

INMUNOMODULACIÓN Y ANTIANGIOGÉNESIS EN LA TERAPÉUTICA ONCOLÓGICA DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA CLÍNICA

O. GRACIELA SCHAROVSKY^{1,2}, PABLO MATAR^{1,3,*}, VIVIANA R. ROZADOS^{1,*}, MARÍA J. RICO^{1,§}, MARIANO F. ZACARÍAS FLUCK^{1,§}, LEANDRO E. MAINETTI^{1,§}, M. VIRGINIA FERNÁNDEZ ZENOBI¹, EDUARDO A. ROGGERO¹, SILVIA I. GERVASONI¹, ANA ROSSA¹, HERMAN A. PERROUD¹, ANDREA M. SÁNCHEZ¹, GUILLERMO C. CELORIA¹, MARÍA T. FONT¹

¹Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario,

²Consejo de Investigaciones UNR, ³CONICET

Resumen La investigación básica y pre-clínica en oncología celular y molecular son pilares fundamentales en los que se apoyan la mayoría de los adelantos en la terapéutica del cáncer. Los hallazgos obtenidos y su aplicación en la práctica clínica constituyen la causa del avance sostenido en el tratamiento de la enfermedad neoplásica. El objetivo de este trabajo es resumir y discutir los resultados pre-clínicos en inmunomodulación y anti-angiogénesis para el tratamiento de diversos tipos de tumores, obtenidos en nuestro Instituto durante los últimos 15 años, y la posterior traslación y aplicación del conocimiento experimental en un Ensayo Clínico Fase I/II. Se describen los resultados que contribuyeron a descifrar los mecanismos de acción de la inmunomodulación antimetastásica con ciclofosfamida, la quimioterapia metronómica con diferentes drogas únicas o combinaciones, y finalmente el diseño y resultados preliminares de un ensayo clínico de quimioterapia metronómica para pacientes con cáncer de mama avanzado.

Palabras clave: inmunomodulación, angiogénesis, cáncer, ciclofosfamida, celecoxib

Abstract *Immunomodulation and antiangiogenesis in cancer therapy. From basic to clinical research.*

Basic and pre-clinic research in cellular and molecular oncology are the main supports accounting for the advancement in cancer therapeutics. The findings achieved, and their implementation in clinical practice are responsible for the permanent improvement in the treatment of the neoplastic disease. Our present objective is to summarize and discuss the pre-clinical findings in immunomodulation and anti-angiogenesis for the treatment of several types of tumors obtained in our Institute during the last 15 years, and the subsequent translation and application of the acquired experimental knowledge in a Phase I/II Clinical Trial. We present the results and mechanisms of action of antimetastatic immunomodulation with cyclophosphamide, the metronomic chemotherapy with different single drugs and their combinations, and finally the design and preliminary results of a clinical trial with metronomic chemotherapy for patients with advanced breast cancer.

Key words: immunomodulation, angiogenesis, cancer, cyclophosphamide, celecoxib

Las terapias convencionales para el tratamiento del cáncer parecen haber llegado a una meseta de eficacia. Si bien el avance conseguido en los últimos años en los aspectos terapéuticos de algunos tumores ha sido significativo, en otros casos los índices de respuestas objetivas son muy bajos. El conocimiento molecular y celular de los procesos malignos ha permitido el diseño y aplicación de la terapia biológica del cáncer, constituyéndose en

Glosario

bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico
CEC: células endoteliales circulantes
Cel: celecoxib
CEP: células endoteliales progenitoras
COX-2: ciclo-oxigenasa 2
Cy: ciclofosfamida
DC: células dendríticas
DMT: dosis máxima tolerada
Dox: doxorubicina
EQC: esquemas quimioterapéuticos convencionales
FDA: Food & Drug Administration
Gal-1: galectina-1
IFN-γ: interferón gamma
IL-10: interleuquina-10
IL-10R: receptor de interleuquina-10
IL-2: interleuquina-2
IL-4: interleuquina-4
MDSC: células supresoras derivadas de médula ósea
QTM: quimioterapia metronómica
TGF-β: factor de crecimiento transformante beta
TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa
Tregs: linfocitos T reguladores
TSP-1: trombospondina-1
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
OMS: Organización Mundial de la Salud

Recibido: 30-VIII-2011

Aceptado: 31-X-2011

Dirección postal: Dra. O. Graciela Scharovsky, Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe 3100, 2002 Rosario, Santa Fe, Argentina
 Fax (54-341) 4804569 e-mail: graciela.scharovsky@gmail.com

*Contribuyeron igualmente

§Contribuyeron igualmente

la cuarta modalidad terapéutica en Oncología. La inmunoterapia¹ y la terapia antiangiogénica² están incluidas en este grupo de nuevas terapias racionales del cáncer.

Inmunoterapia del cáncer

Tiene como objetivo controlar el crecimiento y desarrollo de los tumores malignos mediante la activación de la respuesta inmune dirigida hacia las células neoplásicas. Para alcanzar este objetivo, una variedad de estrategias están siendo investigadas en diferentes modelos preclínicos y clínicos: (i) activación inespecífica del sistema inmune mediante citoquinas y otras moléculas, (ii) inmunoterapia específica con células tumorales autólogas o alogeneas modificadas para producir y secretar citoquinas, péptidos o proteínas, (iii) diferentes clases de vacunas, (iv) terapia celular adoptiva, (v) anticuerpos inmunoestimulantes, y otras³.

En la última década, se han evaluado nuevas estrategias de inmunoterapia en pacientes con distintos tipos de cáncer; sin embargo, las respuestas clínicas que se han obtenido están lejos de ser satisfactorias. La falta de respuestas clínicas objetivas a estos intentos terapéuticos ha estado generalmente asociada con la capacidad de las células tumorales de evadir el reconocimiento inmunológico a través de una variedad de estrategias conocidas como escape del tumor al rechazo inmunológico. Los mecanismos utilizados por los tumores para eludir el reconocimiento inmunológico incluyen la inducción de un deterioro en la maquinaria de presentación antigénica, la activación de señales co-estimuladoras negativas y la sobre-producción de factores solubles inmunosupresores. Estos procesos están regulados por mecanismos complejos y multifacéticos que involucran simultáneamente diferentes componentes del tumor, del huésped, y la interacción entre ambos⁴. El principal sitio en donde ocurre la mayoría de estas interacciones es el microambiente tumoral, el cual es una mezcla heterogénea de componentes celulares y no celulares. Los tipos celulares más relevantes que se pueden encontrar en el microambiente tumoral y que están involucrados en el escape al rechazo inmunológico son las células mieloides supresoras (MDSC), células dendríticas inmaduras (DCs), linfocitos T reguladores (Tregs) y macrófagos supresores⁵. Las células tumorales suelen tener la capacidad de promover activamente la expansión y/o reclutamiento de esta clase de células supresoras hacia el sitio en donde se está desarrollando el tumor y, por ende, están siendo investigadas como posibles blancos para la modulación inmune terapéutica, o como indicadores de la naturaleza de la respuesta inmune, a favor o en contra del desarrollo de un tumor⁶.

