

Efecto bimodal de la ciclofosfamida en la terapia antineoplásica

Cyclophosphamide bimodal effects in antineoplastic therapy

Matar, Pablo, MS; Scharovsky, O. Graciela, PhD.

Resumen

La Ciclofosfamida (Cy) es el agente alquilante más utilizado en el tratamiento quimioterápico de diversas neoplasias humanas; habitualmente se la administra en combinación con otros citostáticos para lograr una mayor eficacia terapéutica.

La mayoría de los protocolos clínicos la emplean en dosis altas y suministrada en repetidas ocasiones a lo largo del tratamiento antineoplásico, con las ya conocidas acciones colaterales, entre ellas la inmunodepresión. Sin embargo, en diferentes modelos experimentales en animales portadores de un tumor, la administración de una dosis única y relativamente baja en un determinado momento de la respuesta inmune antitumoral, produce inmunopotenciación, a través de una inhibición selectiva sobre los linfocitos T supresores.

Posteriormente se demostró un efecto interesante y novedoso de éstas dosis bajas de Cy: su acción preferencial sobre células tumorales con fenotipo metastásico (probablemente debido a una inmunomodulación selectiva sobre dichas subpoblaciones celulares), ya que se observó una inhibición total en la formación de las metástasis sin afectar el desarrollo del tumor primario. Estos resultados señalan el efecto bimodal de la Cy sobre el sistema inmune del huésped cuando se la utiliza en el tratamiento antineoplásico en diferentes dosis y esquemas de administración.

La utilización de sustancias naturales denominadas “modificadores de la respuesta biológica”, ha derivado en lo que se conoce como cuarta modalidad terapéutica contra el cáncer. Se propone que la Cy sea considerada también dentro de ese contexto.

Unitermos: ciclofosfamida; metástasis; modificadores de la respuesta biológica; inmunomodulación.

Abstract

Cyclophosphamide (Cy), one of the chemotherapeutic agents more frequently used in clinical oncology, was originated after the chemical structure of mechlorethamine was modified to obtain an anticancer agent with higher selectivity for neoplastic tissues. The systematic use of chemotherapeutic drugs in cancer treatment made apparent that these compounds, given in large doses, usually cause impairment of the host defense mechanisms as a consequence of the inhibition of cellular proliferation.

Nevertheless, it was demonstrated in several experimental models, that the administration of a single-low dose of Cy to tumor bearing animals, when the antitumoral immune response has fully developed, produces an immunopotentialization through a selective inhibition of T suppressor lymphocytes. Moreover, the observation of a total inhibition of metastases formation without altering the primary tumor growth, demonstrated an interesting new effect of such therapeutic modality: its preferential action against tumoral cells with metastatic phenotype, probably to a selective immunomodulation on these cellular subpopulations. These findings indicate a bimodal effect of Cy: depending on the dose and schedule of administration, it causes immunodepression or immunopotentialization.

The use of biological response modifiers has led to what nowadays is known as the fourth therapeutic modality against cancer. It is proposed that Cy should also be considered within that context.

Key words: cyclophosphamide; metastasis; biological response modifiers; immunomodulation

Introducción

La era moderna de la quimioterapia del cáncer se inició en el intervalo entre la primera y la segunda guerra mundial, cuando Goodman y Dougherty analizaron el efecto de la mostaza nitrogenada (mecloretamina) sobre el crecimiento de un linfoma transplantado en ratones, para luego, en el año 1942 comenzar los estudios clínicos⁽¹⁾. Un interesante razonamiento químico, basado en la estructura de la molécula de mecloretamina, condujo a la síntesis de la Ciclofosfamida (Cy)⁽²⁾, que en poco tiempo se convirtió en el agente alquilante más utilizado en el tratamiento de diversas neoplasias^(3, 4).

Químicamente la Cy es un agente alquilante capaz de establecer uniones o enlaces covalentes con las moléculas de ADN, interfiriendo con su integridad y/o función (defectos de lectura del código genético, ruptura de la cadena de ADN, formación de uniones intercatenarias estables, etc.)⁽⁵⁾. Este fármaco es activado metabólicamente en el hígado por el sistema de oxidasa de función mixta del retículo endoplásmico liso (citocromo P-450), que conduce finalmente a la formación de varios metabolitos con diferente actividad biológica⁽⁶⁾. Estos metabolitos son agentes ciclo-específicos, es decir que actúan predominantemente sobre células en división (ocasionalmente pueden tener cierto efecto sobre células quiescentes, G₀).

