

## Efecto de la ciclosporina-A sobre el desarrollo metastásico del melanoma B16F10: estudio experimental

I. López de Tejada \*, I. García-Alonso \*\*, I. Iturburu \* y J. J. Méndez \*\*\*

Cátedra de Patología y Clínica Quirúrgicas. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco (Catedrático: Prof. Dr. J. J. Méndez Martín)

Palabras clave: Ciclosporina A. Melanoma. Metástasis. Proliferación celular.

### Resumen

Con objeto de valorar el efecto de la ciclosporina A sobre el desarrollo de metástasis del melanoma B16F10 inoculado por vía intraesplénica, efectuamos diversos tratamientos con este agente: a) a partir de la inoculación tumoral y diariamente durante todo el proceso de diseminación metastásica (días 1 a 12); b) en la fase inicial del proceso (días 1 a 5), y c) en la fase final del mismo (días 7 a 12). El tratamiento durante todo el proceso y en la fase inicial en particular produce un incremento de la colonización hepática atribuible al efecto inmunosupresor del agente. El tratamiento en la fase final reduce significativamente el volumen de metástasis e incrementa la supervivencia media de los animales. Sin descartar otros posibles mecanismos, encontramos un efecto antiproliferativo directo de la CsA sobre las células del melanoma B16F10 cultivada «in vitro».

### Abstract

With the aim of assessing the effect of Cyclosporine A on the development of metastases of B16F10 melanoma inoculated by intrasplenic route, various treatments are carried out with this agent: a) starting from tumoral inoculation and daily during all the process of metastatic dissemination (1st. to 12th. days); b) in the initial stage of the process (1st. to 5th. days); and c) in its final stage (7th. to 12th. days).

\* Prof. contratado de Patología y Clínica Quirúrgica. \*\* Becario de la Cátedra de Patología y Clínica Quirúrgica. \*\*\* Catedrático de Patología y Clínica Quirúrgica.

Recibido: X-1986.

Correspondencia: Dr. Ignacio López de Tejada.  
Blas de Otero, 10. 5.º. B.  
48014 Bilbao.

The treatment during all the process, and particularly in its initial stage, causes an increase in hepatic colonization attributed to the immunosuppressive effect of the agent. The treatment in final stage reduces the volume of metastases significantly, and increases average survival of the animals. Without injecting other feasible mechanisms the authors find a direct antiproliferative effect of CsA on the cells of the B16F10 melanoma cultured «in vitro».

### Zusammenfassung

Um die Wirkung des Zyklosporins A auf die Entwicklung der Metastase des Melanoms B16F10, auf intralientem Wege eingeführt, würdigen zukönnen, haben die Verf. verschiedene Behandlungen mit diesem Agenten durchgeführt, und zwar: a) tumorale Inokulation täglich während des gesamten Prozesses der metastatischen Ausbreitung (1-12 Tage); b) in der Anfangsphase des Prozesses (1-5 Tage), und c) in der Endphase desselben (7-12 Tage). Die Behandlung während des ganzen Prozesses und insbesondere in der Anfangsphase führt zu einer Erhöhung der hepatischen Kolonisation, die auf die immunosuppressive Wirkung des Agenten zurückzuführen ist. Die Behandlung in der Endphase mindert den Umfang der Metastase erheblich und erhöht das durchschnittliche Überleben der Tiere. Ohne damit andere mögliche Mechanismen auszuschließen, konnten die Verf. eine direkte antiproliferative Wirkung des CsA auf die Zellen des Melanoms B16F10 feststellen, die «in vitro» kultiviert wurden.

### Résumé

Afin d'évaluer l'effet de la cyclosporine A sur le développement métastatique du mélanome B16F10 inoculé par voie intrasplénique, nous avons réalisé divers traitements

avec cet agent: a) à partir de l'inoculation tumorale et de façon quotidienne pendant tout le processus de dissémination métastatique (du 1<sup>er</sup> au 12<sup>ème</sup> jour); b) dans la phase initiale du processus (du 1<sup>er</sup> au 5<sup>ème</sup> jour), et c) dans la phase finale de celui-ci (du 7<sup>ème</sup> au 12<sup>ème</sup> jour). Le traitement pendant tout le processus et, particulièrement, pendant la phase initiale produit une augmentation de la colonisation hépatique attribuable à l'effet immunosuppresseur de l'agent. Le traitement pendant la phase finale eduit de façon significative le volume de métastase et augmente la survie moyenne des animaux. Sans exclure d'autres mécanismes possibles, nous trouvons un effet antiproliférant direct de la CsA sur les cellules du mélanome B16F10 cultivées «in vitro».

## Introducción

La ciclosporina A (CsA), como agente inmunosupresor, ha originado gran interés debido a la especificidad de su acción sobre el sistema T, mientras que no altera la capacidad antiinfecciosa del organismo <sup>1</sup> con la excepción de la reactivación del virus de Epstein Barr e infecciones virales <sup>2</sup>. Sin embargo, el entusiasmo despertado por este inmunosupresor ha sido posteriormente ensombrecido por el aparente elevado riesgo de aparición de neoplasias secundarias al tratamiento. Este riesgo parece mayor para los tumores que presentan una fuerte evidencia de etiología vírica <sup>3</sup>. Las neoplasias malignas más frecuentes son los cánceres de piel, en especial el carcinoma escamoso. Sin embargo, se describe un aumento progresivo en la aparición de melanomas malignos <sup>4</sup>.

