



Fundación  
Oncohematología  
Infantil

## PROYECTO ASOCIACIÓN PABLO UGARTE

# POTENCIANDO LAS INMUNOTERAPIAS EN SARCOMAS PEDIÁTRICOS

Investigador principal: Dr. Javier García Castro  
Unidad de Biotecnología Celular  
Instituto de Salud Carlos III





Los tumores metastásicos y refractarios a quimioterapia son prácticamente incurables, por lo que se necesitan nuevos métodos de tratamiento para este problema médico. En la edad pediátrica, este problema afecta a un porcentaje importante de niños con tumores sólidos, cuyos índices de curación cuando la enfermedad es metastásica son bajos, y prácticamente nulos en situación de refractariedad. El neuroblastoma es el ejemplo más característico, pues se trata del tumor sólido extracraneal más frecuente, y en casi la mitad de los niños la enfermedad ya se encuentra diseminada en el momento del diagnóstico (1). En adultos, cuando el tumor es metastásico, la probabilidad de curación es también muy baja, con la excepción de algunas neoplasias hematológicas y los tumores germinales (2). Es cierto que en las últimas dos décadas ha habido un avance notable en el descubrimiento de nuevos fármacos, algunos con un impacto favorable sobre la supervivencia de los pacientes. Pero, a pesar del incremento en cantidad y en calidad del arsenal terapéutico contra el cáncer, los pacientes con tumores metastásicos mayoritariamente acaban siendo refractarios a las terapéuticas disponibles y fallecen por el cáncer.

#### *Sarcomas pediátricos*

Los sarcomas pediátricos son un grupo heterogéneo de tumores malignos del hueso y tejidos blandos. Aunque se han descrito más de 100 subtipos histológicos diferentes, la mayoría de los casos pediátricos pertenecen a la familia de tumores de Ewing, rhabdomyosarcomas y osteosarcomas. La mayoría de los pacientes con un tumor localizado son curables con los tratamientos de cirugía y/o quimioterapia actuales. Sin embargo, como se ha comentado, aquellos con enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico o aquellos que experimentan una recaída presentan un mal pronóstico.

#### *Nuevo enfoque terapéutico: activando el sistema inmune*

La infiltración de los tumores por leucocitos fue observada por primera vez por Rudolf Virchow en el año 1.800, señalando la íntima relación entre el sistema inmune y el cáncer (3). También se ha demostrado, en distintos tipos de tumores, una correlación entre el grado de infiltración tumoral por células inmunes y el pronóstico de la enfermedad (4). Los tumores surgen cuando falla la vigilancia del sistema inmune y este fallo se puede originar por la selección de clones tumorales que evitan el reconocimiento por parte del sistema inmune (5) y/o la inducción de



Fundación  
Oncohematología  
Infantil

mecanismos inmunosupresores, impulsada por la secreción de citoquinas específicas, moléculas inhibitorias (p.ej. CTLA-4, PD1-PDL1...) y la acumulación intratumoral de células inmunomoduladoras, incluyendo células T reguladoras, células supresoras de origen mieloide y macrófagos tipo M2 (6). Basados en esta hipótesis, se están desarrollando nuevos tratamientos de inmunoterapia centrados en la conversión inmunogénica del microambiente tumoral (3, 7), incluyendo la utilización de los virus oncolíticos, cuya actividad terapéutica parece estar apoyado por una adecuada activación del sistema inmune (8) tanto de las respuestas inmunes adaptativa e innata (9). Es de destacar que la Asociación Pablo Ugarte ya financia 3 proyectos de diversas estrategias de utilización de virus oncolíticos, por lo que se podrían generar sinergias con el presente proyecto.

Diversas estrategias de inmunoterapias se han utilizado para el tratamiento de sarcomas pediátricos: interferón, interleuquina-2 (IL2), interleuquina-15 (IL-15) y el liposomal-muramil tripéptido fosfatidil-etanolamina (L-MTP), además de ciertas vacunas y anticuerpos monoclonales contra ciertos antígenos tales como disialogangliósido GD2. Actualmente se están probando anticuerpos frente a proteínas inmunosupresoras como CTLA-4 y PD-1 en los sarcomas pediátricos (10). Con estos tratamientos se consiguieron dos remisiones completas en cuatro pacientes con osteosarcoma que recibieron tratamientos con IL-2. Las dosis altas de IL-2 parecían más eficaces pero la toxicidad del tratamiento impide elevar las dosis de IL-2 (11). Aunque los resultados han sido modestos, estos resultados parciales hacen pensar que los tratamientos de inmunoterapia pudieran ser exitosos en los sarcomas pediátricos, si se consigue potenciarlos, como propone este proyecto.