La detección precoz de un tumor primario, posible por el gran avance de las técnicas explorativas, permite en la mayoría de los casos, su tratamiento exitoso con cirugía solamente o combinada con quimio y/o radioterapia. La Cy utilizada en monokuimioterapia⁽⁷⁾ o en combinación con otras drogas en planes de poliquimioterapia^(8, 9), ha demostrado buenos resultados en el tratamiento de ciertas neoplasias humanas: linfoma de Hodgkin y no-Hodgkin^(10, 11); carcinomas de mama^(12, 13), colon⁽¹⁴⁾ y pulmón⁽¹⁵⁾; mieloma múltiple⁽¹⁶⁾; melanoma⁽¹⁷⁾, etc. No obstante, para conseguir este efecto citotóxico sobre células neoplásicas es necesario suministrar, en forma repetida, dosis altas de la droga, lo cual provoca en el huésped efectos adversos tales como náuseas y vómitos, alopecia, cistitis hemorrágica, esterilidad, segundas neoplasias (como carcinoma de vejiga) y, quizás el más importante en este tipo de tratamientos, *inmunodepresión*, particularmente en la inmunidad celular.

Las células linfoides están en permanente división, lo que las convierte en poblaciones celulares muy susceptibles a la acción de este fármaco^(18, 19). La administración de una dosis subletal de Cy a animales de experimentación induce, 6 a 8 horas después, el cese de las mitosis y la desintegración de los elementos figurados en la médula ósea y otros tejidos linfoides⁽²⁰⁾. Este efecto inmunodepresor directo no es, sin embar-

go, el único resultado de la interacción entre agentes quimioterápicos y el sistema inmune. En la actualidad hay suficiente evidencia experimental que señala que el nivel de complejidad de la interacción es mucho mayor de lo que se creía originalmente.

Inmunomodulación de la respuesta inmune contra tumores primarios

La noción de la compleja interacción entre la Cy y el sistema inmune se deriva de los resultados observados en experimentos "in vitro" e "in vivo". Estos trabajos indican que:

a) Los diferentes tipos celulares del sistema inmune difieren marcadamente en su sensibilidad a esta droga^(21, 22).

b) No solo las distintas líneas celulares del sistema inmune (macrófagos, linfocitos, etc.) sino también las subpoblaciones de una misma línea (linfocitos T helper (T_H), T supresores (Ts), etc.), muestran esa sensibilidad diferencial⁽²³⁻²⁵⁾.

c) Existe un efecto sinérgico entre la acción directa de la Cy sobre las células neoplásicas y la inmunomodulación de la respuesta antitumoral⁽²⁶⁾.

Esta última conclusión se basa en la observación de que el tratamiento con Cy fue menos efectivo en animales inmunodeprimidos portadores de un tumor, que en portadores inmunocompetentes. El estudio de la Cy en combinaciones huésped-tumor singéico, en las que las líneas celulares tumorales diferían en su inmunogenicidad pero tenían una sensibilidad semejante a la droga, mostró que la respuesta al tratamiento fue mayor en aquellos tumores más inmunogénicos. Se vió, además, que el rechazo tumoral estuvo asociado a una infiltración local de células inmunes (linfocitos, macrófagos) y que estos animales quedaban protegidos contra un desafío posterior con el mismo tumor⁽²⁷⁾.

Estos resultados abrieron nuevas líneas de investigación que estudian el efecto antitumoral de la Cy bajo la perspectiva más amplia de la inmunomodulación^(28, 29). Varias hipótesis intentan explicar el modo en que la

Cy modifica la respuesta inmune antitumoral y cómo éste fenómeno contribuye con el efecto tóxico directo de la droga sobre las células neoplásicas para aumentar su eficacia terapéutica; la que propone que la Cy inactiva mecanismos supresores de la respuesta inmune antitumoral, permitiendo la generación y/o expresión de una mayor respuesta citotóxica, es la que cuenta con mayor fundamento experimental⁽³⁰⁻³⁵⁾.

Basándose en los experimentos de Maguire y Ettore de 1967⁽³⁶⁾, varios grupos de investigadores pudieron demostrar que la Cy tiene una actividad bifásica sobre el sistema inmune del huésped: bajo ciertas condiciones de tratamiento y especialmente utilizando dosis altas de la misma, produce una potente inmunodepresión, mientras que en dosis bajas está asociada a una expresión aumentada de la reactividad inmune, especialmente, pero no exclusivamente, la inmunidad mediada por células^(37, 38).

