladoras y la incorporación de biomarcadores inmunológicos para guiar la selección y el monitoreo de los pacientes (André et al., 2024).

En la actualidad, no es posible establecer estrategias de “screening” ni tomar decisiones clínicas basadas en valores absolutos individuales de estos biomarcadores, por varias razones:

- No existen valores de referencia validados en población pediátrica para estas moléculas o células.
- Los kits comerciales disponibles presentan alta variabilidad inter-ensayo, lo que limita la comparabilidad de resultados entre centros.
- Las determinaciones pueden verse influenciadas por condiciones clínicas intercurrentes, como infecciones, toxicidades o intervenciones médicas.

Por estos motivos, proponemos que el abordaje clínico se base en la evaluación longitudinal intraindividual, priorizando:

- Las tendencias propias de cada paciente a lo largo del tratamiento,
- Las variaciones dinámicas entre momentos claves (inicio, medio, final),
- Y, especialmente, la construcción de firmas funcionales combinadas, que integren múltiples biomarcadores con interpretación fisiopatológica coherente.

Considerando estas limitaciones, se plantea a continuación un esquema metodológico que operativiza el uso de biomarcadores en el seguimiento clínico de pacientes pediátricos tratados con QTM.

### **Propuesta metodológica de seguimiento biomarcador-dirigido en pacientes pediátricos tratados con QTM**

Dado que no existen valores de referencia universalmente aceptados para muchos de los biomarcadores aquí evaluados, proponemos un modelo de seguimiento clínico basado en la variación longitudinal intraindividual, más que en puntos de corte absolutos. Este esquema permitiría detectar precozmente desvíos significativos en la evolución de cada paciente, correlacionarlos con interurrencias clínicas, y anticipar eventos de recaída o falla terapéutica con mayor sensibilidad que los métodos convencionales.

Durante el tratamiento, se sugiere realizar determinaciones mediante ELISA (sPD-1, sPD-L1, VEGF-2, sVEGFR-2) cada dos semanas. Esta frecuencia permitiría capturar eventos clínicos intercurrentes y detectar cambios subclínicos de forma más sensible que con esquemas más espaciados. En paralelo, las determinaciones por citometría de flujo (CEC, CEP, Tregs) podrían realizarse cada cuatro semanas, dado su requerimiento técnico y logístico más complejo, pero con valor añadido en el monitoreo de poblaciones celulares funcionales.

En los pacientes que finalizan la QTM exitosamente, se propone mantener las determinaciones cada tres meses durante el seguimiento post-tratamiento, en coincidencia con los controles por imágenes habituales. Esta estrategia no invasiva permitiría vigilar longitudinalmente la dinámica inmunoangiogénica y podría anticipar recaídas clínicas antes de su manifestación estructural o sintomática.

Además del impacto clínico directo, esta metodología permitiría construir progresivamente un repositorio longitudinal de alta calidad, que podría derivar en la construcción de rangos esperados por tipo tumoral (Osteosarcoma, Sarcoma de Ewing, Rabdomyosarcoma, etc.) e incluso modelos predictivos. Con el tiempo, la comparación con valores obtenidos en población pediátrica sana podría permitir establecer intervalos de referencia poblacionales, ampliando así el valor de estas determinaciones en contexto de screening, investigación y desarrollo terapéutico.

Entre los criterios de interpretación propuestos se incluyen:

- Disminución sostenida de CEC como indicador de respuesta vascular favorable.
- Persistencia de valores altos de VEGF-2 como marcador de mal pronóstico basal.
- Aumento progresivo de Tregs como señal de restauración inmunológica regulada.
- Elevación aislada de sPD-1 como marcador de riesgo subclínico de recaída.
- Descenso significativo de sPD-L1 como indicador de respuesta favorable, especialmente cuando no se acompaña de un aumento de sPD-1; si este descenso se asocia a un incremento de sPD-1, constituiría un componente clave de una firma inmunológica de riesgo.

La interpretación de estos biomarcadores debe realizarse en contexto clínico y con enfoque multidisciplinario, integrando la evolución del paciente, estudios por imágenes y el comportamiento conjunto de los biomarcadores evaluados.

### **Aplicabilidad clínica real de la propuesta: oportunidades y desafíos**

Si bien la propuesta metodológica aquí planteada ofrece una herramienta prometedora para el seguimiento personalizado de pacientes oncológicos pediátricos bajo tratamiento con QTM, su implementación en el ámbito clínico real enfrenta múltiples desafíos que deben ser reconocidos y analizados.

En primer lugar, existen barreras logísticas y económicas que pueden limitar la incorporación rutinaria de determinaciones de biomarcadores, incluso aquellas basadas en ELISA, que representan la alternativa más accesible y estandarizada. En instituciones con

recursos limitados, la disponibilidad de kits, insumos y personal técnico capacitado puede restringir tanto la frecuencia como la continuidad del monitoreo propuesto.

En segundo lugar, la infraestructura de procesamiento es dispar entre centros. Mientras que algunos hospitales cuentan con plataformas automatizadas para citometría de flujo o ELISA, otros dependen de laboratorios tercerizados o envíos diferidos, lo que puede afectar la calidad de las muestras, especialmente en determinaciones por CMF que requieren procesamiento rápido y controlado.

Asimismo, la variabilidad interinstitucional en el manejo de muestras, en la adquisición de eventos citométricos y en el análisis bioinformático, constituye otro obstáculo para la estandarización. La falta de protocolos unificados y la dependencia del operador, particularmente en el caso de CMF, dificultan la comparación de resultados entre distintos centros o momentos del tratamiento.

Desde lo clínico, una dificultad adicional es la integración de estos biomarcadores en el circuito de toma de decisiones médicas. En ausencia de valores de corte o guías establecidas, los equipos médicos podrían mostrarse reticentes a incorporar parámetros biológicos que aún no han sido validados en cohortes amplias. Se necesita, por tanto, no solo más evidencia, sino también un cambio de paradigma en la forma en que concebimos la información biológica en oncología pediátrica.

A pesar de estas limitaciones, creemos que el valor potencial de esta propuesta es significativo. Su implementación, incluso parcial, permitiría detectar desvíos biológicos antes de que la clínica lo evidencie, identificar perfiles de riesgo latente, y eventualmente adaptar o intensificar los esquemas terapéuticos. Más aún, abriría la puerta a un modelo de monitoreo dinámico, de bajo impacto para el paciente, y alineado con los principios de medicina personalizada.

Cabe destacar que, en instituciones de alta complejidad como el Hospital de Niños “V. J. Vilela” y el Hospital de Pediatría “J. P. Garrahan” —ambos intervinientes en este estudio—, la implementación sistemática de determinaciones por ELISA o incluso por citometría de flujo no solo es factible, sino técnicamente viable. Estas instituciones cuentan con la infraestructura, los recursos económicos y el personal capacitado necesarios para llevar adelante un protocolo de monitoreo longitudinal. En el caso de la citometría de flujo, que suele tercerizarse, la condición indispensable es asegurar rigurosos controles de calidad en la extracción, manipulación, transporte y procesamiento de muestras, lo cual también es alcanzable en este tipo de centros.

Al mismo tiempo, es importante destacar que esta propuesta no excluye a instituciones de menor complejidad, especialmente en el contexto de promoción de terapias metronómicas en entornos de recursos limitados. Las determinaciones por ELISA, en particular, presentan un costo accesible, requieren menor entrenamiento técnico, permiten el procesamiento por lotes y pueden adaptarse a centros con infraestructura más básica.

Desde una perspectiva de salud pública, el monitoreo biomarcador-dirigido durante QTM representa una estrategia de bajo impacto físico para el paciente y de bajo costo relativo para el sistema, especialmente si se considera el número total de pacientes potencialmente beneficiados.

En síntesis, la viabilidad de esta propuesta es heterogénea y dependerá del nivel de complejidad institucional, pero incluso su implementación parcial podría generar un impacto clínico significativo. En centros de alta complejidad, permitiría integrar los biomarcadores a un esquema de vigilancia sistemático y estandarizado; en centros de menor complejidad, su aplicación selectiva a través de técnicas como ELISA podría optimizar el seguimiento con un costo asumible.

Este marco de factibilidad no solo respalda la adopción progresiva de la metodología, sino que sienta las bases para su evolución hacia sistemas de registro y análisis más sofisticados, capaces de transformar estos datos en herramientas predictivas reales para la toma de decisiones en oncología pediátrica.