Las respuestas clínicas limitadas obtenidas con distintos tipos de inmunoterapia plantearon la necesidad de

revertir los mecanismos de escape utilizados por los tumores mediante el diseño de nuevos enfoques terapéuticos. Una importante estrategia emergente de esta concepción consiste en la manipulación del microambiente tumoral con el objetivo de revertir el contexto de inmunosupresión que influencia negativamente la actividad de las intervenciones inmunoterapéuticas antitumorales, particularmente el bloqueo de la actividad de las células supresoras y productos solubles⁷. Para conseguir este objetivo es necesario implementar estrategias integradoras, con capacidad de bloquear simultáneamente la actividad de la mayoría de los mecanismos inmunosupresores. La evidencia experimental sugiere que algunas drogas quimioterapéuticas, como la ciclofosfamida, podrían ser utilizadas con tal fin⁸.

La ciclofosfamida (Cy) es un agente alquilante ampliamente utilizado para el tratamiento de diferentes tipos de tumores, así como también en enfermedades autoinmunes. Numerosos estudios, tanto experimentales como clínicos, han demostrado un aparente efecto paradójico de Cy sobre la respuesta inmune antitumoral. Dosis altas de la droga producen reducción de las masas tumorales pero son inmunosupresoras, favoreciendo infecciones oportunistas e incluso segundas neoplasias. Por otro lado, la administración de dosis bajas de Cy ha demostrado potenciar la respuesta inmune, tanto en animales como en humanos, logrando en algunos casos la eliminación de tumores primarios. Este último fenómeno no se debería a una acción citotóxica directa de la droga, sino a un mecanismo de rechazo inmunológico⁹⁻¹³. Actualmente se acepta que este efecto bimodal de Cy sobre la respuesta inmune es altamente dependiente de la dosis y el esquema de administración¹⁴. Si bien el efecto inmunopotenciador de dosis bajas de Cy ha demostrado ser efectivo sobre una variedad de tumores primarios, su acción sobre las metástasis prácticamente no había sido explorada.

Terapia antiangiogénica

La proliferación y supervivencia de las células tumorales dependen de un adecuado suministro de nutrientes y oxígeno. En 1971, J. Folkman propuso que el crecimiento tumoral y el metastásico eran dependientes del proceso angiogénico, ya que cuando el tumor excede los 2-3 mm de diámetro es incapaz de crecer en ausencia de neovascularización o angiogénesis²; por lo tanto, su bloqueo podría ser una estrategia para impedir el crecimiento tumoral. La formación de nuevos vasos sanguíneos implica un delicado equilibrio de factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de los fibroblastos básico (bFGF) y factores antiangiogénicos como trombospodina-1 (TSP-1), así como también de la coordinación entre múltiples tipos de células como macrófagos, células endoteliales y

pericitos^{15, 16}. El conocimiento de las distintas moléculas y células involucradas en este proceso ha permitido el diseño de diferentes estrategias terapéuticas dirigidas a inhibir el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, como el anticuerpo humanizado anti-VEGF, bevacizumab, el cual fue el primer agente antiangiogénico aprobado por la FDA (*Food & Drug Administration*) para el tratamiento de cáncer de pulmón¹⁷, de mama¹⁸ y colorrectal¹⁹, o las drogas orales de bajo peso molecular, sorafenib y sunitinib, para el tratamiento del cáncer de riñón avanzado. Por otro lado, también se ha demostrado la inhibición de la angiogénesis en modelos animales con varias drogas quimioterapéuticas como la mitoxantrona, bisantreno, paclitaxel, ciclofosfamida y metotrexato²⁰⁻²³.

Aunque la mayoría de los tumores primarios pueden ser tratados exitosamente mediante cirugía sola o combinada con quimioterapia y/o radioterapia, en un elevado porcentaje de casos, al momento del diagnóstico de un tumor primario, el paciente ya posee múltiples micrometástasis que escapan a la capacidad de detección por los métodos diagnósticos disponibles. En consecuencia, la presencia de metástasis tumorales constituye la principal causa de muerte por cáncer, ya que estas son diagnosticadas tardíamente y los tratamientos convencionales poseen baja efectividad. Por lo tanto, uno de los objetivos principales en oncología clínica es mejorar los índices terapéuticos de los tratamientos anti-metastásicos²⁴.

El objetivo general de nuestra línea de investigación consiste en desarrollar estrategias terapéuticas antitumorales y/o antimetastásicas experimentales para diversos tipos de tumores, y estudiar el/los mecanismos de acción moleculares y celulares responsables de su actividad. Estas estrategias deben poseer simultáneamente elevada efectividad terapéutica y escasa toxicidad, con un consiguiente beneficio neto en calidad de vida para el portador del tumor.

Inmunomodulación antimetastásica con ciclofosfamida: mecanismos de acción

Utilizando un modelo de linfoma B de rata (L-TACB) demostramos un efecto novedoso de Cy. El tratamiento con una dosis única y ultra-baja de Cy (10 mg/kg de peso corporal) en animales portadores de tumor produjo una significativa inhibición del desarrollo de metástasis independiente del efecto antitumoral, ya que los tumores primarios no fueron afectados. El tratamiento con Cy inhibió tanto el desarrollo de metástasis espontáneas (originadas a partir de tumores subcutáneos) como el de metástasis experimentales (obtenidas mediante inyección de células tumorales vía intravenosa)²⁵. Los estudios acerca de los posibles mecanismos de acción de Cy en este modelo evidenciaron la inducción de inmunomodulación antimetastásica, ya que el efecto de inhibición del crecimiento

metastásico pudo ser transferido adoptivamente mediante células esplénicas de animales portadores del tumor que habían sido tratados con Cy, mientras que no tuvo lugar en ratones inmunodeficientes (*nude*). Para investigar si el tratamiento con Cy tenía otros efectos biológicos, además del ya mencionado, que contribuyeran al efecto terapéutico observado, se estudió si el mismo afectaba algunas de las etapas de la cascada metastásica. Demostramos que la administración del fármaco en dosis baja y única no modifica la motilidad de las células tumorales, ni su capacidad invasiva y angiogénica²⁶. Asimismo, y en concordancia con lo hallado en el modelo L-TACB, observamos el mismo efecto terapéutico inmunomodulador de Cy sobre las metástasis de otros tipos de tumores, como un fibrosarcoma de rata (sarcoma E100) y un linfoma T de ratón (L-DGE) (Matar P, Tesis Doctoral, 1999). Estos resultados indicaron que la capacidad antimetastásica del tratamiento inmunomodulador con Cy no estaba restringida a un tipo de tumor en particular, sino que se podía evidenciar en tumores de diferente origen histológico desarrollados en diferentes especies animales.