En la actualidad se considera que el riesgo de neoplasias secundarias al tratamiento con CsA no es superior al de pacientes sometidos a inmunosupresión convencional <sup>5</sup>. Por otra parte, no existen evidencias de que la CsA sea directamente carcinogénica <sup>4, 1</sup>. Sin embargo, en estudios experimentales se ha evidenciado que la CsA produce un estímulo de la proliferación de los linfocitos B, hecho que justificaría el posible desarrollo de tumoraciones tipo B <sup>5</sup>. En otras experiencias sobre tumores experimentales, la CsA no produce efectos significativos sobre el desarrollo del tumor primario, mientras facilita el desarrollo de metástasis <sup>2</sup>. Finalmente, la inhibición específica del sistema T, mediante asociación de timectomía y administración de CsA, origina un retardo significativo del crecimiento y diseminación metastática de tumores singénicos <sup>6</sup>.

Nos proponemos, en este trabajo experimental, valorar el efecto de la administración de CsA a dosis inmunosupresoras sobre el desarrollo metastático del melanoma B16F10. Para ello utilizamos un reciente diseño experimental para la producción y cuantificación de metástasis hepáticas <sup>7</sup>. Adicionalmente, y con objeto de valorar la posible acción directa de la CsA sobre las células B16F10, estudiamos el efecto de dis-

tintas dosis de CsA sobre el crecimiento y la capacidad clonogénica *in vitro* de esta línea celular.

## Material y métodos

### Animales

Se han utilizado ratones isogénicos C57BL/6, hembras, de seis-ocho semanas de edad, proporcionados por los laboratorios IFFA-Credo (Francia). Alojados en número de 10 animales por jaula, han sido alimentados *ad libitum* y su peso ha sido periódicamente controlado.

### Células tumorales y condiciones de cultivo

Las células B16F10 nos han sido amablemente proporcionadas por la doctora Poupon (Villejuif, Francia). La línea ha sido mantenida en medio de cultivo compuesto por DMEM (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) complementado con penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 mcg/ml), a los que se añadió un 10 % de suero bovino fetal —SBF— (Carbiochem-Behring Corp., La Jolle, CA). Los cultivos celulares se mantuvieron en frascos de plástico, siendo incubados en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C y han sido periódicamente controlados para descartar la contaminación por micoplasma. Para su recolección, las células han sido despegadas con tripsina al 0,1 % (Lab. Difco, Detroit, MI) y EDTA 2mM (Merck Darmstadt, RFA). Las células han sido subcultivadas cada tres días durante un periodo no superior al mes, para evitar posibles modificaciones genéticas.

### Método para la producción de metástasis hepáticas

Los animales fueron anestesiados mediante inyección i.p. de pentobarbital sódico (30 mg/kg). Tras limpieza de la pared abdominal con alcohol yodado, se practica una incisión subcostal izquierda y se eviscera el bazo mediante tracción de su pedículo. En el polo inferior del mismo, se inoculan  $1 \times 10^5$  células viables B16F10. Se cierra la pared abdominal en un solo plano, con puntos sueltos de seda 2/0.

### Ciclosporina A

Proporcionada por los laboratorios Sandoz (Basiléia, Suiza), en forma de polvo, ha sido disuelta en aceite de oliva y administrada por vía s.c. a dosis de 80 mg/kg día <sup>2</sup>.

### Protocolos in vivo de tratamiento con ciclosporina

Para valorar el efecto de la CsA en el desarrollo de las metástasis hepáticas en ratones inculados con el melanoma B16F10 hemos tratado con CsA a tres grupos de 50 ratones en los siguientes días del desarrollo

neoplásico uno a cinco, siete a doce y uno a doce días tras la inyección de las células tumorales. Adicionalmente, un grupo control de 50 animales recibió un volumen equivalente de aceite, tras la inoculación tumoral.

Cada grupo de 50 animales fue subdividido en 20 y 30 animales. En el primer subgrupo se valoró el desarrollo metastásico; en el segundo, la curva de supervivencia.