### **Implementación proyectiva: desarrollo de una base de datos integrada**

Como parte del modelo de seguimiento propuesto, se plantea el desarrollo de una base de datos longitudinal de biomarcadores en oncología pediátrica, orientada tanto a la práctica clínica como a la investigación. Esta base integraría variables clínicas relevantes (edad, sexo, diagnóstico, tratamiento, estado general), valores absolutos de biomarcadores clave (sPD-1, sPD-L1, VEGF-2, sVEGFR-2, CEC, CEP, Tregs) y datos de seguimiento sistemático durante y después del tratamiento con QTM. La frecuencia de recolección, ajustada según el tipo de biomarcador (determinado por ELISA o citometría de flujo), permitiría un registro dinámico intraindividual, alineado con el enfoque metodológico propuesto en este trabajo.

El objetivo de esta iniciativa sería múltiple: por un lado, establecer rangos de referencia diferenciados por tipo tumoral pediátrico; por otro, facilitar la construcción de modelos predictivos clínicos basados en datos longitudinales, evolución clínica y desenlace. Como extensión de este desarrollo, se propone la creación de herramientas digitales de apoyo clínico, como tableros interactivos y calculadoras médicas que permitan integrar múltiples variables en tiempo real.

A futuro, esta base de datos podría vincularse a plataformas de inteligencia artificial, con el objetivo de identificar patrones complejos, anticipar recaídas o fallas terapéuticas y optimizar el seguimiento clínico personalizado. Esta integración tecnológica permitiría avanzar hacia un modelo de medicina de precisión aplicable a contextos pediátricos, potenciando tanto la eficiencia del monitoreo como la capacidad de respuesta ante variaciones subclínicas del estado del paciente.

En síntesis, la implementación de esta base de datos no solo representa una herramienta para organizar y centralizar la información biomarcadora, sino también un paso estratégico para optimizar el seguimiento clínico de estos pacientes. Su uso sistemático

permitiría unificar criterios entre centros, mejorar la comparabilidad de resultados y generar evidencia que respalde la toma de decisiones terapéuticas. Además, abriría la posibilidad de fortalecer redes colaborativas y de investigación, facilitando la validación multicéntrica de los hallazgos y su eventual incorporación a protocolos clínicos estandarizados.

## CONCLUSIONES FINALES

Los datos obtenidos en este estudio fueron evaluados con criterios rigurosos de consistencia y validez estadística, y respaldados por múltiples pruebas complementarias que confirmaron su robustez. A pesar de la inevitable variabilidad biológica entre pacientes, así como de las limitaciones en la cantidad de muestras disponibles y en la heterogeneidad de las condiciones clínicas, este estudio logró generar datos estadísticamente confiables, verificados en múltiples análisis y contrastados con rigor metodológico. Se establecieron los márgenes de interpretación de cada resultado, se reconocieron las limitaciones inherentes a cada análisis, y se evitó deliberadamente caer en sobreinterpretaciones o asumir hallazgos sin un respaldo estadístico o fisiopatológico sólido. Esta estrategia no solo refuerza la confiabilidad de los hallazgos, sino que también consolida el valor del enfoque adoptado: una mirada crítica, cautelosa y clínicamente relevante sobre el comportamiento de los biomarcadores en pacientes pediátricos con tumores sólidos tratados con quimioterapia metronómica.

El modelo de monitoreo biomarcador-dirigido desarrollado en esta tesis no solo es coherente desde el punto de vista fisiopatológico, sino que también resulta técnicamente factible y adaptable a distintos entornos clínicos. A través de la integración de biomarcadores inmunológicos y angiogénicos medibles en sangre periférica, se diseñó una estrategia que permite un seguimiento más cercano, menos invasivo y potencialmente más sensible que los esquemas actuales. Esta propuesta trasciende el plano teórico: puede incorporarse en la práctica real sin requerir recursos inalcanzables, lo que le otorga un valor operativo concreto en el marco de la oncología pediátrica moderna.

Uno de los principales aportes de este trabajo fue destacar el valor del seguimiento longitudinal intraindividual por sobre la interpretación de valores absolutos aislados. En ausencia de puntos de corte validados, las trayectorias de los biomarcadores a lo largo del tratamiento ofrecieron información más precisa, contextualizada y clínicamente relevante. Este enfoque permitió detectar patrones dinámicos asociados al éxito terapéutico o al riesgo de recaída, incluso en pacientes que clínicamente cursaban sin alteraciones. La observación de tendencias individuales y firmas combinadas refuerza el potencial de los biomarcadores como herramientas de monitoreo continuo, sensibles a cambios sutiles que podrían anticipar desvíos en la evolución clínica.

El análisis conjunto de los biomarcadores evaluados permitió identificar firmas funcionales específicas que distinguieron, al finalizar el tratamiento, a pacientes clínicamente similares. La integración de Tregs, sPD-1, sPD-L1, CEC y VEGF-2 reveló perfiles inmunológicos

y angiogénicos divergentes entre los grupos con buena evolución, recaída posterior o mala evolución. Estas firmas no solo enriquecen la comprensión de los mecanismos subyacentes a la respuesta terapéutica, sino que también abren la posibilidad de desarrollar herramientas pronósticas dinámicas, basadas en patrones biológicos reales, más allá de los criterios clínicos tradicionales.

La propuesta metodológica desarrollada en este estudio tiene el potencial de ser aplicada tanto en centros de alta complejidad como en instituciones con recursos más limitados. Su diseño contempla alternativas viables como los ensayos ELISA para contextos operativos más accesibles, sin renunciar al valor funcional de determinaciones más complejas como la citometría de flujo. Al incorporar herramientas de bajo impacto físico para el paciente y con un costo relativo bajo, el modelo propuesto representa una estrategia realista para optimizar el seguimiento, anticipar recaídas y personalizar la vigilancia clínica, con beneficios tanto médicos como organizativos.

En este marco, los hallazgos de esta tesis no solo consolidan un aporte original al conocimiento científico, sino que también establecen un punto de partida para la continuidad y expansión de la investigación en este campo. La naturaleza longitudinal del análisis permitió capturar la dinámica intraindividual de los biomarcadores, un aspecto prácticamente ausente en la literatura pediátrica disponible. Mas aún, la realización de esta investigación en un contexto regional aporta un valor añadido: se trata de la primera caracterización detallada de biomarcadores asociados a quimioterapia metronómica en población pediátrica del Cono Sur, con potencial de aplicación directa en entornos clínicos locales y de recursos limitados.

Este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a validar el modelo propuesto en cohortes más amplias, multicéntricas y representativas de la diversidad tumoral pediátrica. La estandarización de protocolos de muestreo, el desarrollo de algoritmos de interpretación combinada y la integración con parámetros clínicos e imagenológicos serán pasos clave para consolidar su utilidad. Además, la recolección sistemática de datos longitudinales permitirá avanzar hacia la definición de valores de referencia dinámicos y hacia la construcción de herramientas predictivas basadas en inteligencia artificial. A largo plazo, este enfoque podría convertirse en una pieza central dentro de la medicina personalizada aplicada al tratamiento de niños con cáncer.

Esta tesis no es únicamente el registro de un estudio ni la validación de una hipótesis. Es, sobre todo, un esfuerzo por anticiparse, por identificar señales tempranas que permitan actuar antes de que la enfermedad avance. El modelo de monitoreo biomarcador-dirigido aquí postulado no es un ejercicio académico aislado, sino un paso concreto hacia una medicina pediátrica más cercana, precisa y preventiva. Es la demostración de que la ciencia de datos y la ciencia clínica pueden encontrarse en un terreno común: el de la acción temprana y personalizada.

Si algo dejara este trabajo, más allá de sus gráficos y tablas, es la certeza de que detrás de cada muestra y cada análisis hay un niño, una familia y un equipo que esperan respuestas, y que cada hora dedicada tuvo un propósito real. Quedó demostrado que, incluso en contextos complejos, es posible construir herramientas que mejoren el cuidado y abran camino a futuros avances. Y que, si sabemos mirar bien, los biomarcadores pueden convertirse en señales de esperanza.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. C., & Lawler, J. (2004). The thrombospondins. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), 961–968. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.006>
- Ali, A. M., & El-Sayed, M. I. (2016). Metronomic chemotherapy and radiotherapy as salvage treatment in refractory or relapsed pediatric solid tumours. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 23(3), e253–e259. <https://doi.org/10.3747/co.23.2873>
- American Cancer Society. (2021). History of Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/cervical-cancer/about/history.html>
- American Cancer Society. (n.d.). Global cancer facts & figures (4th ed.). <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/global-cancer-facts-and-figures/global-cancer-facts-and-figures-4th-edition.pdf>
- American Cancer Society. (2022). Síndromes de cáncer familiar. <https://www.cancer.org/es/cancer/prevencion-del-riesgo/genetica/sindromes-de-cancer-familiar.html>
- Ancin, B., Özeran, M. M., Yilmaz, Y., Uysal, S., Kumbasar, U., Saribas, Z., Dikmen, E., Dogan, R., & Demircin, M. (2022). The correlation of serum sPD-1 and sPD-L1 levels with clinical, pathological characteristics and lymph node metastasis in nonsmall cell lung cancer patients. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 52(4), 1050–1057. <https://doi.org/10.55730/1300-0144.5407>
- André, N., Carre, M., & Pasquier, E. (2011). Metronomic chemotherapy: A low-dose, high-impact approach to cancer treatment. *The Lancet Oncology*, 12(5), 451–452. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70085-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70085-5)
- André, N., Abed, S., Orbach, D., Alla, C. A., Padovani, L., Pasquier, E., Gentet, J. C., & Verschuur, A. (2011). Pilot study of a pediatric metronomic 4-drug regimen. *Oncotarget*, 2(12), 960–965. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.358>
- André, N., Banavali, S., Snihur, Y., & Pasquier, E. (2013). Has the time come for metronomics in low-income and middle-income countries?. *The Lancet. Oncology*, 14(6), e239–e248. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70056-1)
- André, N., Carré, M., & Pasquier, E. (2014). Metronomics: towards personalized chemotherapy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(7), 413–431. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.89>
- André, N., Deley, M. C. L., Léguillette, C., Probst, A., Willems, L., Travers, R., Aerts, I., Faure-Contier, C., Revond-Riviere, G., Min, V., Geoerger, B., Chastagner, P., Entz-Werlé, N., & Leblond, P. (2024). METRO-PD1: Phase 1 study of nivolumab in combination with metronomic chemotherapy in children and adolescents with relapsing/refractory solid