Posteriormente estudiamos los mecanismos inmunológicos a través de los cuales el tratamiento con dosis bajas de Cy produce la inhibición del crecimiento de las metástasis. Demostramos que en los animales portadores de L-TACB, los linfocitos esplénicos están caracterizados por una baja tasa de proliferación y producen un perfil de citoquinas tipo Th2, con elevados niveles de IL-10 y TGF- β ²⁷. Este perfil inmunológico es común a otros tipos de tumores experimentales y humanos y sería responsable del estado de inmunosupresión de las ratas portadoras de L-TACB y de su incapacidad de desarrollar una respuesta efectiva de rechazo inmunológico de las metástasis. En este modelo se observó un importante efecto con una dosis baja de Cy: la reversión del estado de inmunosupresión y el desarrollo de una respuesta inmunológica efectiva con capacidad inhibitoria del crecimiento metastásico. Nuestros resultados indicaron que el tratamiento con Cy induce un cambio en el perfil de producción de citoquinas hacia las de tipo Th1, con altos niveles de IL-2 e IFN- γ y disminución en la producción de citoquinas Th2. En forma concomitante, el tratamiento con Cy restablece la capacidad linfoproliferativa normal, la cual estaba significativamente disminuida durante el crecimiento del tumor; este efecto estaría mediado por la modulación inducida por Cy en la producción de IL-10, detectada a nivel central por linfocitos esplénicos y en sangre periférica^{28, 29}. En el mismo modelo experimental se estudió el efecto de Cy sobre la expresión de galectina-1 (Gal-1), una glicoproteína con propiedades inmunomoduladoras. Se ha demostrado que una de las propiedades de Gal-1 es inducir la muerte por apoptosis de los linfocitos T activados, impidiendo así el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral efectiva³⁰. Cuantificamos la expresión de Gal-1 en células L-TACB durante el desarrollo tumoral

y encontramos que la misma aumenta y que su expresión está asociada con una disminución de los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en esplenocitos de animales portadores del tumor, haciéndolos más susceptibles a la muerte apoptótica. El tratamiento con Cy produjo una disminución significativa en los niveles de expresión de Gal-1 tumoral, un aumento concomitante en la expresión de Bcl-2 esplénica y descenso de la apoptosis de las células inmunes. Estos novedosos hallazgos sugirieron un nuevo mecanismo de escape que utilizaría L-TACB para evadir la respuesta inmune de rechazo^{31, 32}.

El efecto diferencial de Cy sobre el tumor primario o las metástasis tuvo su correlación con resultados posteriores, que evidenciaron diferencias entre el fenotipo tumoral y el metastásico en el modelo L-TACB. Las células metastásicas producen IL-10 en cantidades elevadas y expresan el receptor para esta citoquina (IL-10R) en mayor proporción que las células tumorales primarias, las cuales no producen cantidades detectables de IL-10. Los estudios moleculares indicaron que la diferencia en la expresión del IL-10R entre ambos tipos celulares se debe a diferencias en mecanismos de regulación post-transcripcional³³.

Teniendo en cuenta nuestros resultados previos y otros que sugieren la participación de Gal-1 en mecanismos de inmunomodulación, nos interesó estudiar su cinética de expresión en diferentes modelos experimentales, así como también su modulación con Cy. En el modelo L-TACB, los resultados mostraron una expresión diferencial de Gal-1 en tumores primarios, metástasis y esplenocitos. Mientras que los niveles de Gal-1, analizados por *western blot* e inmunohistoquímica, aumentaron durante la progresión de los tumores primarios (correlación significativa y positiva entre volumen tumoral y Gal-1), disminuyeron en metástasis ganglionares y en células esplénicas. El tratamiento de ratas portadoras de L-TACB con una dosis única y baja de Cy produjo un descenso en la expresión de Gal-1 en células de tumores primarios hasta alcanzar los niveles basales. Por el contrario, el tratamiento con Cy aumentó los niveles disminuidos de Gal-1 en esplenocitos, incrementó la viabilidad celular e inhibió la apoptosis inducida por Gal-1 de linfocitos T esplénicos. En conjunto, estos resultados indicaron que el tratamiento con Cy capacita a las células inmunes para desarrollar una respuesta antitumoral efectiva, y que este efecto se debería, al menos parcialmente, a la modulación de la expresión de Gal-1³⁴.

En un modelo tumoral diferente (L-DGE: linfoma T murino), se observó un efecto similar de Cy sobre la expresión de Gal-1, lo que podría estar indicando un patrón de comportamiento similar de los linfomas respecto a expresión de Gal-1 y modulación por Cy, independientemente de la especie donde se desarrollen y el linaje celular de origen. Se sugiere la utilización de los niveles séricos de

Gal-1 como marcador de progresión tumoral y respuesta a la terapia inmunomoduladora con Cy.

La actividad de las células T reguladoras (Tregs) se ha reconocido como fundamental para el desarrollo y mantenimiento de la tolerancia inmune, y estarían involucradas activamente en la supresión de la respuesta inmune antitumoral³⁵. Teniendo en cuenta nuestros resultados previos, decidimos estudiar el efecto de Cy sobre diferentes subpoblaciones celulares de linfocitos T reguladores en el modelo L-TACB.

En animales portadores de L-TACB observamos un aumento significativo de linfocitos T reguladores, tanto naturales (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) como inducibles (CD4⁺CD25⁺IL-10⁺), a lo largo de la evolución tumoral. El tratamiento con una dosis baja y única de Cy disminuyó significativamente el porcentaje de ambas subpoblaciones linfocitarias. Por lo tanto, la acción inmunomoduladora de Cy, a la vez que induce un cambio en el perfil de citoquinas, de Th2 a Th1, modula negativamente las poblaciones linfocitarias reguladoras asociadas al escape tumoral³⁶.

Al mismo tiempo, resultó de interés analizar la población celular NKT I, que ha sido involucrada en la respuesta inmune antitumoral inespecífica. Las células NKT son células T que comparten algunas características con las células NK, producen citoquinas inmunoreguladoras, incluyendo IL-4, INF- γ y TNF- α y expresan las cadenas α y β del TCR, así como también receptores de células NK (NK1.1). A pesar de que estas células tienen actividad citolítica del tipo de las NK, pueden ser consideradas reguladoras de las respuestas inmunes, ya que producen citoquinas Th1 y Th2^{37, 38}. Estudiamos el efecto de Cy sobre la proporción de células NKT I en el modelo L-TACB. Observamos que durante el desarrollo tumoral se produjo un aumento de NKT I temporario, regresando al valor basal luego de dos semanas de evolución. El tratamiento con Cy no modificó el porcentaje de NKT I inducidas por el crecimiento tumoral, por lo que esta población celular no tendría un rol importante en el efecto antimetastásico obtenido con dosis bajas de Cy³⁹.

En base a estos resultados se desarrolló un modelo hipotético del proceso de transición del fenotipo tumoral primario al metastásico (Fig. 1) y de la modulación del sistema inmune inducida por el tratamiento con dosis bajas de Cy (Fig. 2) (Rico MJ, Tesis Doctoral, 2009).