#### *Valoración del desarrollo metastático en animales tratados y no tratados con ciclosporina*

Para valorar el efecto de la administración de CsA en los estadios inicial (micrometástasis) y final (máxima carga metastásica tolerada) del proceso de formación de metástasis hepáticas, y de acuerdo con experiencias previas<sup>4</sup>; cada grupo de 20 animales fue dividido en dos subgrupos de 10 animales, para ser sacrificados en los días siete y doce tras la inoculación tumoral. Tras su extracción, los hígados son pesados y congelados en nitrógeno líquido. El recuento del número y tamaño de los depósitos metastáticos, así como la elaboración de descriptores dinámicos sobre la eficacia de las células tumorales en la implantación, invasión y proliferación, se realizó con un método descrito recientemente<sup>7</sup>. Brevemente, cada hígado es cortado en un criostato, practicando cinco cortes de 10 micras de espesor, despreciando 500 micras entre cada corte. Las secciones son fijadas, teñidas con HE y examinadas en un microscopio de luz invertida, acoplado a una mesa digitalizadora DT 1.000 (Japón) conectada a un ordenador M-24 (Olivetti España), programado para el recuento del número y la superficie de las metástasis por unidad de superficie de la sección. Así, y de acuerdo con Weibel<sup>9</sup>, se determina la fracción del volumen de tejido metastático (FVTM), así como la densidad numérica de los focos metastáticos. La valoración de los datos en cada animal se realiza mediante la obtención de la media de los datos obtenidos en los cinco cortes seriados. La valoración de cada grupo de animales se realiza mediante la obtención de la media de los datos proporcionados por cada animal del grupo. A partir de estos datos estereológicos se obtienen los siguientes descriptores cuantitativos: 1) *Índice clonogénico hepático (ICH)* = media del número de micrometástasis el día séptimo/10mm<sup>3</sup> de tejido hepático. 2) *Tiempo de duplicación tumoral (TDT)* =  $\text{Ln } 2 \times \text{incremento de tiempo} / \text{Ln (FVTM duodécimo día - FVTM séptimo día) / FVTM séptimo día}$ . 3) *Desarrollo focal metastático (DFM)* =  $\text{FVTM duodécimo día - FVTM séptimo día} / \text{media número micrometástasis séptimo día}$ .

Adicionalmente se tomaron muestras de pulmones y ganglios linfáticos en los días siete y doce tras la inoculación. Las muestras se fijaron en formol y se tiñeron con hematoxilina eosina.

#### *Valoración in vitro de la sensibilidad de las células B16F10 a la ciclosporina*

Inmediatamente antes de su utilización se disolvió la CsA en dimetilsulfóxido (DMSO) 2 mg/ml y se diluyó en DMEM mediante agitación constante. Las concentraciones de CsA utilizadas son las aconsejadas por Wright y cols.<sup>10</sup>, y han sido 5, 2, 1, 0,1 y 0,01 mcg/ml. En los cultivos control se añadió una concentración equivalente de DMSO al medio de cultivo.

Para obtener la curva de crecimiento *in vitro* de las células B16F10 se suspenden éstas en DMEM complementado con SBF al 10% y se introducen en placas de 24 pozos (Nunc, Dinamarca) a una concentración de  $6 \times 10^3$  células viables por cm<sup>2</sup>. El efecto de la CsA se valoró diariamente por recuento del número de células viables por pozo en 12 pozos (seis de cada placa), mediante el test de exclusión de azul tripan. El tiempo de duplicación en la fase exponencial de la curva de crecimiento se calculó mediante la fórmula  $\text{TD} = \text{Ln } 2 \times \text{incremento de T} / \text{Ln} (\text{número células viables día tercero} / \text{número de células viables día primero})$ .

Para el estudio del efecto de la CsA sobre la actividad clonogénica del melanoma B16F10, se cultivaron 200 células por pozo de 8 cm<sup>2</sup> en placas de seis pozos (Nunc, Dinamarca). El medio de cultivo y concentraciones de CsA empleadas coinciden con los de la experiencia anterior. Seis u ocho días después de iniciar la prueba se lavan los cultivos, se fijan con metanol absoluto y se tiñen con azul de metileno. A continuación se determinó el número de colonias con más de 50 células. La sensibilidad relativa de las células tumorales a esta droga se estimó dividiendo el número de colonias formadas en presencia de CsA por el número medio de colonias en ausencia del agente. El resultado se expresa como porcentaje de colonias sobrevivientes. La posible relación entre el porcentaje de colonias y la dosis de CsA empleada se obtuvo mediante una regresión lineal en la que el porcentaje de colonias era la variable dependiente y el logaritmo de la dosis la independiente. A partir de esta ecuación se obtuvieron las dosis letales 50 y 90.

#### *Análisis estadístico*

La significación estadística de los datos en los días séptimo y duodécimo de la progresión neoplásica en animales tratados y no tratados con CsA, se determinó mediante el test de Student para los límites del 1 y 5%.

#### **Resultados**

##### *Producción experimental de metástasis hepáticas*

El séptimo día, tras la inoculación intraesplénica de células B16F10, se han desarrollado pequeños tumo-

res intraesplénicos de 3-4 mm en el 95 % de los animales, asimismo aparecen focos de micrometástasis hepáticas (fig. 1). El duodécimo día de evolución, el tumor esplénico ha incrementado notablemente (6-10 mm diámetro), apareciendo en el hígado lesiones confluentes que originan la ocupación de diversas áreas hepáticas (fig. 2). A pesar de que en los demás órga-

nos no se observan metástasis visibles, se demostró infiltración celular en el pulmón, manifiesta como metástasis ocultas o latentes, y demostradas por bioensayo de órgano (crecimiento en animales singénicos de un tumor local, subcutáneo, en el lugar de implantación de fragmentos de un órgano posiblemente afectado), así como por el desarrollo de una línea celular