- tumors. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 198, 113525. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2024.113525>
- Ardizzone, A., Bova, V., Casili, G., Repici, A., Lanza, M., Giuffrida, R., ... & Paterniti, I. (2023). Role of Basic Fibroblast Growth Factor in Cancer: Biological Activity, Targeted Therapies, and Prognostic Value. *Cells*, 12(7), 1002. <https://doi.org/10.3390/cells12071002>
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., ... & Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302), 964–967. <https://doi.org/10.1126/science.275.5302.964>
- Baecher-Allan, C., Wolf, E., & Hafler, D. A. (2006). MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(8), 4622–4631. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4622>
- Balamuth, N. J., & Womer, R. B. (2010). Ewing's sarcoma. *The Lancet. Oncology*, 11(2), 184–192. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70286-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70286-4)
- Banchi, M., Fini, E., Crucitta, S., & Bocci, G. (2022). Metronomic chemotherapy in pediatric oncology: From preclinical evidence to clinical studies. *Journal of Clinical Medicine*, 11(21), 6254. <https://doi.org/10.3390/jcm11216254>
- Beenken, A., & Mohammadi, M. (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(3), 235–253. <https://doi.org/10.1038/nrd2792>
- Bevan, C. (2023). Meta-analysis of the prognostic value of soluble programmed death ligand-1 (sPD-L1) in cancers. *Biomarkers*, 1–9. <https://doi.org/10.1080/1354750x.2023.2198168>
- Blaney, S. M., Adamson, P. C., & Helman, L. J. (2021). *Pizzo and poplack's pediatric oncology, 8e*. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. <https://oncology.lwwhealthlibrary.com/book.aspx?bookid=2968&sectionid=0>
- Bornstein, P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: An appraisal of thrombospondin 1. *Journal of Cell Biology*, 130(3), 503-506. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.3.503>
- Bowers, D. C., Aquino, V. M., Leavey, P. J., Bash, R. O., Journeycake, J. M., Tomlinson, G., Mulne, A. F., Haynes, H. J., & Winick, N. J. (2004). Phase I study of oral cyclophosphamide and oral topotecan for children with recurrent or refractory solid tumors. *Pediatric blood & cancer*, 42(1), 93–98. <https://doi.org/10.1002/pbc.10456>
- Browder, T., Butterfield, C. E., Kraling, B. M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M. S., ... & Folkman, J. (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Research*, 60(7), 1878-1886.
- Byroju, V.V., Nadukkandy, A.S., Cordani, M. *et al*. Retinoblastoma: present scenario and future challenges. *Cell Commun Signal* 21, 226 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01223-z>

- Cancer.gov. Instituto Nacional del Cancer. NIH. (2022). La genética del cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica>
- Carcamo, B., & Francia, G. (2022). Cyclic metronomic chemotherapy for pediatric tumors: Six case reports and a review of the literature. *Journal of Clinical Medicine*, 11(10), 2849. <https://doi.org/10.3390/jcm11102849>
- Case, J., et al. (2007). Human CD34<sup>+</sup>AC133<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup> cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Experimental Hematology*, 35(7), 1109–1118. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.03.002>
- Chabner, B. A., & Roberts, T. G., Jr (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature reviews. Cancer*, 5(1), 65–72. <https://doi.org/10.1038/nrc1529>
- Chen, L., & Han, X. (2015). Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3384–3391. <https://doi.org/10.1172/JCI80011>
- Cheng, Y., Wang, C., Wang, Y., & Dai, L. (2022). Soluble PD-L1 as a predictive biomarker in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Future oncology (London, England)*, 18(2), 261–273. <https://doi.org/10.2217/fon-2021-0641>
- Choi, L. M., Rood, B., Kamani, N., La Fond, D., Packer, R. J., Santi, M. R., & Macdonald, T. J. (2008). Feasibility of metronomic maintenance chemotherapy following high-dose chemotherapy for malignant central nervous system tumors. *Pediatric blood & cancer*, 50(5), 970–975. <https://doi.org/10.1002/pbc.21381>
- Chou, S. W., & Chang, H. H. (2024). Evolution and contemporary role of metronomic chemotherapy in the treatment of neuroblastoma. *Cancer letters*, 588, 216617. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2024.216617>
- Colleoni, M., Orlando, L., Sanna, G., Rocca, A., Maisonneuve, P., Peruzzotti, G., Ghisini, R., Sandri, M. T., Zorzino, L., Nolè, F., Viale, G., & Goldhirsch, A. (2006). Metronomic low-dose oral cyclophosphamide and methotrexate plus or minus thalidomide in metastatic breast cancer: antitumor activity and biological effects. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 17(2), 232–238. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdj066>
- Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 4.0*, National Cancer Institute. (2009). U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. [https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03/Archive/CTCAE\\_4.0\\_2009-05-29\\_QuickReference\\_8.5x11.pdf](https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03/Archive/CTCAE_4.0_2009-05-29_QuickReference_8.5x11.pdf)
- Dameshek, W. (1954). The use of 6-mercaptopurine in acute leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 60(2), 447-452. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1954.tb40036.x>

- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, 68(21), 8643-8653. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>
- Duffy, M. J., & Crown, J. (2019). Biomarkers for Predicting Response to Immunotherapy with Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Patients. *Clinical chemistry*, 65(10), 1228–1238. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2019.303644>
- Facciabene, A., Motz, G. T., & Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer research*, 72(9), 2162–2171. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3687>
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Laversanne, M., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, Francia: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. <https://gco.iarc.who.int/today>
- Ferrara, N., & Adamis, A. P. (2016). Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(6), 385–403. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.17>
- Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438(7070), 967–974. <https://doi.org/10.1038/nature04483>
- Fidler I. J. (2000). Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 6 Suppl 2, S134–S141.
- Finn, R. S., Crown, J. P., Lang, I., Boer, K., Bondarenko, I. M., Kulyk, S. O., Ettl, J., Patel, R., Pinter, T., Schmidt, M., Shparyk, Y., Thummala, A. R., Voytko, N. L., Fowst, C., Huang, X., Kim, S. T., Randolph, S., & Slamon, D. J. (2015). The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *The Lancet. Oncology*, 16(1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71159-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71159-3)
- Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R. M., Barregard, L., Bhutta, Z. A., Brenner, H., Dicker, D. J., Chimed-Orchir, O., Dandona, R., Dandona, L., Fleming, T., Forouzanfar, M. H., Hancock, J., Hay, R. J., Hunter-Merrill, R., Huynh, C., Hosgood, H. D., Johnson, C. O., Jonas, J. B., ... Naghavi, M. (2017). Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived with Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA oncology*, 3(4), 524–548. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688>
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182-1186.