Quimioterapia metronómica en modelos experimentales

En la quimioterapia convencional se trabaja con la hipótesis de la muerte celular logarítmica, que consiste en la inducción de muerte celular en un porcentaje constante. Sin embargo, este modelo es imperfecto ya que las células tumorales son heterogéneas y cada subpoblación

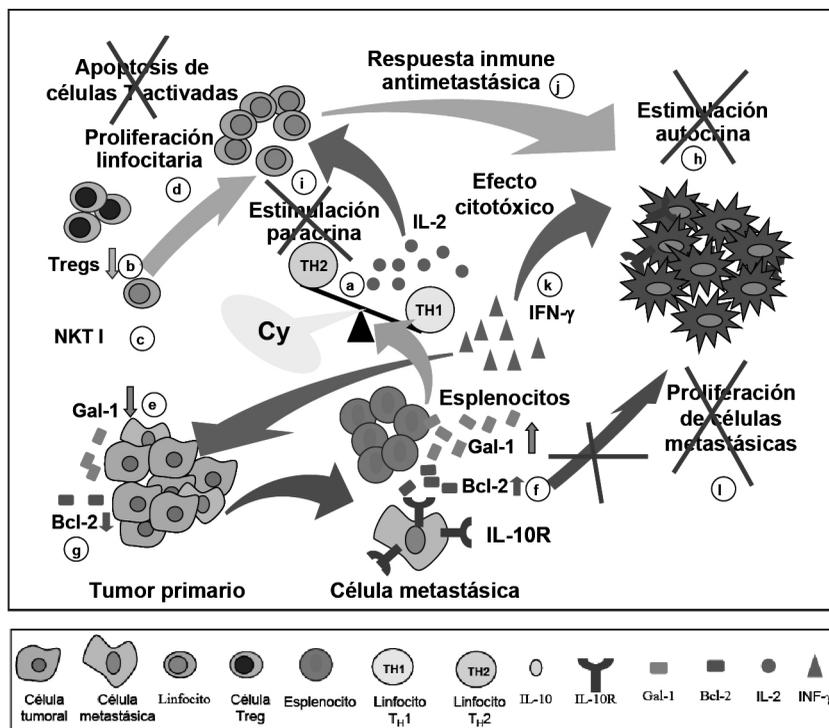
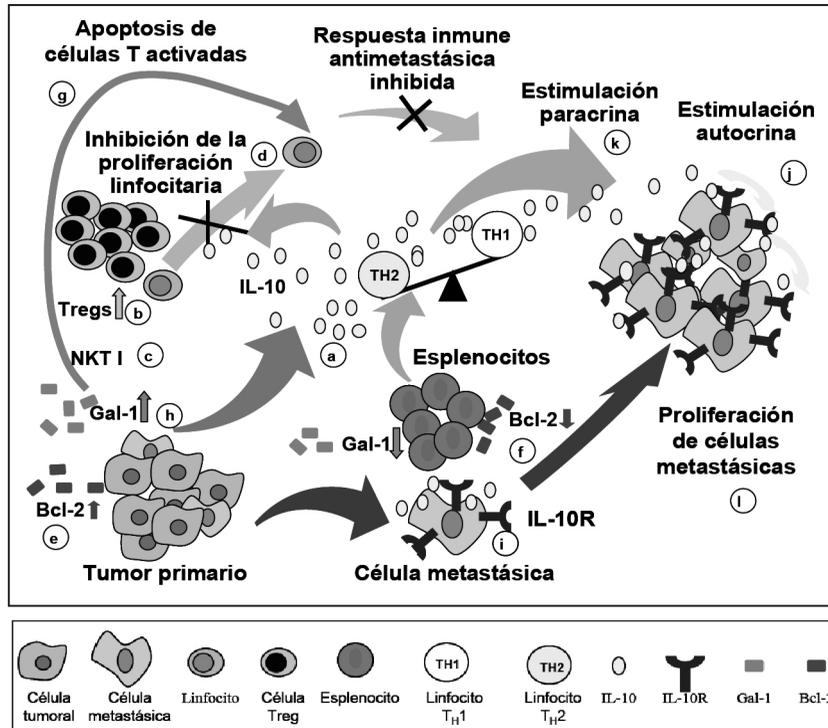


Fig. 2. Reversión del fenotipo metastásico por una dosis baja y única de ciclofosfamida. a) cambio del perfil de citoquinas de Th2 a Th1 con aumento de la producción de IL-2 e IFN- γ ; b) disminución de las poblaciones de Tregs; c) el porcentaje de las células NKT I séricas no se modifica; d) se restaura la capacidad linfoproliferativa; e) se regula negativamente la expresión tumoral de Gal-1; f) aumenta la expresión de Bcl-2 en los esplenocitos; g) aumenta la apoptosis tumoral al descender la expresión de Bcl-2; h) la disminución de IL-10 e IL-10R inhibe la estimulación autocrina e i) paracrina; j) restauración de la respuesta inmune antimetastásica; k) efecto citotóxico directo de IFN- γ sobre las células metastásicas y tumorales primarias; l) se inhibe el crecimiento metastásico.

responde de diferente manera a la quimioterapia. A ello se suma la inestabilidad genómica inducida por la misma terapia, que tiene como consecuencia el incremento de la heterogeneidad celular. Estas dos características son las responsables de la inducción de variantes celulares resistentes a la terapia. Asimismo, la célula tumoral sufre una evolución clonal hacia la célula metastásica.

Hace más de medio siglo la quimioterapia citotóxica fue introducida para el tratamiento de cánceres avanzados o metastásicos. Las drogas quimioterapéuticas inhiben la proliferación de las células tumorales dañando el ADN o inhibiendo su metabolismo o la formación de microtúbulos. El paradigma terapéutico que ha prevalecido mayoritariamente durante este período es: cuanto mayor es la dosis, mejor. En este contexto, el esquema terapéutico que se utiliza para conseguir los efectos deseados es la administración de drogas citotóxicas durante ciclos cortos y repetidos de la dosis máxima tolerada (DMT), intercalados con períodos de descanso que permitan al paciente recuperarse de los efectos secundarios inherentes al tratamiento. Desafortunadamente, los períodos de descanso favorecen el crecimiento de las variantes celulares más malignas y las resistencias al tratamiento.

En contraposición a la quimioterapia convencional en la que se administran las DMT, se planteó la quimioterapia metronómica (QTM) como una nueva modalidad terapéutica basada en un concepto básico enunciado por Isaiah Fidler en el año 2000: El cáncer es una enfermedad crónica y como tal debería ser tratada⁴⁰. El nombre de la terapia fue acuñado, también en el año 2000, por Douglas Hanahan⁴¹. La definió como una terapia que consiste en la administración de drogas en dosis bajas, menores a la DMT, en forma más frecuente y a intervalos regulares, sin períodos prolongados de descanso.