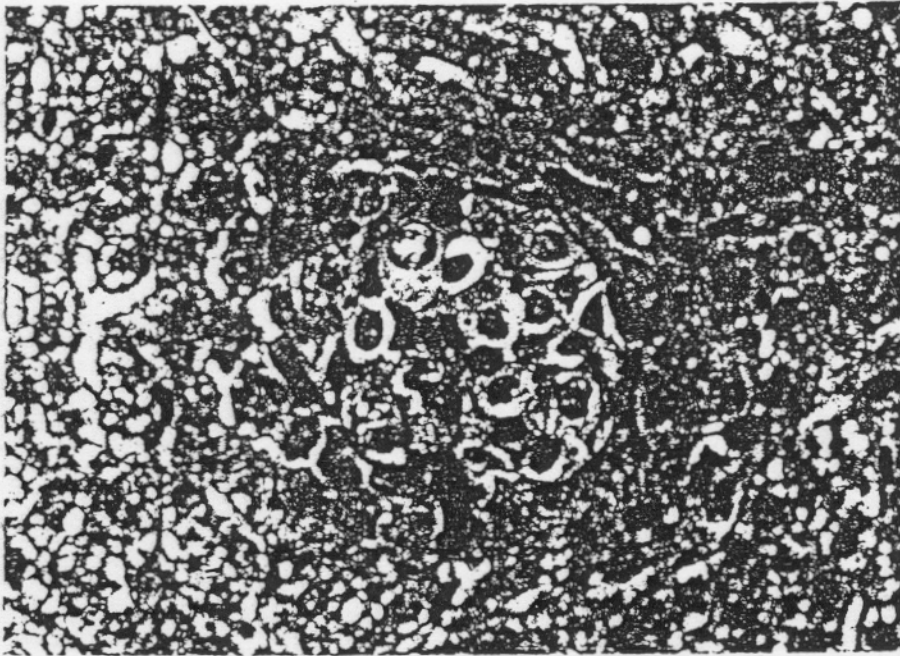


Fig. 1.—Micrometástasis hepática al séptimo día tras la inoculación tumoral.

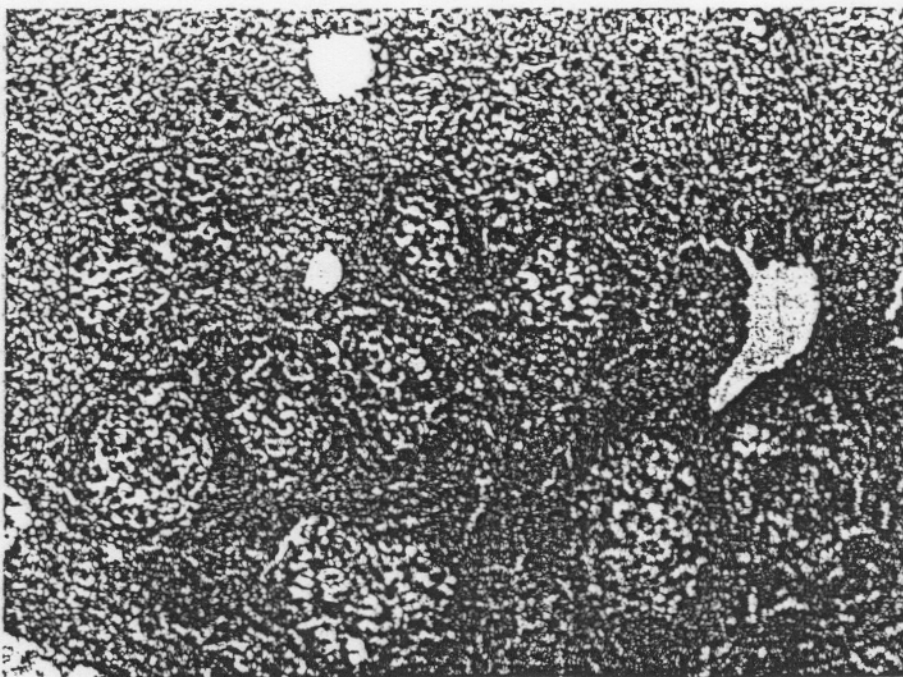


Fig. 2.—Focos metastáticos confluentes apreciables el duodécimo día de la evolución tumoral.

pulmonar, obtenida por explante y cultivo *in vitro* de pequeños fragmentos de parénquima pulmonar (Alonso y Barberá-Guillem, comunicación personal). Los animales fallecieron entre el noveno y decimoquinto día de evolución neoplásica. De acuerdo con lo anterior, las siguientes experiencias destinadas a valorar el desarrollo metastático en el hígado fueron diseñadas para obtener los datos en los días séptimo y duodécimo de desarrollo neoplásico, pues el séptimo día presenta la fase inicial de la diseminación y el duodécimo día el resultado del completo desarrollo neoplásico.