Los resultados obtenidos por Hengst y col.⁽³⁹⁾ utilizando el plasmocitoma murino MOPC-315 son claramente representativos del potencial terapéutico de la Cy como inmunomodulador. En éste modelo la erradicación de tumores de gran tamaño se logró tanto con dosis altas como bajas de la droga. Las dosis altas tuvieron una actividad tumoricida directa y produjeron inmunodepresión en el huésped; las dosis bajas indujeron el rechazo inmunológico del tumor y depleción de linfocitos T supresores.

Poco tiempo después, Berendt y North demostraron que la eliminación de células T supresoras con dosis bajas de Cy, facilita la erradicación de un tumor por transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos activados⁽⁴⁰⁾.

Tanto los ensayos "in vitro" de Kaufmann y col.⁽⁴¹⁾, como los estudios "in vivo" de Hoover y col.⁽⁴²⁾, demostraron la susceptibilidad diferencial de las subpoblaciones de células T a dosis bajas de Cy. Estos investigadores encontraron una disminución selectiva de la función de los linfocitos T supresores, mientras que la de los linfocitos T citotóxicos no fue afectada. Estos resultados permiten ex-

plicar el efecto inmunopotenciador de las dosis bajas de Cy sobre una variedad de tumores primarios experimentales.

Es necesario destacar que el efecto diferencial de la Cy sobre el sistema inmune del huésped portador del tumor depende, no solo de la dosis, sino también del momento de administración de la droga con respecto al implante tumoral⁽⁴³⁾.

Algunos autores han demostrado que el efecto inmunopotenciador de la Cy se obtiene cuando ésta es inyectada antes del implante tumoral^(44, 45), argumentando una acción de la droga sobre linfocitos T presupresores que todavía no fueron activados por el antígeno, sin embargo estos modelos experimentales no resultan útiles cuando se intenta extrapolarlos al nivel clínico para estudiar una posible acción terapéutica en la neoplasias humanas.

Con el propósito de encontrar un modelo homologable a la situación clínica, Racca y col. en nuestro Instituto, trabajando con un sarcoma transplantable de rata (S-E100), pudieron demostrar que una dosis baja y única de Cy administrada a los 7, 14 o 21 días *después* del implante tumoral s.c. (cuando los animales han completado su respuesta inmune antitumoral) producía la regresión total de los tumores en crecimiento; el efecto inmunomodulador de la Cy en este modelo fue confirmado a través de ensayos de hipersensibilidad cutánea tardía, comportamiento de un segundo implante tumoral y ensayos de transferencia pasiva de células inmunes, además de estudios histológicos que evidenciaron una regresión tumoral compatible con rechazo mediado por células. Este fenómeno, en cambio, no fue observado cuando la droga fue suministrada antes o inmediatamente después del inóculo tumoral⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

Estos resultados destacan la necesidad de futuros estudios sobre la dosis y el momento de administración de la Cy en otros modelos que utilicen tumores experimentales, ya que estas dos variables son decisivas para lograr el efecto inmunopotenciador de la droga sobre la respuesta inmune antitumoral.

En ensayos clínicos en pacientes con melanoma diseminado, se han utilizado dosis bajas de Cy con el propósito de eliminar selectivamente la función de los linfocitos T supresores, como tratamiento previo a 3 tipos de inmunoterapia diferentes: linfocitos TIL + IL-2⁽⁴⁹⁾; IL-2⁽⁵⁰⁾ o vacuna de células autólogas⁽⁵¹⁾. En todos los casos, el pretratamiento con Cy aumentó el desarrollo de la inmunidad antitumoral mediada por células, confirmándose una vez más la actividad de los linfocitos T supresores como componente importante en la relación huésped-tumor.

Inmunomodulación de la respuesta inmune antimetastásica

Las metástasis constituyen la característica común a todas las neoplasias malignas y se desarrollan a través de una compleja serie de etapas secuenciales, muchas de ellas reguladas genéticamente⁽⁵²⁾. Las células tumorales deben sobrellevar con éxito cada una de estas etapas para poder colonizar finalmente tejidos cercanos o distantes del tumor primario.

Las etapas de la cascada metastásica, que encierran en sí mismas una particular complejidad, tanto desde el punto de vista bioquímico como genético, pueden ser ordenadas de la siguiente manera:

- a) Proliferación de células neoplásicas y vascularización del tumor primario (angiogénesis).
- b) Invasión del estroma local por las células tumorales.
- c) Intravasación.
- d) Diseminación de las células neoplásicas a través del sistema sanguíneo y/o linfático, en forma aislada o como émbolos.
- e) Detención en los lechos capilares de los órganos.
- f) Extravasación y sobrevivencia de las células tumorales.
- g) Proliferación dentro del parénquima y formación del tumor secundario.