- Fousseyni, T., Diawara, M., Pasquier, E., & André, N. (2011). Children treated with metronomic chemotherapy in a low-income country: METRO-MALI-01. *Journal of pediatric hemato/oncology*, 33(1), 31–34. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3182018ab8>
- Frei, E., Karon, M., Levin, R. H., Freireich, E. J., Taylor, R. J., Hananian, J., ... & Hoogstraten, B. (1965). The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood*, 26(5), 642-656. <https://doi.org/10.1182/blood.V26.5.642.642>
- Frigola, X., Inman, B. A., Lohse, C. M., Krco, C. J., Chevillat, J. C., Thompson, R. H., Dong, H., & Kwon, E. D. (2011). Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 17(7), 1915–1923. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1944>
- Gabrych, A., Pęksa, R., Kunc, M., Krawczyk, M., Izycka-Swieszewska, E., Biernat, W., & Bien, E. (2019). The PD-L1/PD-1 axis expression on tumor-infiltrating immune cells and tumor cells in pediatric rhabdomyosarcoma. *Pathology Research and Practice*, 215(12), 152700, <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2019.152700>
- GALOP (2011). Protocolo latinoamericano multicéntrico para el tratamiento del Sarcoma de Ewing. Grupo de América Latina de Oncología Pediátrica (GALOP). *Grupo de América Latina de Oncología Pediátrica*. <https://grupogalop.org/es>
- Gandhi, L., Rodríguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., et al. (2018). Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non–small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 378(22), 2078–2092. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005>
- Gao, A., Zhang, L., & Zhong, D. (2023). Chemotherapy-induced thrombocytopenia: literature review. *Discover oncology*, 14(1), 10, <https://doi.org/10.1007/s12672-023-00616-3>
- Gendron, N., & Smadja, D. M. (2016). Circulating endothelial cells: a new biomarker of endothelial dysfunction in hematological diseases. Les cellules endothéliales circulantes: nouveau biomarqueur de la dysfonction endothéliale dans les hémopathies. *Annales de biologie clinique*, 74(4), 395–404. <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1160>
- Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., ... & Martin, F. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *European Journal of Immunology*, 34(2), 336–344. <https://doi.org/10.1002/eji.200324797>
- Giantonio, B. J., Catalano, P. J., Meropol, N. J., O'Dwyer, P. J., Mitchell, E. P., Alberts, S. R., Schwartz, M. A., Benson, A. B., 3rd, & Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200 (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of clinical oncology : official journal of*

- the American Society of Clinical Oncology*, 25(12), 1539–1544.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.6305>
- Glembocki, A. I., & Somers, G. R. (2024). Prognostic and predictive biomarkers in paediatric solid tumours. *Pathology*, 56(2), 283–296. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2023.11.007>
- Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., & Neufeld, G. (1987). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Reviews*, 8(2), 95-114.
- Green, D. M., Kun, L. E., Matthay, K. K., et al. (2010). Late effects of treatment for childhood cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 161–172. <https://doi.org/10.1038/nrc2783>
- Grupo Argentino de Tratamiento de los Tumores Oseos en Pediatría (GATLO). Protocolo 2006. Buenos Aires: GATLO; 2006.
- Gyorffy, B., & Schäfer, R. (2014). Biomarkers in cancer: The role of molecular signatures. *European Journal of Cancer*, 50(13), 2314–2321.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.05.017>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70,  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hargadon, K. M., Johnson, C. E., & Williams, C. J. (2018). Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *International Immunopharmacology*, 62, 29–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.001>
- Hawkins, D. S., Anderson, J. R., & Gupta, A. A. (2015). Rhabdomyosarcoma: Review of the Children’s Oncology Group (COG) Soft-Tissue Sarcoma Committee experience and rationale for current COG studies. *Pediatric Blood & Cancer*, 62(S5), S49–S50,  
<https://doi.org/10.1002/pbc.25725>
- Henry, N. L., & Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular Oncology*, 6(2), 140–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>
- Heng-Maillard, M. A., Verschuur, A., Aschero, A., et al. (2019). SFCE METRO-01 four-drug metronomic regimen phase II trial for pediatric extracranial tumors. *Pediatric Blood & Cancer*, 66(7), e27693. <https://doi.org/10.1002/pbc.27693>
- Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A., & Finkel, T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine*, 348(7), 593–600,  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa022287>

- Hospital Vall d'Hebron. (2022). Predisposición genética al cáncer. <https://hospital.vallhebron.com/es/asistencia/enfermedades/predisposicion-genetica-al-cancer>
- Ingram, D. A., Mead, L. E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., ... & Haneline, L. S. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*, 104(9), 2752–2760. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1398>
- Instituto Nacional del Cáncer (INC). Argentina.gob.ar. (2019). Mejoró el pronóstico del cáncer infantil en nuestro país. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/mejoro-el-pronostico-del-cancer-infantil-en-nuestro-pais>
- Iwamoto, H., Izumi, K., Mizokami, A., et al. (2016). Soluble VEGF receptor-2 in prostate cancer cells. *The Prostate*, 76(6), 552–561. <https://doi.org/10.1002/pros.23149>
- Jodat, H., Asadi, Z. T. N., Dayer, D., et al. (2023). bFGF could modulate the anti-cancer effect of Cyclopamine and induce apoptosis in HT-29 colorectal cancer cells. *Preprint at Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2845753/v1>
- Joyce, J. A., & Fearon, D. T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230), 74–80. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6204>
- Kazerounian, S., Yee, K. O., & Lawler, J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(5), 700–712. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7402-7>
- Kendall, R. L., & Thomas, K. A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(22), 10705–10709. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.22.10705>
- Kerbel, R. S., & Kamen, B. A. (2004). The antiangiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 423–436. <https://doi.org/10.1038/nrc1369>
- Kieran, M. W., Turner, C. D., Rubin, J. B., Chi, S. N., Zimmerman, M. A., Chordas, C., Klement, G., Laforme, A., Gordon, A., Thomas, A., Neuberg, D., Browder, T., & Folkman, J. (2005). A feasibility trial of antiangiogenic (metronomic) chemotherapy in pediatric patients with recurrent or progressive cancer. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 27(11), 573–581. <https://doi.org/10.1097/01.mph.0000183863.10792.d4>
- Kist-van Holthe, J. E., van Wijk, J. A. E., & Offringa, M. (2007). Drug-induced nephrotoxicity in children. *Pediatric Nephrology*, 22(11), 1879–1886. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0522-2>
- Klement, G., Baruchel, S., Rak, J., Man, S., Clark, K., Hicklin, D. J., & Kerbel, R. S. (2000). Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 105(8), R15–R24. <https://doi.org/10.1172/JCI8642>

- Kong, D. S., Lee, J. I., Kim, J. H., Kim, S. T., Kim, W. S., Suh, Y. L., Dong, S. M., & Nam, D. H. (2010). Phase II trial of low-dose continuous (metronomic) treatment of temozolomide for recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology*, 12(3), 289–296. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop030>
- Kovaleva, O. V., Gratchev, A., Makarova, E. I., Bezhanova, S., Stilidi, I., Matveev, V. B., & Kushlinskii, N. E. (2022). Prognostic significance of sPD-1/sPD-L1 in renal cancer depending on the phenotype of tumor and stromal cells. *Onkourologiâ*, 18(2), 17–28. <https://doi.org/10.17650/1726-9776-2022-18-2-17-28>
- Kuhlen, M., & Frühwald, M. C. (2025). Bridging molecular advancements and clinical challenges in pediatric oncology. *World Journal of Pediatrics*, 21(2), 120–122. <https://doi.org/10.1007/s12519-024-00870-7>
- Lawler, M., Keeling, P., Kholmanskikh, O., Minnaard, W., Moehlig-Zuttermeister, H., Normanno, N., Philip, R., Popp, C., Salgado, R., Santiago-Walker, A. E., Trullas, A., van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S. B., Vart, R., Vermeulen, J., Vitaloni, M., & Verweij, J. (2024). Empowering effective biomarker-driven precision oncology: A call to action. *European Journal of Cancer*, 209, 114225. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2024.114225>
- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., ... Diaz, L. A. Jr. (2015). PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 372(26), 2509–2520, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500596>
- Letai, A., Bhola, P., & Welm, A. L. (2022). Functional precision oncology: Testing tumors with drugs to identify vulnerabilities and novel combinations. *Cancer cell*, 40(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.12.004>
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., & Haber, D. A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*, 350(21), 2129–2139. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>
- Li, H., Li, X., Liu, S., Zhang, W., Wang, Q., Zhao, X., Duan, J., Bai, H., Wang, J., & Wang, Z. (2018). Soluble programmed death-1 (sPD-1) and sPD-ligand 1 in circulating blood as biomarkers for detection of gastric cancer. *Future Oncology*, 14(23), 2387–2396. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0080>
- López-Aguilar, E., Sepúlveda-Vildósola, A. C., Betanzos-Cabrera, Y., Rocha-Moreno, Y. G., Gascón-Lastiri, G., Rivera-Márquez, H., Wanzke-del-Angel, V., Cerecedo-Díaz, F., & de la Cruz-Yañez, H. (2008). Phase II study of metronomic chemotherapy with thalidomide, carboplatin-vincristine-fluvastatin in the treatment of brain stem tumors in children. *Archives of medical research*, 39(7), 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2008.05.008>