*Desarrollo de metástasis hepáticas en ratones C57BL/6 tratados y no tratados con CsA, tras la inoculación intraesplénica del melanoma B16F10*

Los resultados de esta experiencia se resumen en las figuras 3 y 4 (tablas I y II). Los animales tratados con CsA desde la inoculación tumoral muestran un número significativamente mayor de micrometástasis en séptimo día en comparación con los animales no tratados. Posteriormente, el duodécimo día los animales tratados mantienen un número de focos similar al del séptimo día, a pesar de que disminuye la des-

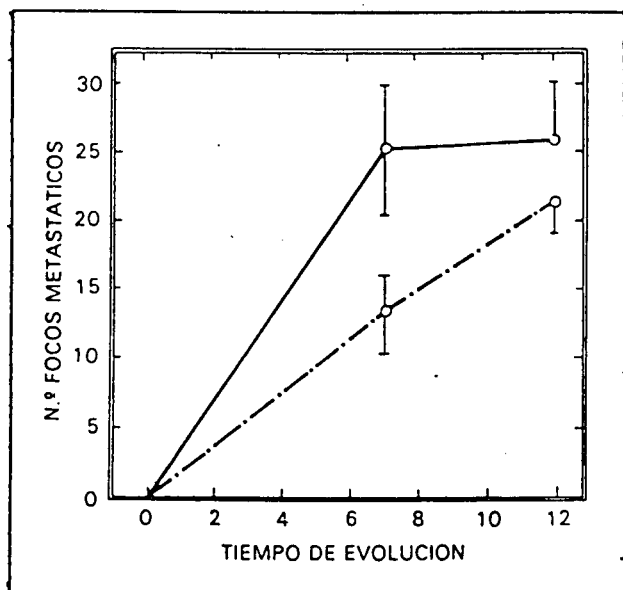


Fig. 3.—Número de focos metastáticos en los días séptimo y duodécimo de evolución tumoral.

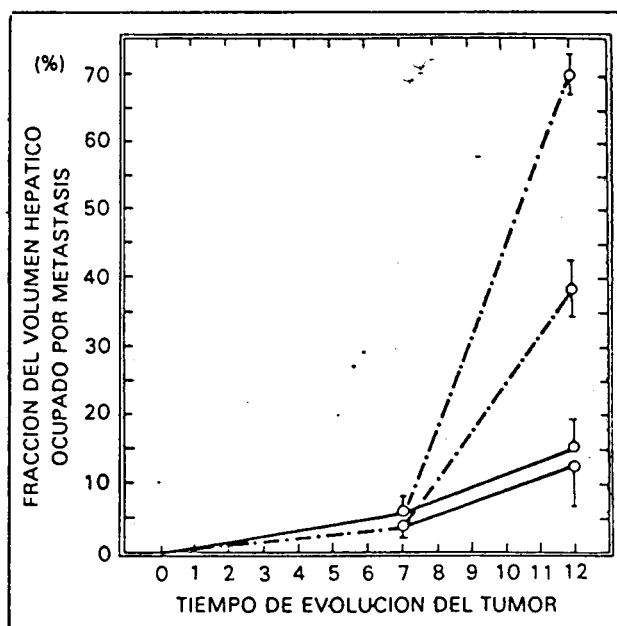


Fig. 4.—Ocupación tumoral del hígado según las distintas pautas de tratamiento con CyA.

Tabla I

Efecto de la CyA administrada desde el comienzo del proceso neoplásico

	Número de metástasis		Densidad de volúmenes de metástasis	
	Séptimo día*	Duodécimo día	Séptimo día	Duodécimo día*
Control .....	13,78 ± 6,78	22,04 ± 3,21	3,55 ± 2,16	38,80 ± 14,75
Tratados.....	25,95 ± 11,15	23,59 ± 10,05	5,96 ± 3,68	15,15 ± 9,84

\* Diferencia estadísticamente significativa entre los controles y los tratados ( $p < 0,01$ ).

Tabla II

Descriptorios dinámicos del proceso de invasión y metástasis en el hígado

	Índice clonogénico hepático	Tiempo de duplicación metástasis	Tasa de desarrollo focal
Control (sin tratamiento).....	0,12	1,44	2,55
Tratados desde los días 1 al 12.....	0,23	3,72	0,35
Tratados desde los días 1 al 5.....	0,23	1,41	2,56
Tratados desde los días 7 al 12.....	0,12	2,64	0,73

viación estándar. Sin embargo, en esta segunda fase los animales no tratados aumentaron significativamente el número de focos metastáticos, y a diferencia del grupo de animales tratados éstos eran grandes y confluentes.

A pesar de las diferencias en el número de focos presentes en el hígado el séptimo día entre los dos grupos de animales, en esta fase inicial no aparecieron grandes diferencias en el volumen ocupado por las lesiones metastáticas. Posteriormente, el duodécimo día aparecen claras diferencias en la ocupación hepática, y el volumen hepático ocupado por las metástasis fue en los animales no tratados 2,43 veces superior al que presentaron los animales tratados con CsA.