Puesto que la acción inmunomoduladora antitumoral de la Cy fue descripta solamente para tumores primarios, en los que dicho efecto demostró ser altamente dependiente de la dosis utilizada y del momento de inoculación de la droga con respecto al implante tumoral, resultó interesante investigar si el mecanismo era también efectivo en el tratamiento de las metástasis.

Utilizando un modelo experimental de un linfoma transplantable (Linfoma TACB) en ratas, se demostró que una única inyección de Cy en dosis "ultra baja" (de las que se conoce su efecto preferencial en la eliminación de la actividad de células T supresoras)⁽⁴²⁾, en animales portadores del tumor en crecimiento de 14 días de evolución, inhibió totalmente la formación de metástasis ganglionares sin afectar el desarrollo del tumor primario en su localización s.c.⁽⁵³⁾. Este resultado puso de manifiesto un efecto novedoso de la Cy: su acción selectiva sobre células tumorales con fenotipo metastásico.

Actualmente se reconoce que la formación de las metástasis es un proceso que estaría regulado por genes total o parcialmente independientes de los genes que controlan el crecimiento tumoral primario⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾. En consecuencia resulta de interés profundizar el estudio de una posible acción inmunomoduladora antitumoral de la Cy *exclusivamente* sobre el desarrollo metastásico, teniendo en cuenta que el mismo constituye el principal impedimento para desarrollar una terapia antitumoral exitosa.

Trabajos posteriores estuvieron orientados hacia el estudio de una posible acción de la droga sobre alguna/s etapa/s en particular de la cascada metastásica, ya que los resultados comentados anteriormente demostraron un efecto inhibitorio de la Cy sobre el desarrollo metastásico considerado globalmente.

En tal sentido, un ensayo de metástasis experimental con el mismo tumor y el mismo huésped demostró que una única inyección de Cy en dosis baja, 7 días después de un inóculo i.v. de células tumorales, produce una disminución en el porcentaje de animales que desarrollan metástasis en diferentes órganos

(pulmón, bazo, hígado, ganglios y médula ósea), además de un retardo significativo en el tiempo en que se detectan dichas metástasis⁽⁵⁸⁾. Este efecto tendría lugar en la segunda mitad de la cascada metastásica, es decir desde la diseminación sanguínea hasta la siembra en los diferentes órganos (desde la etapa "d" hasta la "g").

Estos resultados son opuestos a los obtenidos por Carmel⁽⁵⁹⁾ y van Putten⁽⁶⁰⁾, quienes observaron una exaceración de las metástasis pulmonares causada por la administración de Cy previa al implante de células tumorales en ratones singeneicos. Las dosis altas y el esquema de administración empleados por estos autores (antes o inmediatamente después del desafío tumoral), son variables muy importantes en este tipo de ensayos que podrían explicar las diferencias entre sus resultados y los nuestros.

Se postularon dos probables mecanismos de acción para explicar el efecto antime-tastásico de la Cy, los cuales no son mutuamente excluyentes entre sí:

Efecto citotóxico directo sobre células tumorales con fenotipo metastásico.

Resultados tales como la tasa de crecimiento del tumor primario, la cual no fue afectada por el tratamiento con la Cy, y el porcentaje de animales portadores del tumor que desarrollaron metástasis, el cual fue significativamente menor en el grupo tratado en relación a los testigos sin tratamiento, sugiere un efecto inhibitorio de la Cy sobre los focos micrometastásicos, los cuales están compuestos por células fenotípicamente diferentes de las células del tumor primario.

Inmunomodulación de la respuesta inmune contra células metastásicas.

Nuestros resultados, al igual que los de otros autores, demuestran un efecto inmunomodulador sobre diferentes tumores primarios^(35, 46), por lo cual no se podría descartar un efecto similar sobre células metastásicas.

Estudios preliminares tendientes a demostrar alguno de los mecanismos de acción propuestos permitirían descartar una acción tóxica directa de la droga como efecto principal en la inhibición de la formación de metástasis,

ya que la inoculación i.v. ó s.c. de células tumorales provenientes de animales tratados con Cy produce un porcentaje de metástasis similar al grupo que recibió células tumorales provenientes de animales sin tratamiento con la droga; por el contrario, linfocitos esplénicos de animales portadores del tumor y tratados con Cy inoculados conjuntamente con células tumorales en animales sin tratamiento previo, fueron capaces de transferir el efecto antimetastásico observado en los experimentos iniciales (resultados no publicados).

Por lo tanto, el efecto inhibitorio de la Cy, en dosis baja y única, sobre la formación de metástasis, se verificaría a través de una inmunomodulación selectiva de la droga sobre determinadas subpoblaciones linfocitarias que ejercerían su acción preferencialmente sobre células tumorales con fenotipo metastásico.