Los dos trabajos fundacionales de esta modalidad terapéutica fueron publicados en el año 2000 por los equipos de Robert Kerbel⁴² y Judah Folkman⁴³. Estos trabajos sentaron las bases de la QTM y establecieron con numerosos experimentos posteriores el mecanismo de acción antiangiogénico responsable del efecto antitumoral logrado con este tipo de terapia. Es decir, que su efectividad terapéutica se basa en la eliminación indirecta de las células tumorales a través de la disminución del aporte de oxígeno y nutrientes de la sangre. La importancia de la angiogénesis para el crecimiento tumoral fue establecida y profundamente estudiada por J. Folkman. Este conocimiento lo llevó a proponer que la inhibición crónica de la vascularización tumoral podría mantener al tumor en un estado dormido². La demostración del mecanismo de inhibición de la angiogénesis por medio de la QTM y su efecto antitumoral dio nuevo ímpetu a la propuesta de Folkman. La QTM no solamente tiene efecto antitumoral, sino que presenta niveles muy

bajos de toxicidad, mejorando la calidad de vida de los portadores de tumor⁴⁴.

Estudios posteriores indicaron que las células endoteliales serían el blanco terapéutico principal de la QTM^{45,46}. Al mismo tiempo, otros estudios sugirieron que el efecto anti-angiogénico estaría mediado por la acción de la trombospondina 1 (TSP-1)⁴⁷. Además, se demostró en un modelo murino que el reclutamiento de células hematopoyéticas y de células endoteliales progenitoras circulantes derivadas de la médula ósea (CEPs) son necesarias para la angiogénesis tumoral⁴⁸. Las CEPs pueden ser movilizadas a partir de la médula ósea por factores de crecimiento como VEGF, citoquinas, y por isquemia⁴⁹. Esas células serían también un blanco de la QTM⁵⁰.

Partiendo de nuestra experiencia previa con dosis únicas y bajas de Cy, nos planteamos estudiar el efecto terapéutico y la toxicidad de la administración de esta droga en esquemas metronómicos. Trabajamos con dos modelos de tumores transplantables de rata, el linfoma L-TACB y el sarcoma S-E100, y planteamos el comienzo de la terapia en el momento en que los tumores eran palpables y pequeños. La administración metronómica de Cy por vía intraperitoneal (i.p.) presentó un efecto terapéutico muy importante, dado que se observó la erradicación del 100% de los linfomas y del 83% de los sarcomas, sin observarse crecimiento metastásico ni recurrencias en el sitio primario para ambos tipos de tumores. Además, agregando ventajas adicionales, el tratamiento no produjo pérdidas de peso y estuvo exento de toxicidad hematológica, cardíaca, hepática y renal. En cuanto al mecanismo responsable del efecto antitumoral obtenido se observó que, al menos en parte, sería debido a un efecto antiangiogénico, dado que los niveles séricos de VEGF descendieron significativamente en los grupos tratados con respecto a los controles sin tratamiento, en ambos modelos experimentales⁵¹. Otra serie de experimentos estuvo orientada a investigar la participación del sistema inmune en el efecto antitumoral de la QTM con Cy en el modelo L-TACB. Se desafiaron con L-TACB ratas *e* eutímicas, singeneicas con L-TACB, y ratones *nude* atímicos y se los trató metronómicamente con Cy. La participación de la respuesta inmune en el efecto terapéutico obtenido fue muy evidente, dado que hubo regresión de todos los tumores (100%) que estaban creciendo en ratas eutímicas, y en ninguno (0%) de los que lo hacían en animales incapaces de desarrollar una respuesta inmune celular antitumoral⁵². Como síntesis de nuestros resultados, sumados a los de otros autores, en la Fig. 3 se grafican los probables mecanismos de acción de la QTM con Cy.

El éxito terapéutico obtenido con los modelos de linfoma y sarcoma nos llevó a investigar la eficacia de la QTM en los adenocarcinomas de mama, un tipo de tumor de gran relevancia en la salud pública de nuestro país en particular, y en el mundo en general. El cáncer

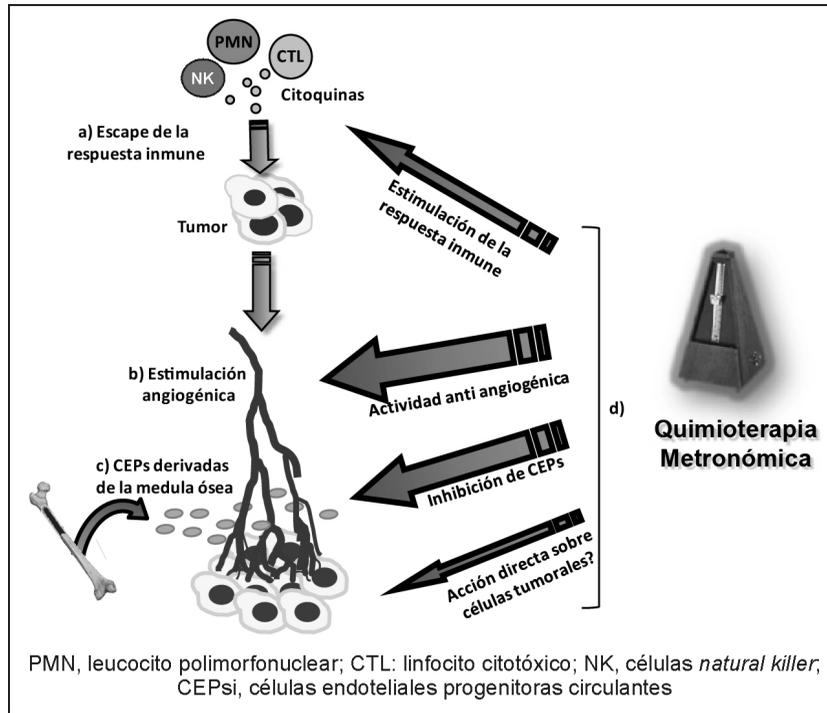


Fig. 3.- Posibles mecanismos de acción de la QTM: a) un tumor en crecimiento induce una respuesta inmune que el tumor se encarga de evadir; b) para continuar con su crecimiento, el tumor estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes y c) a partir de células progenitoras provenientes de la médula ósea; d) la QTM con ciclofosfamida actúa a través de varios mecanismos que están principalmente dirigidos a anular o disminuir aquéllos que posibilitan la progresión tumoral.

de mama es una de las neoplasias más comunes entre las mujeres, representando 1 de cada 3 cánceres diagnosticados en mujeres en EE.UU. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) informó que en la Argentina el cáncer de mayor incidencia en mujeres es el de mama, con una tasa de 74 casos por cada 100 000 mujeres (Instituto Nacional del Cáncer Información para Equipos de salud Análisis de situación del cáncer en la Argentina. http://www.msal.gov.ar/inc/equipos_analisis.asp)

Trabajamos con el modelo de adenocarcinoma mamario de ratón M-234p. Identificamos un esquema de QTM con Cy i.p. que mostró un efecto significativo en la disminución del volumen tumoral y aumento de la supervivencia, sin efectos colaterales relevantes. El efecto terapéutico logrado fue significativo, pero estuvo muy lejos de la eficacia antitumoral lograda en los modelos de linfoma y sarcoma.