Con objeto de obtener una información más elaborada de la dinámica de la invasión hepática por las metástasis del melanoma B16F10, hemos aplicado tres descriptores histométricos elaborados a partir de la densidad numérica de los focos metastáticos y del volumen hepático que ocupan (tabla II). Así, la eficacia clonogénica (ICH) de las células tumorales en el tejido hepático fue casi el doble en los animales tratados con CsA, en relación con los animales no tratados; el tiempo de duplicación tumoral (TDT) del volumen tumoral total entre el séptimo y duodécimo día fue 5,32 veces superior en los animales tratados con CsA respecto a los no tratados; finalmente, la tasa de desarrollo de cada foco micrometastático (DFM) fue 7,43 veces superior en los animales no tratados que en los tratados con CsA. A pesar de estas amplias diferencias en la colonización hepática, no se aprecia un aumento en la supervivencia de los animales tratados. El tiempo de supervivencia medio fue de  $13,18 \pm 1,1$  días en el grupo control y de  $13,09 \pm 1,9$  días en los animales tratados con CsA (fig. 5).

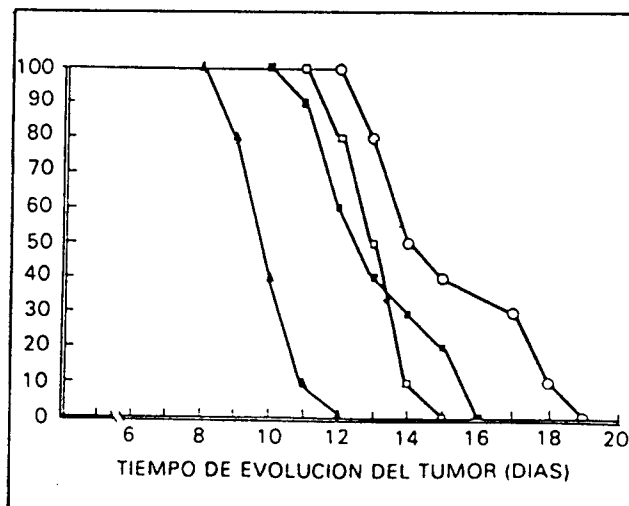


Fig. 5.— Tasas de supervivencia según los distintos tratamientos con CsA. (1) Tratados del primero al quinto día. (2) Animales control. (3) Tratados del primero al duodécimo día. (4) Tratados del séptimo al duodécimo día.

Además de este tratamiento continuo con CsA durante los días primero a duodécimo, y con objeto de influenciar separadamente las fases temprana y tardía del proceso, hemos realizado dos tratamientos en los días primero a quinto y séptimo a duodécimo. Los resultados de estas experiencias muestran una mayor diferencia entre los dos grupos, pues mientras los animales tratados en la fase inicial muestran un índice clonogénico (ICH) y un desarrollo focal (DFM) elevados, los animales tratados en la fase final muestran unos valores bajos de estos mismos índices (tabla II, fig. 4). Además, como se muestra en la figura 5, los animales tratados en la fase final presentan un incremento en la supervivencia media ( $15,18 \pm 2,4$ ) que contrasta con el acortamiento de la misma producida en los animales tratados en la primera fase ( $10,09 \pm 1,3$ ) en comparación con el grupo control ( $p < 0,01$ ). De hecho, en este último grupo la mortalidad se inició a partir del octavo día, y alcanzó el 70 % dos días después; mientras que en los animales tratados en la segunda fase la mortalidad no se inició hasta el duodécimo día, y no alcanzó el 70 % hasta el día decimoséptimo de evolución tumoral.

#### Efecto de la CsA sobre la proliferación *in vitro* de melanoma B16F10

En la tabla III y figura 6 se expresan los parámetros utilizados para valorar el crecimiento celular *in vitro*. El tiempo de duplicación de las células en cultivo muestra un progresivo enlentecimiento del crecimiento proporcional a la dosis de CsA empleada. A pesar de este enlentecimiento, no se han apreciado alteraciones importantes de la viabilidad celular con dosis menores de 2 mcg/ml. Sin embargo, a dosis de 5 mcg/ml se produjo una importante alteración de la viabilidad celular en las primeras veinticuatro horas de cultivo, apareciendo células picnóticas y vacuoladas.

Los resultados del ensayo de inhibición *in vitro* de colonias muestran una elevada capacidad de la CsA para inhibir la habilidad clonogénica de las células B16F10, pues a una concentración no tóxica de

Tabla III

Susceptibilidad *in vitro* del melanoma B-16 a distintas dosis de ciclosporina A

CyA microgr/ml	Tiempo de duplicación (días)	Inhibición de formación de colonias	
		Número medio de colonias	Porcentaje de supervivencia
—	$2,72 \pm 0,43$	$15,66 \pm 3,27^*$	100
0,1	$3,03 \pm 0,54^*$	$9,24 \pm 3,41^*$	59
1,0	$4,32 \pm 0,59^*$	$3,78 \pm 1,45^*$	23
2,0	$8,04 \pm 0,67^*$	$0,99 \pm 0,47^*$	5,9

Los resultados se expresan como valores medios  $\pm$  SD (10 cultivos por experiencia).  
\* Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ).