- Mainetti, L. E., Rozados, V. R., Rossa, A., Bonfil, R. D., & Scharovsky, O. G. (2011). Anti-tumoral and antimetastatic effects of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide combined with celecoxib on murine mammary adenocarcinomas. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(1), 151–163. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0872-0>
- Mancuso, P., Calleri, A., Cassi, C., Gobbi, A., Capillo, M., Pruneri, G., ... & Bertolini, F. (2001). Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 495, 263–273.
- Manjili, M. H., & Butler, S. E. (2016). Role of Tregs in cancer dormancy or recurrence. *Immunological Investigations*, 45(7), 625–640, <https://doi.org/10.1080/08820139.2016.1194428>
- Marayati, R., Quinn, C. H., & Beierle, E. A. (2019). Immunotherapy in Pediatric Solid Tumors—A Systematic Review. *Cancers*, 11(12), 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers11122022>
- Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., & Weiss, W. A. (2016). Neuroblastoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16078. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.78>
- Miggelbrink, A. M., Jackson, J. D., Lorrey, S. J., Srinivasan, E. S., Waibl-Polania, J., Wilkinson, D. S., & Fecci, P. E. (2021). CD4 T-cell exhaustion: Does it exist and what are its roles in cancer? *Clinical Cancer Research*, 27(21), 5742–5752. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0206>
- Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., & Jemal, A. (2019). Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(5), 363-385.
- Mirabello, L., Troisi, R. J., & Savage, S. A. (2009). Osteosarcoma: A comprehensive review. *Cancer*, 115(11), 2531–2541. <https://doi.org/10.1002/cncr.24121>
- Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T. E., Porta, C., Bracarda, S., Grünwald, V., Thompson, J. A., Figlin, R. A., Hollaender, N., Urbanowitz, G., Berg, W. J., Kay, A., Lebwohl, D., Ravaud, A., & RECORD-1 Study Group (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet (London, England)*, 372(9637), 449–456. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61039-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61039-9)
- Mund, J. A., et al. (2012). Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(4), 1045–1053. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.244210>
- Muraro, E., Comito, G., Di Carlo, E., et al. (2023). Metronomic Chemotherapy: Anti-Tumor Pathways and Combination with Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancers*, 15(9), 2471. <https://doi.org/10.3390/cancers15092471>

- Najjar, F., Alsabe, H., Sabbagh, H., Al-Massarani, G., Aljapawe, A., Alamalla, N., Banat, I., & Ikhtiar, A. (2024). Endothelial progenitor cells as an angiogenic biomarker for the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Reports of practical oncology and radiotherapy Journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology*, 29(5), 544–557. <https://doi.org/10.5603/rpor.102618>
- National Cancer Institute. (2020). Cancer Genetics. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>
- National Cancer Institute. (n.d.). Genética y cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/genetica>
- National Cancer Institute. (n.d.). Tipos de cáncer infantil. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/infantil>
- National Center for Biotechnology Information. Cancer Control Opportunities in Low- and Middle-Income Countries. (2007). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54028>
- Needle, M. N., Molloy, P. T., Geyer, J. R., Herman-Liu, A., Belasco, J. B., Goldwein, J. W., Sutton, L., & Phillips, P. C. (1997). Phase II study of daily oral etoposide in children with recurrent brain tumors and other solid tumors. *Medical and pediatric oncology*, 29(1), 28–32. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-911x\(199707\)29:1<28::aid-mpo5>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-911x(199707)29:1<28::aid-mpo5>3.0.co;2-u)
- Nemes, K., Bens, S., Bourdeaut, F., & al. (2017, diciembre 7). *Rhabdoid tumor predisposition syndrome*. En M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, et al. (Eds.), *GeneReviews*<sup>®</sup> [Internet]. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469816/>
- Nielsen, T. O., Poulin, N. M., & Ladanyi, M. (2015). Synovial sarcoma: recent discoveries as a roadmap to new avenues for therapy. *Cancer discovery*, 5(2), 124–134. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1246>
- Nishikawa, H., & Sakaguchi, S. (2017). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 45, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.12.005>
- Nowicki, M., Ostalska-Nowicka, D., Kaczmarek, M., Miskowiak, B., & Witt, M. (2007). The significance of VEGF-C/VEGFR-2 interaction in the neovascularization and prognosis of nephroblastoma (Wilms' tumour). *Histopathology*, 50(3), 358–364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02613.x>
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling— in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 359–371. <https://doi.org/10.1038/nrm1911>
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *Childhood cancer: An overview of WHO activities*. World Health Organization. <https://www.who.int/docs/default-source/documents/health-topics/cancer/who-childhood-cancer-overview-booklet.pdf>
- Pan American Health Organization. (2021). Cáncer en la niñez y adolescencia. <https://www.paho.org/es/temas/cancer-ninez-adolescencia>

- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Pasquier, E., Kavallaris, M., & André, N. (2010). Metronomic chemotherapy: New rationale for new directions. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(8), 455–465. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.82>
- Peinemann, F., & Hoemberg, M. (2024). Metronomic chemotherapy for paediatric extracranial solid tumours: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ open*, 14(10), e084477. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2024-084477>
- Perroud, H. A., Rico, M. J., Alasino, C. M., Porta, E. O., & Scharovsky, O. G. (2013a). Safety and efficacy of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib in patients with advanced breast cancer. *International Journal of Breast Cancer*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/170379>
- Perroud, H. A., Rico, M. J., Alasino, C. M., Porta, E. O., & Scharovsky, O. G. (2013b). Angiogenic markers in advanced breast cancer patients treated with metronomic chemotherapy. *Future Oncology*, 9(4), 557–566. <https://doi.org/10.2217/fon.13.15>
- Perroud, H. A., Alasino, C. M., Porta, E. O., & Scharovsky, O. G. (2015). Relevance of angiogenic markers in advanced breast cancer patients treated with low-dose metronomic chemotherapy. *Clinical and Translational Oncology*, 17(9), 735–740, <https://doi.org/10.1007/s12094-014-1303-5>
- Perroud, H. A., Porta, E. O., Alasino, C. M., & Scharovsky, O. G. (2016). Clinical translation of metronomic chemotherapy: From preclinical evidence to a growing number of clinical applications in oncology. *Clinical and Translational Oncology*, 18(5), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1400-3>
- Peyrl, A., Chocholous, M., Kieran, M. W., Azizi, A. A., Prucker, C., Czech, T., Dieckmann, K., Schmook, M. T., Haberler, C., Leiss, U., & Slavc, I. (2012). Antiangiogenic metronomic therapy for children with recurrent embryonal brain tumors. *Pediatric blood & cancer*, 59(3), 511–517. <https://doi.org/10.1002/pbc.24006>
- Peyrl, A., Chocholous, M., Azizi, A., Kieran, M., Nysom, K., Sterba, J., Sabel, M., Czech, T., Dieckmann, K., Haberler, C., Schmook, M., Leiss, U., & Slavc, I. (2016). MB-70: MEMMAT - A phase II study of metronomic and targeted anti-angiogenesis therapy for children with recurrent/progressive medulloblastoma. *Neuro-Oncology*, 18(Suppl 3), iii113. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now076.66>
- Peyrl, A., Chocholous, M., Sabel, M., et al. (2023). Sustained survival benefit in recurrent medulloblastoma by a metronomic antiangiogenic regimen: A nonrandomized controlled trial. *JAMA Oncology*, 9(2), 174–182. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2023.4437>
- Pizzo, P. A., & Poplack, D. G. (2015). Principles and practice of pediatric oncology (7th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

- Poste, G. (2011). Bring on the biomarkers. *Nature*, 469(7329), 156–157. <https://doi.org/10.1038/469156a>
- Pramanik, R., Agarwala, S., Gupta, Y. K., Thulkar, S., Vishnubhatla, S., Batra, A., Dhawan, D., & Bakhshi, S. (2017). Metronomic Chemotherapy vs Best Supportive Care in Progressive Pediatric Solid Malignant Tumors: A Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*, 3(9), 1222–1227. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0324>
- Pramanik, R., Tyagi, A., Agarwala, S., Vishnubhatla, S., Dhawan, D., & Bakhshi, S. (2020). Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Thrombospondin-1 as Biomarkers of Metronomic Chemotherapy in Progressive Pediatric Solid Malignancies. *Indian pediatrics*, 57(6), 508–511.
- Presta, M., Dell’Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2), 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.004>
- R.O.H.A. Instituto Nacional del Cáncer. Argentina.gob.ar. (2019). <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/institucional/roha>
- Rico, M. J., Perroud, H. A., Mainetti, L. E., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2014). Comparative effectiveness of two metronomic chemotherapy schedules-our experience in the preclinical field. *Cancer investigation*, 32(3), 92–98. <https://doi.org/10.3109/07357907.2013.877480>
- Roberts, A. W., Davids, M. S., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Puvvada, S. D., Gerecitano, J. F., Kipps, T. J., Anderson, M. A., Brown, J. R., Gressick, L., Wong, S., Dunbar, M., Zhu, M., Desai, M. B., Cerri, E., Heitner Enschede, S., Humerickhouse, R. A., Wierda, W. G., & Seymour, J. F. (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine*, 374(4), 311–322. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513257>
- Robison, N. J., Campigotto, F., Chi, S. N., Manley, P. E., Turner, C. D., Zimmerman, M. A., Chordas, C. A., Werger, A. M., Allen, J. C., Goldman, S., Rubin, J. B., Isakoff, M. S., Pan, W. J., Khatib, Z. A., Comito, M. A., Bendel, A. E., Pietrantonio, J. B., Kondrat, L., Hubbs, S. M., Neuberg, D. S., ... Kieran, M. W. (2014). A phase II trial of a multi-agent oral antiangiogenic (metronomic) regimen in children with recurrent or progressive cancer. *Pediatric blood & cancer*, 61(4), 636–642. <https://doi.org/10.1002/pbc.24794>
- Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2019). Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 840, <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>
- Roux, C., Revon-Rivière, G., Gentet, J. C., et al. (2021). Metronomic maintenance with weekly vinblastine after induction with bevacizumab–irinotecan in children with low-grade glioma prevents early relapse. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 43(6), e1005–e1011. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000002002>