Si bien no puede descartarse totalmente una posible acción citotóxica directa de la Cy sobre células tumorales, esta sería de menor magnitud, al menos en este modelo experimental.

Si se confirma el efecto inmunomodulador antimetastásico de la Cy en otros modelos experimentales que utilicen especies animales diferentes, el mismo tendría una enorme implicancia en futuros ensayos clínicos, ya que los medios terapéuticos actuales para el tratamiento de las metástasis son escasos, requieren de alta tecnología (ej: trasplante de médula ósea) y se aplican en un bajo porcentaje de los casos.

De lo expuesto anteriormente, surge con claridad la existencia de un efecto bimodal de la Cy con respecto al sistema inmune, lo cual tiene diferentes consecuencias en la terapia antineoplásica. La utilización de dosis altas y repetidas ejerce un efecto citotóxico antitumoral y conduce a la inmunodepresión con sus conocidas secuelas; el empleo de una dosis baja y única administrada en un momento adecuado de la respuesta inmune del huésped contra el tumor estimula los mecanismos antitumorales y antimetastásicos que tienden a eliminar o disminuir los tumores primarios y secundarios.

Resulta evidente que este último efecto de la Cy presupone la inmunogenicidad del tumor a tratar. Por lo tanto, quedarían excluidos de este tipo de tratamiento los tumores no inmunogénicos.

Perspectivas futuras

Hemos demostrado que la Cy, administrada en dosis baja y única, ejerce un efecto inhibitorio sobre la formación de metástasis. Este efecto podría deberse a una inmunomodulación selectiva que ocurriría en alguna/s de la/s etapa/s de la cascada metastásica, desde la diseminación sanguínea de células tumorales hasta la siembra en diferentes órganos⁽⁵⁸⁾. Las investigaciones futuras estarán dirigidas a estudiar las etapas tempranas de la cascada metastásica y a demostrar o descartar un posible efecto de la Cy sobre las mismas.

Tanto la angiogénesis como la invasión son características determinantes de la capacidad de diseminación de un tumor primario, y por lo tanto de su malignidad⁽⁶¹⁾. Cualquier droga capaz de inhibir alguno/s de estos procesos estaría bloqueando etapas decisivas de la cascada metastásica, y constituiría un tratamiento de elección para el cáncer diseminado.

Los experimentos en curso intentarán profundizar los conocimientos en éste área y probablemente puedan acercar la posibilidad de su aplicación en el tratamiento de diferentes tumores humanos.

Síntesis

Los esfuerzos por modificar la estructura química de la mecloretamina a fin de lograr mayor selectividad para los tejidos neoplásicos, condujeron al desarrollo de la Cy⁽²⁾, que en la actualidad es una de las drogas quimioterápicas más frecuentemente utilizada en oncología clínica⁽³⁾.

Poco tiempo después de la introducción sistemática de los agentes quimioterápicos en el tratamiento del cáncer se hizo evidente que estas drogas podían suprimir los mecanismos de defensa del huésped, como una consecuencia más general de la inhibición en la proliferación celular. La capacidad inmunopotenciadora de algunos quimio-

terápicos, en cambio, surgió inadvertidamente durante estudios de inmunodepresión, y actualmente se ve renovado día a día el interés en éste área, en respuesta al impulso recibido desde una modalidad terapéutica relativamente nueva: la bioterapia⁽⁶²⁾.

Ya ha sido demostrado el efecto inmunomodulador de la Cy, tanto en animales como en el hombre, lográndose resultados positivos en el tratamiento de diversos tumores primarios. En cambio existen muy pocos trabajos relativos al tratamiento de las metástasis haciendo uso de dicha propiedad inmunopotenciadora.

Utilizando un modelo experimental en roedores, hemos podido demostrar un efecto inmunomodulador antimetastásico de la Cy, cuando ésta es inoculada en dosis muy baja y por única vez luego de transcurrido un tiempo del desafío tumoral⁽⁶³⁾.

También hemos avanzado un paso más en el estudio de las distintas etapas de la cascada metastásica que podrían ser blanco para la acción de esta droga; sin embargo, dada la extrema complejidad del fenómeno metastásico, son necesarios mayores estudios para cada etapa particular de dicho proceso; la experimentación en curso está encaminada en esa dirección.

El enfoque multidisciplinario del tratamiento del cáncer, basado en el empleo combinado de diferentes modalidades terapéuticas, mejorará notablemente el control de esta enfermedad.