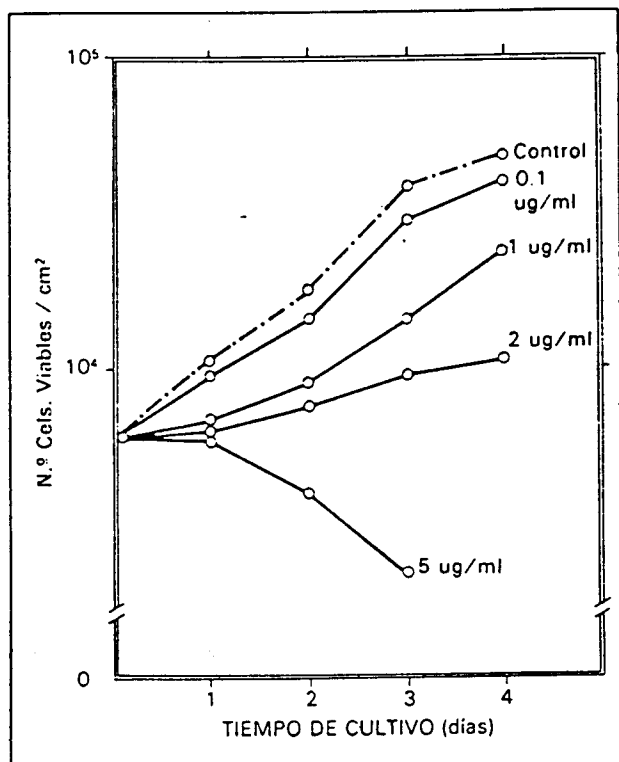


Fig. 6.—Curvas de crecimiento in vitro del melanoma B16F10 con dosis crecientes de ciclosporina A.

0,1 mcg/ml se observó una reducción del 41 % en la formación de colonias. El análisis de regresión lineal mostró una significativa relación dosis-respuesta. Este análisis permitió estimar las dosis de CsA inhibitoras del 50 y 90 % de las colonias tumorales (0,23 mcg/ml y 1,76 mcg/ml, respectivamente).

#### Discusión

Los métodos generalmente utilizados en la reproducción experimental del proceso metastásico valoran el desarrollo final del mismo mediante el recuento, generalmente bajo visión con lupa, de los focos localizados en la superficie de los órganos diana. Hemos utilizado un método recientemente descrito<sup>7</sup> para la evaluación cuantitativa de la eficacia metastásica de las células tumorales que posibilita obtener una información más elaborada sobre el comportamiento de las células tumorales. Este modelo divide el proceso de formación de metástasis en dos grandes fases: una inicial, que abarca hasta la aparición de micrometástasis y que incluiría fenómenos previos a la implantación celular como diseminación de las células a partir del tumor primario, detención capilar y extravasación<sup>11</sup>; y una fase final, que alcanza hasta el pleno desarrollo metastásico y que dependería de fenómenos

postextravasación como invasión, proliferación y neovascularización<sup>12</sup>. De acuerdo con este modelo se ha evidenciado cómo distintas subpoblaciones celulares de un mismo tumor, a pesar de mostrar un desarrollo metastásico final similar, muestran amplias diferencias en su comportamiento en cada una de las fases<sup>7</sup>.

De acuerdo con los conocimientos actuales sobre la diseminación metastásica, esta variable eficacia de las células en las diferentes fases del proceso podría ser explicada, en parte, por complejas interacciones célula tumoral-defensas del huésped<sup>13</sup>. En la actualidad existen numerosos datos que indican que el sistema inmunitario antitumoral puede ya sea facilitar, inhibir o no tener efecto sobre la formación de metástasis, dependiendo del estadio del proceso<sup>14</sup> y del específico fenotipo de la célula tumoral<sup>15, 16</sup>.

De acuerdo con resultados previos<sup>8</sup>, la administración de CsA a dosis inmunosupresoras produce una disminución importante de la respuesta inmune en la fase inicial del proceso, mientras que presenta efectos insignificantes sobre esta respuesta en la fase tardía del proceso, debido a la intensa depresión de la misma originada por el desarrollo tumoral. En nuestra experiencia, esta depresión de la respuesta inmunitaria antitumoral se acompaña de una mayor colonización hepática por las células tumorales, pues la densidad de micrometástasis el séptimo día es el doble en los animales tratados que en los animales control, como se refleja en los índices clonogénicos obtenidos de los dos grupos de animales. Resultados similares han sido descritos con diversos sarcomas inmunogénicos<sup>2</sup>, y están de acuerdo con experiencias previas que demuestran en diversos sistemas experimentales la elevada eficacia de las células inmunitarias del huésped en el control de las células diseminadas<sup>17, 18, 19, 20</sup>. Sin embargo, en nuestra experiencia, y en la fase tardía del proceso, la CsA demuestra un insospechado efecto antiproliferativo sobre los focos micrometastáticos ya establecidos. Esto queda reflejado en los descriptores cuantitativos de la colonización hepática. El tiempo de duplicación tumoral (TDT) del tejido metastásico en el hígado de los animales tratados con CsA fue 1,18 veces mayor que el presentado por los animales control, y el crecimiento medio de cada foco metastásico fue 7,28 veces mayor en los animales control que en los tratados con CsA. Este menor desarrollo de los focos metastásicos en los animales tratados con CsA podría ser explicado bien como una consecuencia de los efectos biológicos indirectos de la CsA sobre el tejido hepático o como un efecto antiproliferativo directo de la CsA sobre las células del melanoma B16F10. A pesar de que no podemos descartar efectos indirectos de la CsA sobre el tejido hepático<sup>21</sup>, que deberán ser estudiados, hemos realizado ensayos *in vitro* que demuestran una sensibilidad dosis dependiente de las células tumorales a la acción de la CsA, que varían entre la citostasis y citólisis.