Dado que el tipo de terapéutica propuesta es de administración crónica, se hizo evidente la conveniencia de suministrar la droga por vía oral en el agua de bebida en lugar de la administración i.p. Trabajamos con dos modelos de adenocarcinomas mamarios de ratón: M-234p y M-406. En ambos modelos tumorales, la administración metronómica de Cy mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral acompañado de un aumento de la supervivencia de los animales. El análisis inmunohis-

toquímico de los tumores para la expresión de la molécula CD34, marcadora del endotelio vascular, mostró la naturaleza antiangiogénica del tratamiento, dado que la densidad de vasos sanguíneos en los tumores tratados fue menor que la observada en los testigos. Los adenocarcinomas de mama estudiados desarrollan metástasis espontáneas cuando son inoculados por vía s.c. Sin embargo, dado que para estudiar el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de metástasis espontáneas habría que dejar crecer los tumores primarios más allá del tamaño éticamente permitido, recurrimos al método de metástasis experimentales. Se analizó el efecto de la QTM oral con Cy sobre las metástasis experimentales de M-234p. El tratamiento administrado disminuyó significativamente el número de metástasis pulmonares en este modelo.

El celecoxib (Cel) es un inhibidor de la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) bien tolerado y con escasa toxicidad. La sobreexpresión de la proteína COX-2 durante la carcinogénesis está implicada en los procesos de proliferación, invasión, apoptosis, supresión inmune y angiogénesis⁵³. Teniendo en cuenta que Cy y Cel podrían ejercer su actividad antitumoral a través de mecanismos de acción complementarios y no superpuestos, nos planteamos la hipótesis de que la QTM con la combinación de estas drogas podría mejorar los resultados anteriores sin un agregado de toxicidad significativa. Se utilizaron los modelos M-234p y M-406 para

estudiar el efecto antitumoral (transplante tumoral s.c.) y el efecto antimetastásico (inyección de células tumorales i.v.) de la combinación Cy + Cel. El efecto antitumoral de la QTM oral con la combinación Cy + Cel fue superior al obtenido con cada droga individualmente. Los animales que recibieron el tratamiento combinado presentaron una velocidad de crecimiento tumoral significativamente inferior al de los tratados con cada tratamiento único (monoterapia), y una mayor supervivencia. En el modelo antimetastásico los resultados fueron similares: los ratones tratados con la combinación presentaron una cantidad significativamente menor de focos metastásicos pulmonares y de menor tamaño, y un incremento significativo de la supervivencia. Es importante destacar que el agregado de Cel al tratamiento metronómico con Cy mejoró el efecto antitumoral y antimetastásico, y no generó toxicidad adicional, evaluada a través del estado general de los animales, su peso corporal y distintos parámetros serológicos y hematológicos⁵⁴.

Como parte de los estudios acerca de los posibles mecanismos de acción de la QTM combinada de Cy + Cel se evaluó la expresión intratumoral de CD34 por inmunohistoquímica y los niveles séricos de VEGF por ELISA. Los resultados demostraron que, al menos uno de los mecanismos involucrados en el efecto antitumoral de la combinación Cy + Cel, sería la inhibición de la angiogénesis tumoral. Como un primer paso para investigar si la QTM con Cy + Cel modulaba la respuesta inmune antitumoral, se implementó un modelo de administración del tratamiento combinado en ratones inmunodeficientes (*nude*) portadores de M-234p o M-406. Si bien los grupos tratados con Cy únicamente o con la combinación Cy + Cel presentaron un tamaño tumoral menor que el del grupo testigo, estas diferencias no fueron significativas, indicando ausencia de efecto terapéutico. Asimismo, se determinó el % de células Tregs naturales (CD4+CD25+Foxp3+) circulantes por citometría de flujo, en los dos modelos tumorales eutímicos a lo largo del tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados y los testigos correspondientes. Si bien los carcinomas mamarios suelen ser poco o débilmente inmunogénicos, los resultados obtenidos en nuestros modelos tumorales mostraron que la presencia del sistema inmune con capacidad para desarrollar una respuesta específica antitumoral, es un requisito necesario para que la QTM con Cy + Cel evidencie su actividad terapéutica. Aunque quedó demostrada la participación del sistema inmune en el efecto antitumoral del tratamiento combinado, el mismo no dependería de la modulación de las células Tregs.

La doxorubicina (Dox) es una antraciclina que inhibe la replicación del ADN e interfiere en la síntesis de ARN y que es de amplio uso en la quimioterapia convencional del cáncer de mama. En estudios previos demostramos que la QTM con Dox i.p. en un modelo de adenocarcino-

ma de mama retardaba significativamente el crecimiento tumoral, sin presentar toxicidad evidente.

La inhibición del crecimiento tumoral de adenocarcinomas mamarios obtenida previamente utilizando Cy o Dox como monoterapias en esquemas metronómicos condujo al diseño de un experimento en el cual se combinaron ambas drogas. Los animales que recibieron el tratamiento combinado Cy + Dox presentaron una mayor inhibición del crecimiento tumoral primario, una reducción en el número y tamaño de las metástasis experimentales y un aumento significativo de la supervivencia. Los tratamientos quimioterápicos convencionales con Cy y Dox están asociados frecuentemente a efectos secundarios no deseados en los pacientes, que suelen ser de moderados a graves. Por el contrario, la combinación de ambas drogas en el esquema de QTM utilizado en este estudio no generó aumento en la toxicidad⁵⁵.

Protocolo clínico de quimioterapia metronómica en pacientes con cáncer de mama

En la Argentina, el cáncer con mayor incidencia en mujeres es el de mama. La importancia que este tipo de tumor tiene en nuestra población y en el sistema de salud pública nos impulsó a trasladar a la clínica nuestra experiencia pre-clínica.

Tres líneas de evidencias experimentales y clínicas sugieren la existencia de una ventana terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama resistente a multidroga y nos condujeron al diseño de un ensayo clínico fase I/II con Cy y Cel administradas metronómicamente en pacientes con cáncer de mama avanzado y progresados a quimioterapia estándar: (i) el efecto antiangiogénico de dosis bajas de Cy⁵⁶ y de Cel⁵³ cuando son administrados individualmente; (ii) nuestros resultados preclínicos indicando los beneficios del tratamiento con ambas drogas⁵⁷; y (iii) la incipiente experiencia clínica publicada hasta el momento^{58, 59}. No existen antecedentes en la bibliografía de la utilización de este tipo de tratamiento en pacientes con cáncer de mama. El proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario (Res. N° 5732/2007) y por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) (Disp. N° 4596/09) y subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), lo que nos ubica dentro de los pocos grupos nacionales que realiza investigación clínica en forma independiente.