El descubrimiento de ciertas sustancias naturales dotadas de propiedades "modificadoras de la respuesta biológica", mediadas parcialmente por un efecto amplificador de la respuesta inmune, ha abierto, en los últimos años, nuevas e interesantes perspectivas terapéuticas, habida cuenta de las limitaciones de la cirugía, la falta de selectividad y consecuente bajo índice terapéutico de tratamientos quimio y radioterápicos y los controvertidos y limitados resultados de la inmunoterapia clásica.

Algunos autores ya consideran a las sustancias con estas propiedades como "cuarta

modalidad terapéutica contra el cáncer"⁽⁶⁴⁾. Creemos que la Cy debe ser considerada también dentro de este contexto.

Referências Bibliográficas

1. Gilman, A. - The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg*, 105: 574-578, 1963.
2. Brock, N.; Wilmmans, H. - The action of a cyclic phosphamide ester of nitrogen mustard on experimental tumors in rats: therapeutic effects and pharmacological properties of B518 ASTA. *Dtsch Med Wochenschr*, 83: 453-458, 1958.
3. Goodman y Gilman - Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7ª edición. Buenos Aires: Ed Médica Panamericana S.A., 1179, 1988.
4. Calabresi, P.; Welch, A.D. - Chemotherapy of neoplastic diseases. *Annu Rev Med*, 13: 147-202, 1962.
5. De Vita, V.T.; Hellman, S.; Rosemberg, S.A. - Cancer: Principles and Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Co, 1331, 1982.
6. Brock, N. Pharmacologic characterization of cyclophosphamide (NSC-26271) and cyclophosphamide metabolite. *Cancer Chemother Rep*, 51: 315-325, 1967.
7. Cooper, R.G.; Holland, J.F.; Glidewell, O. - Adjuvant chemotherapy of breast cancer. *Cancer*, 44: 793-798, 1979.
8. Buzdar, A.V.; Hortobagyi, G.N.; Smith, T.L. et al. - Adjuvant therapy of breast cancer with or without additional treatment with alternate drugs. *Cancer*, 62: 2098-2104, 1988.
9. Buzdar, A.V.; Blumenschein, G.R.; Gutterman, J.U. et al. - Postoperative adjuvant chemotherapy with fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide and BCG vaccine: A follow-up report. *JAMA*, 242: 1609-1513, 1979.
10. Kaplan, H.S. - Hodgkin's disease: Unfolding concepts concerning its nature, management and prognosis. *Cancer*, 45: 2439-2474, 1980.

11. Berard, C.W. - A multidisciplinary approach to non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Inter Med*, 94: 218-235, 1981.
12. Petrini, B.; Wasserman, J.; Blomgren, H.; Epsteom, S. - Changes of blood T cell subsets in patients receiving postoperative adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 20: 1485-1487, 1984.
13. Ellis, G.K.; Green, S.; Schulman, S.; Trantum, B.; Goldberg, R.S.; Livingston, R.B. - Combination chemotherapy and high-dose cyclophosphamide for poor prognosis breast cancer. *Cancer*, 64: 2409-2415, 1989.
14. Wooley, P.V.; Macdonald, J.S.; Schein, P.S. - Progress in Gastroenterology. New York: Grune & Stratton, 671, 1979.
15. Carbone, P.P. - Lung cancer, perspectives and prospects. *Ann Inter Med*, 73: 1003-1024, 1970.
16. Kyle, R.A.; Greipp, P.R. - Multiple myeloma and the monoclonal gammopathies. New York: Wiley, 261, 1981.
17. Kim, C.J.; Pak, K.; Hamaguchi, A.; Ishida, A.; Arai, Y.; Konishi, T.; Okada, Y.; Tomotoshi, T. - Primary malignant melanoma of the urethra. *Cancer*, 71: 448-451, 1993.
18. Bovbjerg, D.H.; Ader, R.; Cohen, N. - Long-lasting enhancement of the delayed-type hypersensitivity response to heterologous erythrocytes in mice after a single injection of cyclophosphamide. *Clin Exp Immunol*, 66: 539-550, 1986.
19. Kaymakcalan, Z.; Spitalny, G.L.; Bursuker, I. - In vitro expression of secondary anti-tumor immunity by in vivo tumor-sensitized T cells: inhibition by tumor-induced suppressor T cells. *Cancer Immunol Immunother*, 25: 69-74, 1987.
20. Kaplan, S.R.; Calabresi, P. - Drug therapy: immunosuppressive agents. *N Engl J Med*, 289: 952-954, 1973.
21. Sardi, A.; Agnone, C.; Anderson, G.; Bolton, J.S.; Sundgaard-Riise, K.; Nieroda, C; Minton, J.P. - Low-dose cyclophosphamide enhances helper-to-non-helper ratios. *Cancer Detec Prev*, 15: 217-224, 1991.
22. Berd, D.; Maguire, H.C.; Mastrangelo, M.J. - Immune modulating agents. New York: Marcel Dekker, 39, 1985.
23. Berd, D.; Maguire, H.C.; Mastrangelo, M.J. - Potentiation of human cell-mediated and humoral immunity by low-dose cyclophosphamide. *Cancer Res*, 44: 5439-5443, 1984.
24. Stevenson, H.C.; Fauci, A.S. - Activation of human B lymphocytes. Differential effects of in vitro cyclophosphamide on human lymphocyte subpopulations involved in B-cell activation. *Immunology*, 39: 391-408, 1980.
25. Ozer, H.; Cowens, J.W.; Collins, M. et al. - In vitro effects of 4-hydroperoxycyclophosphamide on human immunoregulatory T-subset function. *J Exp Med*, 155: 276-290, 1982.
26. Spreafico, F.; Vecchi, A.; Colotta, F.; Mantovani, A. - Cancer chemotherapeutics as immunomodulators. *Springer Semin Immunopathol*, 8: 361-374, 1985.
27. Spreafico, F.; Mantovani, A. - Immunomodulation by cancer chemotherapeutic agents and antineoplastic activity. *Pathol Annual*, 11: 177-205, 1981.
28. Berd, D.; Mastrangelo, M.J. - Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: reduction of T-suppressor function without depletion of the CD4+ subset. *Cancer Res*, 47: 3317-3321, 1987.
29. Turk, J.L.; Parker, D.; Cameron, A.E.P. - The effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. *Int J Tissue React*, 6: 205-211, 1984.
30. Askenase, P.W.; Hayden, B.S.; Gershon, R.K. - Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. *J Exp Med*, 141: 697-702, 1975.
31. Ferguson, R.M.; Simmons, R.L. - Differential cyclophosphamide sensi-