### Conclusiones

1) El tratamiento con CsA a lo largo de todo el proceso neoplásico, y en particular en la fase inicial del mismo, produce un aumento de la implantación metastática en hígado del melanoma B16F10, que se acompaña de un acortamiento del tiempo de supervivencia. 2) Cuando el tratamiento con CsA se inicia una vez que ya han aparecido micrometástasis en el hígado, se observa una reducción importante en el volumen final de ocupación metastática y un alargamiento del tiempo de supervivencia. 3) La CsA presenta un efecto antiproliferativo directo sobre las células B16F10 cultivadas *in vitro*, siendo este efecto dosis dependiente.

### Bibliografía

1. WHITE, D. J.: «Cyclosporin A. Clinical pharmacology and therapeutic potential». *Drugs*, 24:322-334, 1982.
2. ECCLES, S. A.; HECKFORD, S. E., y ALEXANDER, P.: «Effect of cyclosporin A on the growth and spontaneous metastasis of syngeneic animal tumors». *Br. J. Cancer*, 42:252-259, 1980.
3. Lancet Editorial: *Cyclosporin and neoplasia*, 1083, 1983.
4. SHEIL, A. G. R.: «Cancer after transplantation». *World J. Surg.*, 10:389-396, 1986.
5. FIDELUS, R. K.; OROSZ, C., y FERGUSON, R. M.: «The effect of cyclosporine A on murine and human T and B cell tumor lines». *Transpl. Proceedings*, XV (3):1924-1926, 1983.
6. KIM, U.; SHIN, S. I., y COHEN, S. A.: *Selective suppression of T cell function in normal rat*. Proceedings of 4th Int. Workshop on immune deficient animals in experimental research, 1983.
7. BARBERA-GUILLEM, E., y VIDALANACLOCHA, F.: *Dynamic evaluation of differential metastatic behaviour of several LLC cells lines*. Pendiente de publicación, 1986.
8. LÓPEZ DE TEJADA, I.: *Efectos de la ciclosporina A sobre la respuesta inmunitaria antitumoral y el desarrollo metastático en ratones portadores del melanoma B16*. Tesis doctoral. Servicio Editorial Univ. P. Vasco, 1986.
9. WEIBEL, E. R.: *Stereological method Vol 1. Practical methods for biological morphometry*. Acad. Press, Inc. Nueva York, 1979.
10. WRIGHT, B.; GREIG, R., y POSTE, G.: «Inhibition of macrophage activation and tumor cell cytotoxicity by cyclosporin A». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123:710-715, 1984.
11. POSTE, G., y FIDLER, I. J.: «The pathogenesis of cancer metastasis». *Nature (Lond.)*, 283:139-146, 1980.
12. NICOLSON, G. L., y POSTE, G.: «Tumor implantation and invasion at metastatic sites» *Int. Rev. Exp. Patol.*, 25:77-181, 1983.
13. WOODRUFF, M.: «Interaction of cancer and host». *Br. J. Cancer*, 46:313-322, 1982.
14. FIDLER, I. J.; GERSTEN, D. M., y BUDEMEN, M. B.: «Characterization of tumor cells selected for resistance to syngeneic lymphocyte-mediated cytotoxicity». *Cancer Res.*, 36:3160-3165, 1979.
15. FIDLER, I. J., y NICOLSON, G. L.: «Immunobiology of experimental metastatic melanoma». *Cancer Biol. Rev.*, 2:171-234, 1983.
16. FIDLER, I. J.: «Therapy of spontaneous metastases by intravenous injection of liposome containing lymphokines». *Science*, 208:1469-1470, 1980.
17. ALEXANDER, P., y ECCLES, S. A.: «Host mediated mechanisms in the elimination of circulating cancer cells». En: G. L. Nicolson y L. Milas (eds.): *Cancer invasion and metastasis biological and therapeutic aspects*. Raven Press, Nueva York., 1984, pp. 293-308.
18. FROST, P., y KERBEL, R. S.: «Immunobiology of metastasis. Can the immune response cope with disseminated tumor?». *Cancer Metast. Rev.*, 2:239-256, 1983.
19. GORELIC, E.; WISTROUT, R. H.; OKUMURA, K.; HABU, S., y HERBERMAN, R. B.: «Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice». *Int. J. Cancer*, 30:107-112, 1982.
20. HANNA, N., y FIDLER, I. J.: «Role of Natural Killer cells in the destruction of circulating tumor emboli». *J. Natl. Cancer Inst.*, 65:801-809, 1980.
21. BLAIR, J. T.; THOMSON, A. W.; WHITING, P. H.; DAVIDSON, R. J., y SIMPSON, J. G.: «Toxicity of the immune suppressant cyclosporin A in the rats». *J. Pathol.*, 138:163-168, 1982.