El protocolo clínico mencionado tiene como objetivo estudiar el efecto antitumoral y antimetastásico de la terapia metronómica con Cy + Cel e identificar biomarcadores de respuesta a la misma. El tratamiento consiste

en la administración de 50 mg diarios de Cy + 400 mg diarios de Cel distribuidos en dos dosis, ambos por vía oral. Se estudia la respuesta al tratamiento cada 8 semanas, según los criterios de la OMS, con examen clínico y estudios para evaluar la enfermedad mensurable. Se extraen muestras de sangre cada 15 días durante los primeros 6 meses y cada 30 días a partir de los 6 meses y se evalúan variables hematológicas, función renal, función hepática, toxicidad cardíaca y parámetros clínicos. También se identifican biomarcadores relacionados con angiogénesis, tales como la concentración sérica de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y TSP-1 (trombospondina-1), moléculas muy representativas del espectro de factores angiogénicos y antiangiogénicos, respectivamente⁶⁰. Al mismo tiempo se determina el porcentaje de células endoteliales circulantes (CECs) y células progenitoras circulantes (CEPs) derivadas de médula ósea, sobre las que la terapia metronómica podría ejercer actividad moduladora⁵⁰. Para la determinación de dichos biomarcadores se extrae sangre al inicio del tratamiento y luego cada 2 meses (Fig. 4). Se definió un umbral del 5% para la tasa de respuesta y se fijó una tasa esperada de respuesta del 25%. Asumiendo un error alfa de 0.05 y un error beta de 0.10, se considera adecuado reclutar un total de 15 pacientes en la primera etapa para llegar a 25 pacientes en la segunda. Es decir que si en la primera etapa no se obtiene respuesta en ningún paciente, se da por finalizado el estudio concluyendo sobre la no eficacia del tratamiento. Por el contrario, si se obtiene respuesta al menos en un paciente, se pasa a la segunda etapa y se reclutan 10 pacientes más. En este caso, se trabaja con una probabilidad de no pasar a la segunda etapa de reclutamiento de 0.46 si la tasa de respuesta obtenida es del 5%.

Actualmente el proyecto está en ejecución. Los resultados preliminares muestran un tiempo de permanencia de 4 a 64 semanas, estabilización de la enfermedad de

duración variable en el 70% de los pacientes y respuesta parcial en el 8%. En los esquemas quimioterapéuticos convencionales (EQC) la Cy se administra en dosis altas cada 21 días, debido a los efectos adversos. Aun cuando en la QTM la dosis de Cy acumulada/paciente en 21 días es similar a la administrada en los EQC, no se detectaron los graves efectos tóxicos característicos de éstos. La toxicidad hematológica (grado I y II, en el 15% de los pacientes) y gástrica (grado I, en el 30%) fue muy baja, sin evidencia de toxicidad hepática, renal o cardíaca asociada a la terapia. En cuanto a los marcadores estudiados, se observó un descenso significativo en la concentración sérica de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) en función del tiempo, y los pacientes con menores valores de la relación VEGF/TSP-1 mostraron la mayor permanencia en el estudio. Es importante destacar que las terapias antiangiogénicas en las que se utilizan drogas dirigidas a blancos moleculares administradas con la modalidad convencional han presentado, en ciertos casos, efectos adversos serios⁶¹. Por el contrario, con la modalidad terapéutica de QTM, la toxicidad de las drogas es mínima, lo que permite su administración crónica y su efecto continuo sobre el tumor.

Los resultados preliminares obtenidos sugieren que, conjuntamente con una respuesta terapéutica aceptable, se obtuvo una buena tolerancia a la terapia, sin toxicidad significativa y sin alteración de la calidad de vida, características que apoyan la continuación del protocolo clínico a fin de determinar su utilidad como terapia antitumoral en el cáncer de mama avanzado.

En conclusión, la investigación científica llevada a cabo durante los últimos 15 años a nivel básico y preclínico nos permitió realizar la traslación de los conocimientos adquiridos hacia una propuesta clínica que podría significar un avance en el tratamiento del cáncer de mama. Si bien los resultados son preliminares, se está evidenciando una tendencia positiva para pacientes

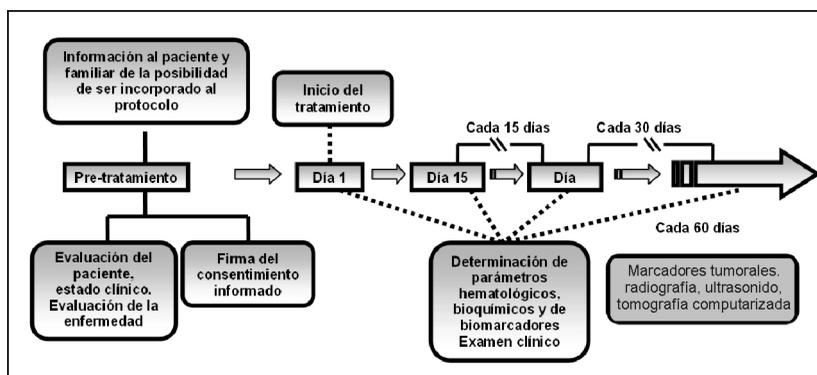


Fig. 4.– Protocolo clínico: cronograma de actividades.

que han agotado las posibilidades terapéuticas actualmente vigentes.

Agradecimientos: Agradecemos muy especialmente la participación, en diversas etapas de los experimentos descritos, de los laboratorios de los Dres. R. Daniel Bonfil (Detroit, MI, USA) y Gabriel A. Rabinovich (IBYME, CONICET) y la de los Dres. Stella M. Pezzotto, Carlos M. Alasino, Francisco Queralt. Asimismo, agradecemos al Dr. Ricardo Giordano por su colaboración con la citometría de flujo y a *Wiener Lab* por proveernos de los reactivos para las determinaciones hematológicas y serológicas. Este trabajo fue parcialmente subsidiado por la Universidad Nacional de Rosario (O. Graciela Scharovsky), la ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica), FONCyT, PICT (O. Graciela Scharovsky) y el CONICET, PIP (Pablo Matar). Pablo Matar es miembro de CONICET y O. Graciela Scharovsky es miembro de CIC-UNR (Carrera del Investigador Científico de la Universidad Nacional de Rosario).