- Rozados, V. R., Sanchez, A. M., Gervasoni, S. I., Berra, H. H., Matar, P., & Scharovsky, O. G. (2004). Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma and sarcoma regression, and is devoid of toxicity. *Annals of Oncology*, *15*(10), 1543–1550, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh392>
- Rozados, V. R., Mainetti, L. E., Rico, M. J., Zacarías Fluck, M. F., Matar, P., & Scharovsky, O. G. (2010). The immune response and the therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide. *Oncology research*, *18*(11-12), 601–605. <https://doi.org/10.3727/096504010x12777678141662>
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, *133*(5), 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>
- Sakurai, Y., Iwasaki, F., Hirose, A., et al. (2024). Metronomic chemotherapy for pediatric refractory solid tumors: A retrospective single-center study. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000002870>
- Salah, E., Sakly, W., Barrera, C., Mosbahi, S., Bellanger, A.-P., Farhani, R., Ksia, A., Gottstein, B., Nouri, A., Babba, H., & Millon, L. (2021). Soluble programmed death-1 (sPD-1) as predictor of early surgical outcomes of pediatric cystic echinococcosis. *Parasite Immunology*, *43*(3). <https://doi.org/10.1111/PIM.12809>
- Salzillo, C., Cazzato, G., Serio, G., & Marzullo, A. (2025). Paediatric Renal Tumors: A State-of-the-Art Review. *Current oncology reports*, *27*(3), 211–224. <https://doi.org/10.1007/s11912-025-01644-8>
- Scharovsky, O. G., Mainetti, L. E., & Rozados, V. R. (2009). Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, *16*(2), 7–15. <https://doi.org/10.3747/co.v16i2.420>
- Schiavetti, A., Ingrosso, A., Antenucci, A., Federici, T., Megaro, G., De Luca, L., & Conti, L. (2012). Circulating vascular endothelial growth factor in childhood solid tumors: plasma and serum measurements. *Anticancer research*, *32*(8), 3565–3569.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., & Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, *219*(4587), 983–985. <https://doi.org/10.1126/science.6823562>
- Shaked, Y., & Kerbel, R. S. (2007). Antiangiogenic strategies on defense: On the possibility of blocking rebounds by the tumor vasculature after chemotherapy. *Cancer Research*, *67*(15), 7055–7058. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0590>
- Sharma, P., & Allison, J. P. (2015). Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell*, *161*(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.030>
- Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer*, *2*(12), 1097–1105. <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>

- Shojaei, F., Wu, X., Qu, X., Kowanetz, M., Yu, L., Tan, M., ... & Ferrara, N. (2009). G-CSF–initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16), 6742–6747. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810803106>
- Simon, R., & Roychowdhury, S. (2013). Implementing personalized cancer genomics in clinical trials. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(5), 358–369. <https://doi.org/10.1038/nrd3979>
- Slavc, I., Mayr, L., Stepien, N., Gojo, J., Aliotti Lippolis, M., Azizi, A. A., Chocholous, M., Baumgartner, A., Hedrich, C. S., Holm, S., Sehested, A., Leblond, P., Dieckmann, K., Haberler, C., Czech, T., Kool, M., & Peyrl, A. (2022). Improved Long-Term Survival of Patients with Recurrent Medulloblastoma Treated with a “MEMMAT-like” Metronomic Antiangiogenic Approach. *Cancers*, 14(20), 5128. <https://doi.org/10.3390/cancers14205128>
- Stempak, D., Gammon, J., Halton, J., Moghrabi, A., Koren, G., & Baruchel, S. (2006). A pilot pharmacokinetic and antiangiogenic biomarker study of celecoxib and low-dose metronomic vinblastine or cyclophosphamide in pediatric recurrent solid tumors. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 28(11), 720–728. <https://doi.org/10.1097/01.mph.0000243657.64056.c3>
- Sterba, J., Valik, D., Mudry, P., Kepak, T., Pavelka, Z., Bajciova, V., Zitterbart, K., Kadlecova, V., & Mazanek, P. (2006). Combined biodifferentiating and antiangiogenic oral metronomic therapy is feasible and effective in relapsed solid tumors in children: single-center pilot study. *Onkologie*, 29(7), 308–313. <https://doi.org/10.1159/000093474>
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71: 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tang, Q., & Bluestone, J. A. (2008). The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology*, 9(3), 239–244. <https://doi.org/10.1038/ni1572>
- Tannock, I. F., Hickman, J. A., & Butts, C. A. (2016). Paradigms for therapy development against cancer. *European Journal of Cancer*, 62, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.04.022>
- Timmermans, F., Plum, J., Yöder, M. C., Ingram, D. A., Vandekerckhove, B., & Case, J. (2009). Endothelial progenitor cells: identity defined? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(1), 87–102. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00571.x>
- Toledo, A., Fragoso, G., Carrillo-Mezo, R., Romo, M. L., Sciotto, E., & Fleury, A. (2023). Can sPD-1 and sPD-L1 plasma concentrations predict treatment response among patients with extraparenchymal neurocysticercosis? *Pathogens*, 12. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091116>

- Traore, F., Togo, B., Pasquier, E., Dembélé, A., & André, N. (2013). Preliminary evaluation of children treated with metronomic chemotherapy and valproic acid in a low-income country: Metro-Mali-02. *Indian journal of cancer*, 50(3), 250–253. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.118741>
- Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(2), 116–129. <https://doi.org/10.1038/nrc2780>
- Urbich, C., & Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. *Circulation Research*, 95(4), 343–353. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000137877.89448.78>
- Vander Heiden, M. G., & DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 168(4), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>
- Vasudev, N. S., & Reynolds, A. R. (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17(3), 471–494. <https://doi.org/10.1007/s10456-014-9420-y>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., & Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*, 269(43), 26988–26995.
- Wild, C. P., & Gong, Y. Y. (2010). Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31(1), 71–82. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp264>
- Winnicki, C., Leblond, P., Bourdeaut, F., et al. (2023). Retrospective national “real life” experience of the SFCE with the metronomic MEMMAT and MEMMAT-like protocol. *Journal of Clinical Medicine*, 12(4), 1415. <https://doi.org/10.3390/jcm12041415>
- World Health Organization. (n.d.). Cancer fact sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- World Health Organization. (n.d.). Cancer in children fact sheet. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer-in-children>
- Xu, H., Cao, H., Zhang, J., Jing, C., Wang, Z., Wu, J., Du, M., Xu, X., & Ma, R. (2023). Serum VEGF levels as a predictor of recurrence in advanced esophageal squamous cell carcinoma following curative esophagectomy. *Molecular and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.3892/mco.2023.2682>
- Yang, Q., Yang, Y., Zhou, N., Tang, K., Lau, W. B., Lau, B., Wang, W., Xu, L., Yang, H., Ma, X. L., Xuan, Y., & Ou, X. (2018). Epigenetics in ovarian cancer: Premise, properties, and perspectives. *Molecular Cancer*, 17(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0854-8>

- Zacarias-Fluck, M. F., Rico, M. J., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2010). The immune response and the therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide. *Oncology Research*, 18(11–12), 601–605. <https://doi.org/10.3727/096504010X12626138414573>
- Zapletalova, D., André, N., Deak, L., Kyr, M., Bajciova, V., Mudry, P., Dubska, L., Demlova, R., Pavelka, Z., Zitterbart, K., Skotakova, J., Husek, K., Martincekova, A., Mazanek, P., Kepak, T., Doubek, M., Kutnikova, L., Valik, D., & Sterba, J. (2012). Metronomic chemotherapy with the COMBAT regimen in advanced pediatric malignancies: a multicenter experience. *Oncology*, 82(5), 249–260. <https://doi.org/10.1159/000336483>
- Zare, R., Abdolsamadi, H., Soleimani Asl, S., Radi, S., Bahrami, H., & Jamshidi, S. (2023). The bFGF can improve angiogenesis in oral mucosa and accelerate wound healing. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 11(4), 547–552. <https://doi.org/10.52547/rbmb.11.4.547>