- vity of suppressor and cytotoxic cells precursors. *Transplantation*, 25: 36-41, 1978.
32. Mantovani, A. - The interaction of cancer chemotherapy agents with mononuclear phagocytes. *Adv Pharmacol Chemother*, 19: 35-47, 1983.
 33. Mastrangelo, M.J.; Berd, D.; Maguire, H. - The immunoaugmenting effects of cancer chemotherapeutics agents. *Seminars in Oncology*, 13: 186-194, 1986.
 34. North, R.J. - Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med*, 55: 1063-1074, 1982.
 35. Mokyry, M.B.; Colvin, M.; Dray, S. - Cyclophosphamide-mediated enhancement of antitumor immune potential of immunosuppressed spleen cells from mice bearing a large MOPC-315 tumor. *Int J Immunopharmac*, 7: 111-122, 1985.
 36. Maguire, H.C.; Ettore, V.L. - Enhancement of dinitrochlorobenzene (DNCB) contact sensitization by cyclophosphamide in the guinea pig. *J Invest Dermatol*, 48: 39-43, 1967.
 37. Lagrange, P.H.; Mackness, G.B.; Miller, T.E. - Potentiation of T-cell mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. *J Exp Med*, 139: 1529-1545, 1974.
 38. Turk, J.L.; Parker, D.; Poulter, L.W. - Functional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. *Immunology*, 23: 493-501, 1972.
 39. Hengst, J.C.D.; Mokyry, M.B.; Dray, S. - Cooperation between cyclophosphamide tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors. *Cancer Res*, 41: 2163-2167, 1981.
 40. Berendt, M.J.; North, R.J. - T-cell mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med*, 151: 69-80, 1980.
 41. Kaufmann, S.H.E.; Hah, H.; Diamantstein, T. - Relative susceptibilities of T-cell subsets involved in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells to the in vitro action of 4-hydroperoxycyclophosphamide. *J Immunol*, 125: 1104-1108, 1980.
 42. Hoover, S.K.; Barret, S.K.; Turk, M.T.; Lee, T.C.; Bear, H.D. - Cyclophosphamide and abrogation of tumor-induced suppressor T cell activity. *Cancer Immunol Immunother*, 31: 121-127, 1990.
 43. Hengst, J.C.D.; Mokyry, M.B.; Dray, S. - Importance of timing cyclophosphamide therapy for curing MOPC-315 tumor bearing mice. *Cancer Res*, 40: 2135-2143, 1980.
 44. Sladek, N.E. - Therapeutic efficacy of cyclophosphamide as a function of its metabolism. *Cancer Res*, 32: 535-542, 1972.
 45. Chassoux, D.M.; Gotoh, F.M.; Macclenan, I.C. - Analysis of synergy between cyclophosphamide therapy and immunity against mouse tumor. *Br J Cancer*, 38: 211-218, 1978.
 46. Racca, A.L.; Celoria, G.C.; Hinrichsen, L.I.; Scharovsky, O.G.; Font, M.T. - Efecto de la ciclofosfamida sobre el crecimiento de un sarcoma transplantable de rata (S-E100). *Medicina (Bs.As.)*, 48: 33-38, 1988.
 47. Racca, A.L.; Scharovsky, O.G.; Celoria, G.C.; Font, M.T. - Inmunomodulación por ciclofosfamida de la respuesta antitumoral a un sarcoma de rata. *Inmunología*, 10: 91-96, 1991.
 48. Racca, A.L. - Efecto de la ciclofosfamida sobre el crecimiento de un sarcoma transplantable (S-E100) en ratas endocriadas de la línea "m". Tesis Doctoral, Fac. Cs. Bioq. y Farm. (UNR), 1988.
 49. Rosemberg, S.A.; Packard, B.S.; Aebersold, P.M. et al. - Special report: Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 319: 1676-1680, 1980.