Conflictos de interés: Los autores no tienen conflictos de interés que declarar

Bibliografía

- Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 411: 380-4.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-6.
- Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 83-117.
- Croci DO, Zacarias Fluck MF, Rico MJ, et al. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1687-700.
- Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison J. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunol Rev* 2009; 229: 67-87.
- Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 2006; 90: 51-81.
- Copier J, Dalgleish AG, Britten CM, et al. Improving the efficacy of cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1424-31.
- Brode S, Cooke A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev Immunol* 2008; 28: 109-26.
- North RJ. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med* 1982; 155: 1063-74.
- Proietti E, Greco G, Garrone B, et al. Importance of cyclophosphamide-induced bystander effect on T cells for a successful tumor eradication in response to adoptive immunotherapy in mice. *J Clin Invest* 1998; 101: 429-41.
- Pelaez B, Campillo JA, Lopez-Asenjo JA, Subiza JL. Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 2001; 166: 6608-15.
- Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 2004; 34: 336-44.
- Mihalyo MA, Doody AD, McAleer JP, et al. In vivo cyclophosphamide and IL-2 treatment impedes self-antigen-induced effector CD4 cell tolerization: implications for adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2004; 172: 5338-53.
- Matar P, Scharovsky OG. Cyclophosphamide bimodal effects in antineoplastic therapy. *Rev Bras Cancerol* 1996; 42: 33-42.
- Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 273-86.
- Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438: 967-74.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, et al: Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for nonsmall-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 2542-50.
- Miller K, Wang M, Gralow J, et al: Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 2666-76.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-42.
- Polverini PJ, Novak RF. Inhibition of angiogenesis by the antineoplastic agents mitoxantrone and bisantrene. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140: 901-7.
- Klauber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol. *Cancer Res* 1997; 57: 81-6.
- Hirata S, Matsubara T, Saura R, Tateishi H, Hirohata K. Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by low-dose methotrexate. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1065-73.
- Steiner R. Angiostatic activity of anticancer agents in the chick embryo chorioallantoic membrane (CHE-CAM) assay. *EXS* 1992; 61: 449-54.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
- Matar P, Celoria GC, Font MT, Scharovsky OG. Antimetastatic effect of a single-low dose of cyclophosphamide on a rat lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1995; 14: 59-63.
- Matar P, Rozados VR, Roggero EA, Bonfil RD, Scharovsky OG. Modulation of the antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide on rat lymphoma. *Tumor Biol* 1998; 19: 69-76.
- Matar P, Rozados VR, González AD, Dlugovitzky DA, Bonfil RD, Scharovsky OG. Mechanism of antimetastatic immunopotentiality by low-dose cyclophosphamide. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1060-6.
- Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky OG. Down regulation of T-cell-derived IL-10 production by low-dose cyclophosphamide treatment in tumor-bearing rats restores in vitro normal lymphoproliferative response. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 307-19.
- Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky OG. Th2/Th1 switch induced by a single low-dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 50: 588-96.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 267-96.
- Rabinovich GA, Rubinstein N, Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky OG. The antimetastatic effect of a single low-dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 50: 597-603.
- Scharovsky OG, Matar P, Zacarias Fluck M, Rico MJ, Rabinovich GA. From tumor-immune surveillance to tumor-immune escape: story of an enemy with multiple

- strategies of resistance and counterattack. *Inmunología* 2006; 25: 101-14.
33. Rico MJ, Matar P, Bonfil RD, Calcaterra N, Scharovsky OG. The transition to the metastatic phenotype of rat lymphoma cells involves up-regulation of IL-10 receptor expression and IL-10 secretion. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22: 127-35.
 34. Zacarías Fluck MF, Rico MJ, Gervasoni SI, et al. Low dose cyclophosphamide modulates galectin-1 expression and function in an experimental rat lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 237-48.
 35. Allan SE, Broady R, Gregori S, et al. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev* 2008; 223: 391-421.
 36. Rico MJ, Matar P, Zacarías Fluck MF, Giordano R, Scharovsky OG. Low dose cyclophosphamide (Cy) treatment induces a decrease in the percentage of regulatory T cells in lymphoma-bearing rats. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2007; 48: 233-3.
 37. Terabe M, Matsui S, Park JM, et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 2003; 198: 1741-52.
 38. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 354-64.
 39. Rico MJ, Mainetti LE, Rozados VR, Scharovsky OG. Effect of low dose cyclophosphamide (Cy) on NKT I cells in a rat experimental lymphoma model. *Biocell* 2010; 34: A16-6.
 40. Fidler IJ, Ellis LM. Chemotherapeutic drugs-more really is not better. *Nat Med* 2000; 6: 500-2.
 41. Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 1045-7.
 42. Klement G, Baruchel S, Rak J, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J Clin Invest* 2000; 105: R15-24.
 43. Browder T, Butterfield CE, Kråling BM, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 1878-86.
 44. Man S, Bocci G, Francia G, et al. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res* 2002; 62: 2731-5.
 45. Lennernäs B, Albertsson P, Damber JE, Norrby K. Antiangiogenic effect of metronomic paclitaxel treatment in prostate cancer and non-tumor tissue in the same animals: a quantitative study. *APMIS* 2004; 12: 201-9.
 46. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 423-36.
 47. Hamano Y, Sugimoto H, Soubasakos MA, et al. Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression. *Cancer Res* 2004; 64: 1570-4.
 48. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7: 1194-201.
 49. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102: 1340-6.
 50. Mancuso P, Colleoni M, Calleri A, et al. Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy. *Blood* 2006; 108: 452-9.
 51. Rozados VR, Sánchez AM, Gervasoni SI, Berra HH, Matar P, Scharovsky OG. Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma and sarcoma regression, and is devoid of toxicity. *Ann Oncol* 2004; 15: 1543-50.
 52. Rozados VR, Mainetti LE, Rico MJ, Zacarías Fluck MF, Matar P, Scharovsky OG. The immune response and the therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide. *Oncol Res* 2010; 18: 601-5.
 53. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Lagioia M, Gendler SJ, Mukherjee P. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 632-42.
 54. Mainetti LE, Rozados VR, Rossa A, Bonfil RD, Scharovsky OG. Antitumoral and antimetastatic effects of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide combined with celecoxib on murine mammary adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 151-63.
 55. Fernández MV, Mainetti LE, Rozados VR, Scharovsky OG. Antitumoral effect of metronomic chemotherapy (MCT) with cyclophosphamide (Cy) and doxorubicin (Dox) on M-406 murine mammary adenocarcinoma. *Biocell* 2010; 34: A12-2.
 56. Daenen LG, Shaked Y, Man S, et al. Low-dose metronomic cyclophosphamide combined with vascular disrupting therapy induces potent antitumor activity in preclinical human tumor xenograft models. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 2872-81.
 57. Scharovsky OG, Mainetti LE, Rozados VR. Metronomic chemotherapy. Changing the paradigm that more is better. *Curr Oncol* 2009; 16: 7-15.
 58. Bocci G, Tuccori M, Emmenegger U, et al. Cyclophosphamide-methotrexate 'metronomic' chemotherapy for the palliative treatment of metastatic breast cancer. A comparative pharmacoeconomic evaluation. *Ann Oncol* 2006; 17: 232-8.
 59. Buckstein R, Kerbel RS, Shaked Y, et al. High dose celecoxib and metronomic "Low-dose" cyclophosphamide is an effective and safe therapy in patients with relapsed and refractory aggressive histology non-hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5190-8.
 60. Shaked Y, Bocci G, Munoz R, et al. Cellular and molecular surrogate markers to monitor targeted and non-targeted antiangiogenic drug activity and determine optimal biologic dose. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5: 551-9.
 61. Chen HX, Cleck JN. Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 465-77.