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Los resultados de este trabajo final dieron lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos:

### RESÚMENES y PÓSTERS:

- **Cáceres, J. M.**, Coirini, M., Schifino, A., Jotomliansky, J., Rozados, V. R., & Scharovsky, O. G. (2018). Hematologic toxicity analysis of metronomic chemotherapy in pediatric patients with advanced solid tumors. *Medicina (Buenos Aires)*, 78(Supl. III), 268.
- **Cáceres, J. M.**, Rose, A., Cacciavillano, W., Eandi, S., Fernández, D., Pires, C., Jotomliansky, J., Coirini, M., Schifino, A., Scharovsky, O. G., & Rozados, V. R. (2019). Evaluation of angiogenesis and immune response related cells in pediatric patients with Ewing's sarcoma treated with metronomic chemotherapy. *Biocell*, 44(Supl. 3), A11.
- **Cáceres, J. M.**, Rose, A., Cacciavillano, W., Coirini, M., Schifino, A., Jotomliansky, J., Scharovsky, O. G., & Rozados, V. R. (2019, noviembre 26–27). Immunological and angiogenesis biomarkers in high-risk pediatric patients with solid tumors treated with metronomic chemotherapy (MCT). XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario, Argentina. *Libro de Resúmenes de la Sociedad de Biología de Rosario* (ISSN 2314-1484).
- **Cáceres, J. M.**, Rose, A., Cacciavillano, W., Coirini, M., Schifino, A., Jotomliansky, J., Scharovsky, O. G., & Rozados, V. R. (2020, noviembre 24–25). Utilidad de las moléculas sPD-1 y sPD-L1 como posibles biomarcadores (BM) de respuesta a la quimioterapia metronómica (QTM), en pacientes pediátricos con cáncer. XXII Congreso y XL Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Rosario, Argentina. *Libro de Resúmenes de la Sociedad de Biología de Rosario* (ISSN 2314-1484).
- **Cáceres, J. M.**, Rose, A., Cacciavillano, W., Coirini, M., Schifino, A., Jotomliansky, J., Scharovsky, O. G., & Rozados, V. R. (2021, noviembre 23–24). Biomarcadores de recaída en pacientes pediátricos con tumores sólidos de alto riesgo tratados con quimioterapia metronómica. XXIII Congreso y XLI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, modalidad virtual. *Libro de Resúmenes de la Sociedad de Biología de Rosario* (ISSN 2314-1484).
- **Cáceres, J. M.**, Rose, A., Cacciavillano, W., Coirini, M., Schifino, A., Jotomliansky, J., Scharovsky, O. G., & Rozados, V. R. (2022). Hematologic toxicity analysis of metronomic chemotherapy in pediatric patients with advanced solid tumors. *Medicina (Buenos Aires)*, 82(Supl. V).

### Publicación en preparación:

Del presente trabajo de tesis surge un *paper* en preparación titulado:

- *The Potential Role of Immunological and Angiogenesis Biomarkers in Monitoring Response to Metronomic Chemotherapy in Pediatric High-Risk Tumors.*

# ANEXOS

## Resolución de autorización de la Facultad de Ciencias Médicas - UNR



FACULTAD DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Universidad Nacional de Rosario

2016 - "Año del Bicentenario de la Declaración de la Independencia Nacional!"  
**Expediente N° 44405/0042**

ROSARIO, 06 de mayo de 2016

**VISTO:** las presentes actuaciones por las que la Dra. Graciela Scharovsky eleva a consideración el proyecto de Investigación titulado: "Identificación de posibles biomarcadores predictivos o de pronóstico de respuesta a la quimioterapia metronómica, en pacientes pediátricos con tumores recaídos o refractarios";

**QUE,** el Proyecto de referencia se realizará en Dependencias de la Facultad de Ciencia Médicas; y

**CONSIDERANDO:**

**QUE,** la Comisión de Bioética de esta Facultad considera que el proyecto es adecuado desde el punto de vista ético;

**QUE,** el Proyecto en cuestión cuenta con la opinión favorable del Comité de Bioseguridad, según consta a fs. 43 de estos actuados;

**POR ELLO,**

**EL DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**


**RESUELVE:**

**ARTICULO 1°.-** Autorizar la realización del Proyecto de Investigación titulado: "IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES PREDICTIVOS O DE PRONÓSTICO DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA, EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON TUMORES RECAÍDOS O REFRACTARIOS", dirigido por la Dra. Olga Graciela SCHAROVSKY (DNI N° 5.015.406) por los motivos enunciados precedentemente.-


**ARTICULO 2°.-** Regístrese, comuníquese y gírese a la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación, que notificará fehacientemente a la interesada. Cumplido, archívese.-

**RESOLUCION N° 1581/2016**

**ES COPIA**

  
Prof. Dr. Ricardo Nidd  
Decano

Grb/Flz.-

  
GUSTAVO R. BUSTAMANTE  
DIRECTOR DE DESPACHO  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
U.N.R.

Santa Fe 3100  
Rosario S2000KTR  
Tel 341 4804568/63  
Fax 341 4804568  
www.fmedic.unr.edu.ar

## Resolución del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas - UNR



FACULTAD DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Universidad Nacional de Rosario

Año 2015 - "Año del Bicentenario del Congreso de los Pueblos Libres"

El Comité de Bioética examinó el expediente n° 44405/0042, "Identificación de posibles biomarcadores predictivos o de pronóstico de respuesta a la quimioterapia metronómica, en pacientes pediátricos con tumores recidivos o refractarios", dirigido por Graciela Scharovsky, en la reunión ordinaria de fecha 16 de diciembre de 2015. Después de revisar la documentación recibida, este Comité consideró que la formulación del proyecto es aceptable desde el punto de vista de la Bioética. -----

El presente certificado se extiende en la ciudad de Rosario, a los 22 días del mes de febrero de 2016, a pedido de la interesada y para ser presentado ante quien corresponda. -----

Dra. Lucila I. Hinrichsen  
Coordinadora del Comité de Bioética de la  
Facultad de Ciencias Médicas, UNR

Santa Fe 3100  
Rosario S2000XTR  
Tel 341 4804558/63  
Fax 341 4804569  
www.fmedic.unr.edu.ar

# Resolución de aprobación por el Comité Revisor de Investigación del Hospital de Pediatría “J. P. Garrahan”



## COMITÉ REVISOR DE INVESTIGACION

Dña. Carolina Comedien, Dra. Lidia Cheluffi, Dra. Mariana del Pino, Dra. Florencia Domínguez, Dr. Carlos Fagnano, Dra. Andrea Mangano, Dr. Daniel Martínez Hólm, Dra. Juliana Rodríguez,  
Dra. Marcela Rautava, Dr. Ricardo Russo, Dra. Selma Rovinsky, Dr. Juan C. Vecchió.

De: Comité Revisor de Investigación

A: Dr. Walter Cacciavillano, Dra. Adriana Rose

**Ref. Proyecto N° 909 "Identificación de posibles biomarcadores predictivos o de pronóstico de respuesta a la quimioterapia metronómica, en pacientes pediátricos con tumores recaídos o refractarios"**

De mi consideración:

Por medio de la presente, tengo el agrado de dirigirme a usted a fin de informarle que el proyecto de investigación de referencia cuenta con la aprobación expedita, para ser presentado en el Instituto Nacional del Cáncer. La aprobación final del protocolo estará sujeta al cumplimiento del ciclo de revisión institucional del Hospital.

Sin otro particular, saludo a usted muy afeto.

19 de Noviembre del 2015

  
DRA. JULIANA R. RODRIGUEZ  
MATRÍCULA NACIONAL 62 944  
DIRECCIÓN ASOCIADA DE  
CIENCIA E INVESTIGACIÓN  
HTAL DE PEDIATRÍA S.A.M.I.C.  
PROF. DR. JUAN P. GARRAHAN

Combate de los Pozos N° 1881, Piso 2°  
Código Postal: C1245AAM - Capital Federal

Comutador: (011) 4308-4300 Int. 1457

## Resolución de aprobación por el servicio de Oncología del Hospital de Niños "V. J. Vilela"



Municipalidad de Rosario  
Hospital de Niños "Victor J. Vilela"  
Virasoro 1855  
2000 Rosario

Rosario, 20 de marzo de 2016

De mi mayor consideración:

El proyecto "*Identificación de posibles biomarcadores predictivos o de pronóstico de respuesta a la quimioterapia metronómica, en pacientes pediátricos con tumores recaídos o refractarios*", es de gran interés en oncología pediátrica, debido a que la Quimioterapia Metronómica es una modalidad terapéutica relativamente reciente y, por ende, existen muy pocos biomarcadores que puedan ser utilizados como indicadores de pronóstico de evolución de un determinado tipo de tumor ante este tipo de terapia, o de respuesta a la misma; permitiendo reducir costos, impidiendo el sobretratamiento y mejorando la calidad de vida de los pacientes.