50. Mitchell, M.S.; Kempf, R.A.; Harel, W. et al. - Effectiveness and tolerability of low dose cyclophosphamide and low-dose intravenous interleukin-2 disseminated melanoma. *J Clin Oncol*, 6: 409-411, 1988.
51. Berd, D.; Maguire, H.C.; Mastrangelo, M.J. - Induction of cell mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with a melanoma cell vaccine preceded by cyclophosphamide. *Cancer Res*, 46: 2572-2577, 1986.
52. Schirrmacher, V. - Cancer metastasis: Experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. *Adv Cancer Res*, 43: 1-73, 1985.
53. Racca, A.L.; Scharovsky, O.G.; Celoria, G.C.; Font, M.T. - Prevención de las metástasis de un linfoma de rata mediante el tratamiento con ciclofosfamida. *Medicina (Bs.As.)*, 51: 395, 1991.
54. Celoria, G.C.; Font, M.T.; Hinrichsen, L.I.; Scharovsky, O.G.; Racca, A.L. - Influencia del genotipo del huésped en la formación de las metástasis de un linfoma transplantable de rata. *Medicina (Bs.As.)*, 50: 230-234, 1990.
55. Isakov, N.; Feldman, M.; Segal, S. - Genetic regulation of metastasis progression the development of pulmonary of the 3LL lung carcinoma is controlled by both a non-H2 gene(s) and a gene(s) linked to the H2-D region of the mouse MHC. *Transplant Proc*, 13: 778-782, 1981.
56. Collins, W.M.; Brown, D.W.; Ward, P.H.; Dunlop, W.R.; Elwood, B.W. - MHC and non-MHC genetic influences on Rous-Sarcoma metastasis in chicken. *Immunogenetics*, 22: 315-321, 1985.
57. Font, M.T.; Celoria, G.C.; Scharovsky, O.G.; Racca, A.L. - Herencia de la susceptibilidad a los tumores y a las metástasis en roedores. *Medicina (Bs.As.)*, 49: 258-264, 1989.
58. Scharovsky, O.G.; Matar, P.; Celoria, G.C.; Font, M.T. - Efecto de la ciclofosfamida en un ensayo de metástasis experimental en rata. *Medicina (Bs.As.)*, 52: 435, 1992.
59. Carmel, R.J.; Brown, J.M. - The effect of cyclophosphamide and other drugs on the incidence of pulmonary metastases in mice. *Cancer Res*, 37: 145-151, 1977.
60. Van Putten, L.M.; Kram, L.K.J.; Van Dierendonck, H.H.C.; Smink, T.; Fussy, M. - Enhancement by drugs of metastatic lung nodule formation after intravenous tumour cell injection. *Int J Cancer*, 15: 588-595, 1975.
61. Liotta, L.A.; Stracke, M.L.; Wewer, U.M.; Schiffmann, E. - Pathobiology of Neoplasia, New York: Plenum Press, 533, 1989.
62. Foon, K.A. - Biological response modifiers. The new immunotherapy. *Cancer Res*, 48: 1621-1639, 1989.
63. Matar, P.; Celoria, G.C.; Font, M.T.; Scharovsky, O.G. - Antimetastatic effect of a single-low dose of cyclophosphamide on a rat lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res*, (en prensa).
64. Mihich, E. - Future perspective for biological response modifiers: A view point. *Semin Oncol*, 13: 234-239, 1986.