El proyecto ha sido aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR.

Por lo expresado, el servicio de Oncología del Hospital de Niños Victor J. Vilela, manifiesta su interés en participar en dicho proyecto.

Sin otro particular,

  
DR. JULIA JOTOMLIANSKY  
MÉDICA PEDIATRA ONCÓLOGA  
Mat-5570

## Consentimiento informado

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

DNI	y	DNI
en nuestro carácter de	y	del paciente:
HC:		, hemos sido informados por el/la Dr./a.:

del trabajo de investigación denominado:

**"IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES PREDICTIVOS O DE PRONÓSTICO DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA, EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON TUMORES RECIDIVANTES O EN PROGRESIÓN"** que llevarán a cabo profesionales del Instituto de Genética Experimental de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario y especialistas del Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital de Niños V.J. Vilela y del Servicio de Hemato-Oncología del Hospital de Pediatría SAMIC "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

#### ¿QUÉ ES UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN?

Un estudio de investigación (también llamado ensayo clínico) es una forma organizada de intentar responder una pregunta específica acerca de un fármaco, un dispositivo médico, un procedimiento médico, o una condición o comportamiento en particular. El fin de un estudio de investigación es hallar tratamientos que funcionen en las personas y que brinden maneras de mejorar la salud.

Nos ha informado que nuestro hijo/a padece una enfermedad tumoral maligna y que va a recibir un tipo de terapia denominada Quimioterapia Metronómica, que consiste en la administración frecuente, a intervalos regulares, sin periodos prolongados de descanso y en dosis bajas, de fármacos quimioterapéuticos.

Nos ha informado que el objetivo de este estudio de investigación es poder identificar marcadores de respuesta a la terapia. Para ello se van a evaluar distintas moléculas y tipos de células que circulan en la sangre y que podrían permitir identificar factores pronóstico que, en forma independiente o en grupos, mejorarían la capacidad de predecir la respuesta a la quimioterapia metronómica, elevando así la eficacia del tratamiento y la calidad de vida de los pacientes. Para lograr esto, el Hospital de Pediatría SAMIC "Prof. Dr. Juan P. Garrahan", el Hospital de niños Víctor J. Vilela y el Instituto de Genética Experimental han suscripto un acuerdo de cooperación con el fin de asociarse para realizar este estudio. Las muestras que se utilicen para los estudios serán trasladadas al Instituto de Genética Experimental para la evaluación de los distintos marcadores.

Nos han informado que se trabajará con muestras de sangre obtenidas el día del inicio de la quimioterapia y luego, periódicamente. No se harán extracciones de sangre especiales para éstas determinaciones, sino que se utilizará parte de la sangre extraída para el control rutinario de la terapia. Estas extracciones son necesarias para el manejo clínico de los pacientes y NO se realizarán punciones especiales para este estudio. La obtención de material para este estudio, no implica una cirugía en ningún caso. El tomar estas muestras no influye en el manejo del niño ni se cambiarán conductas sobre su tratamiento en base a sus resultados.

Nos ha informado que los riesgos que se corren al participar del estudio son los relacionados con las extracciones de muestras, que son indispensables para el manejo clínico. El riesgo de infección y sangrado, en un niño clínicamente en condiciones y sin alteraciones de la coagulación, son mínimos.

Nos ha informado que parte de las muestras tomadas para este estudio, que no sean utilizadas, podrán ser guardadas para otros estudios.

Nos ha informado que no hay diferencias entre participar o no participar en este estudio de investigación respecto al tratamiento que reciba mi hijo/a.

Nos ha informado que nuestro hijo/a no obtendrá un beneficio directo por participar, pero podrá ayudar a entender mejor el comportamiento de esta enfermedad. Esto teniendo en cuenta que el

tratamiento que mi hijo/a recibe actualmente es producto de otros estudios, realizados en el pasado en pacientes como él/ella.

Nos ha informado que la participación en este estudio es voluntaria y que podemos decidir participar o no, así como retirar a nuestro hijo/a del estudio en cualquier momento, comunicándose a su médico. El paciente continuará con todos los tratamientos y cuidados que requiera de acuerdo a la evolución de su enfermedad.

Nos ha informado que este estudio de investigación fue autorizado para ser realizado en el Hospital por la Dirección de Docencia e Investigación y por el Comité de Ética de las instituciones participantes.

Nos ha informado que la participación de nuestro hijo/a en este estudio no nos representará costo alguno, ya que no será necesario concurrir al hospital para ningún estudio especial.

Nos ha informado que no se revelará la identidad de los participantes del estudio. Se mantendrá una base de datos con acceso a través de una clave para el manejo interno de los mismos, a los que sólo podrán acceder los investigadores. Se podrán usar los datos con fines docentes y en publicaciones científicas, manteniendo la confidencialidad y el anonimato del paciente y su familia. Los datos podrán ser requeridos por autoridades sanitarias y judiciales, así como por los Comités de Ética de los Hospitales y de la Facultad de Ciencias Médicas.

Nos ha informado que los profesionales de los Servicios en los que es tratado nuestro hijo/a podrán suspender la aplicación de este estudio si surgieran elementos que motivaran la inconveniencia de continuarlo. Nos serán informados los motivos de tal suspensión.

Nos ha informado que, en caso de cualquier consulta, el especialista responsable del estudio es el Dr. Guillermo Chantada en la ciudad de Buenos Aires, pudiendo consultarlo al teléfono 4122-6359 (int. 1439) y la Dra Julia Jotomliansky en la ciudad de Rosario, pudiendo consultarla en el teléfono.....

Hemos podido leer este texto las veces que nos fueron necesarias y nos fueron aclaradas las dudas y, con el tiempo suficiente, hemos consultado con familiares, allegados, amigos y otros profesionales de nuestra confianza todo lo informado. Asimismo, le ha informado todo lo necesario al paciente de acuerdo a su nivel y posibilidad de comprensión.

De acuerdo a las explicaciones que nos ha brindado, espontáneamente y ante las preguntas que hemos formulado, **HEMOS ENTENDIDO** el trabajo de investigación clínica propuesto, denominado **"IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES BIOMARCADORES PREDICTIVOS O DE PRONÓSTICO DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA, EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON TUMORES RECIDIVANTES O EN PROGRESIÓN"**

Como consecuencia de este entendimiento, **CONSIENTO-CONSENTIMOS** que los profesionales del Servicio de Hemato-oncología del Hospital de Pediatría SAMIC 'Prof. Dr. Juan P Garrahan' y/o del Hospital de Niños Victor J. Vilela, utilicen parte de la sangre extraída para el seguimiento habitual de los/las pacientes, para ser usada con fines de investigación.

Por este medio y con mi/nuestra firma/s autorizo/autorizamos que

La muestra sea guardada con el fin de investigar en otros estudios actuales o futuros.

En este caso:

Quiero que los investigadores se contacten conmigo para contarme sobre los estudios y pedirme permiso cada vez que las muestras sean utilizadas.

No quiero que los investigadores se contacten conmigo para informarme sobre los estudios, siempre que los mismos hayan sido autorizados por las autoridades del hospital luego de que el Comité Revisor de Investigación y Ética lo hayan aprobado.

Por este medio y con mi/nuestra firma/s autorizo/autorizamos el uso bajo la siguiente condición:

\_\_\_ No quiero ser informado si surgen nuevos conocimientos a partir de estas investigaciones, excepto que estos resultados sean de utilidad para la salud de mi hijo-a o a la familia, momento en el cual recibiré la información y el consejo médico correspondiente.

\_\_\_ Quiero ser informado de todos los resultados y nuevos conocimientos que surjan a partir de estas investigaciones siempre.

Nos ha informado que este consentimiento no nos hace perder derecho alguno a reclamar por los eventuales perjuicios que puedan ocurrir como consecuencia de la participación del paciente en este ensayo de investigación clínica.

Nos explicó que si se produjera alguna situación no tratada en este consentimiento nos será informada y podremos revocar en cualquier momento los términos de esta autorización o prestar una diferente.

FECHA: \_\_\_\_\_

_____	Aclaración y DNI
Firma del Padre, Madre o tutor	
_____	Aclaración y DNI
Firma del paciente (en caso de corresponder)	
_____	Aclaración y DNI
Firma del investigador que ha informado	
_____	Aclaración y DNI
Firma de testigo (en caso de corresponder)	