Es conocido que los tumores pediátricos poseen una menor tasa de mutaciones que los tumores de adultos, y en especial los carcinomas, aproximadamente <1 mutación por Mb para los cánceres pediátricos en comparación con el 15 por Mb para los melanomas (10). Sin embargo muchos de los sarcomas pediátricos poseen translocaciones cromosómicas que generar neoantígenos que, en teoría, serían una diana ideal para las inmunoterapias puesto que expresan proteínas que no se encuentran de manera natural en el organismo (12). Aunque hasta la fecha no se ha conseguido una potente activación del sistema inmune contra estas traslocaciones, la entrada de nuevos tratamientos de inmunoterapia puede empezar a cambiar este panorama. También es de destacar que la Asociación Pablo Ugarte financia la búsqueda



Fundación  
Oncohematología  
Infantil

de nuevos genes de fusión en sarcomas de Ewing y otros sarcomas, por lo que se podrían generar sinergias con el presente proyecto.

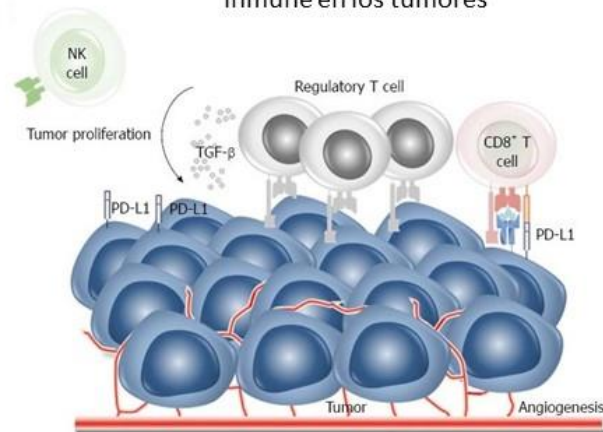
A pesar de estos datos controvertidos de la literatura nuestro grupo posee datos propios que nos hacen pensar en la validez de las inmunoterapias de sarcomas. Hemos realizado un estudio en perros con sarcomas espontáneos, tratados en un hospital veterinario. En dichos animales refractarios a los tratamientos convencionales, hemos realizado un estudio compasivo con nuestra inmunoterapia CELYVIR. CELYVIR consiste en la administración de células madre mesenquimales infectadas con un adenovirus oncolítico. Este tratamiento de inmunoterapia obtuvo un 80% de respuestas clínicas, incluyendo un 25% de remisiones completas, con curaciones a largo plazo. Y todo ello manteniendo un muy alto nivel de seguridad, sin apenas efectos secundarios.

#### *Potenciando las inmunoterapias en sarcomas.*

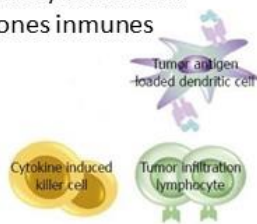
Hasta la fecha, la mayoría de los estudios que utilizan modalidades de inmunoterapia individuales han demostrado una actividad significativa en un porcentaje de tumores sólidos en adultos y limitado en los sarcomas pediátricos. Se piensa que esta limitación es debida en parte a los múltiples mecanismos inhibitorios que poseen los tumores. Es por ello que nuestra hipótesis parte de la combinación de diversos tratamientos para potenciar la activación del sistema inmune (ver figura). Además, estudios clínicos iniciales con combinaciones de nuevas inmunoterapias con otros tratamientos parecen prometedores. Así por ejemplo, la utilización de anticuerpos monoclonales anti-GD2 combinados con GM-CSF o GM-CSF e IL-2 es eficaz contra el neuroblastoma (13).



Inhibición de la activación  
inmune en los tumores



Reclutamiento/infiltración  
poblaciones inmunes



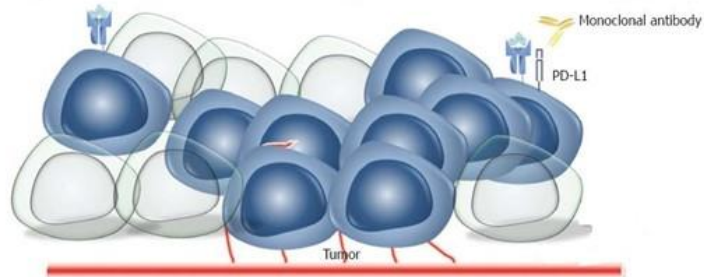
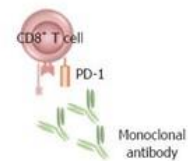
Virus oncolíticos



TILs / T-CAR



Bloqueo de inhibidores



Los pasos a seguir para **potenciar la respuesta inmune en sarcomas pediátricos** consistirían en:

- Aumentar la infiltración tumoral por poblaciones inmunes antitumorales.
- Generar un status inflamatorio en el tumor.
- Bloquear los inhibidores de la activación linfocitaria



**Infiltración:** Los sarcomas son tumores poco infiltrados, y se ha visto que los linfocitos CD8+ presentes en los tumores en muchas ocasiones son disfuncionales (14), por lo que un requisito básico inicial consistiría en incrementar el reclutamiento de nuevas poblaciones leucocitarias. A este respecto, nuestro grupo en colaboraciones con el grupo del Dr. Manuel Ramírez del Hospital Niño Jesús (Madrid) posee datos preliminares en los que modificando las dosis y pautas de administración de ciertos fármacos ya comercializados se consigue aumentar significativamente el infiltrado linfocitario en tumores pediátricos.

**Inflamación:** Por otro lado, sería deseable generar un ambiente inflamatorio en el tumor, que compensase los mecanismos celulares inhibitorios, polarizando las células del sistema inmune innato y adaptativo a un fenotipo antitumoral: monocitos tipo M1 o neutrófilos N1, linfocitos Th1..... Este paso se podría conseguir con las estrategias de inoculación de virus oncolíticos y/o linfocitos modificados genéticamente (T-CAR). A este respecto, nuestros propios resultados (15, 16) y los de otros grupos (17) en la utilización de virus oncolíticos en sarcomas ha demostrado su gran seguridad, falta de efectos secundarios graves y respuestas clínicas prometedoras, incluyendo remisiones completas.

**Bloqueo de inhibidores:** el bloqueo de los inhibidores de la respuesta inmune linfocitaria como la utilización de anticuerpos anti CTLA-4, PD1 o PDL1 está generando buenos resultados en el tratamiento de tumores de adultos y en la actualidad se están ensayando en tumores pediátricos (10). Sin embargo los graves efectos secundarios de estos tratamientos hacen que las dosis utilizadas sean menores de las óptimas para eliminar completamente la inmunosupresión tumoral. Es por ello que combinando varios tratamientos, como proponemos aquí, es previsible que se obtengan mejores resultados. En nuestros estudios utilizaremos principalmente anticuerpos anti-PD1.



Fundación  
Oncohematología  
Infantil

## COROLARIO

Nuestro grupo estudiará, en modelos murinos ya desarrollados de sarcomas pediátricos, la **hipótesis** propuesta: esto es, estudiar la combinación de las estrategias descritas previamente: reclutamiento + inflamación + bloqueo de inhibidores, para potenciar la respuesta inmune antitumoral.

Puesto que los tratamientos a combinar son fármacos aprobados o bien se encuentran en diversas fases clínicas, nuestro **objetivo** a medio plazo es poder llevar la mejor combinación obtenida en esta fase preclínica hasta un ensayo clínico fase I, para lo que contamos con la total colaboración de la Unidad de Oncohematología Pediátrica del Hospital del Niño Jesús, con quienes llevamos más de 20 años trabajando en múltiples líneas de investigación.

## METODOLOGÍA

**Líneas tumorales:** disponemos de líneas tumorales de sarcomas pediátricos, en las que hemos desarrollado el modelo *in vivo*. Así, como tumores óseos disponemos de la línea K5, singénica en ratones FVB. En el laboratorio hemos generado una línea de células progenitoras mesenquimales con delección en los genes p53 y/o Rb. Estas células generan leiomiomas u osteosarcomas en función del microambiente tisular en el que se implanten. Adicionalmente, disponemos de líneas murinas de liposarcomas ya que colaboradores de nuestro grupo han desarrollado modelos de liposarcomas basados en las mismas células progenitoras mesenquimales con delección en p53 que sobreexpresa el gen de fusión FUS-CHOP. Además, disponemos de un modelo de neuroblastoma murino Neuro-2a singénico en ratón A/J. Tradicionalmente ha sido difícil realizar modelos *in vivo* de sarcomas pediátricos por la falta de líneas murinas de estos tumores. Aparte de las líneas mencionadas, existen ratones transgénicos que generan diferentes tipos de sarcomas (18), por lo que se estudiará solicitar dichos ratones, o líneas tumorales generadas a partir de ellos, para ampliar los tipos de sarcomas pediátricos a estudiar.

**Modelos murinos:** Para realizar los ensayos de tumorigénesis *in vivo* se emplearán ratones C57Bl6, A/J, FVB y Balb-C (en función de la línea tumoral singénica), mantenidos en cabinas aislantes, libres de patógenos y con acceso a comida y agua *ad libitum*. Para los implantes de tumores óseos, en forma ectópica, las células se depositan en un tubo de 50 ml con 0,1g de gránulos de cerámica bifásica de fosfato de calcio (MBCP, Biomatlante). Se realiza un lavado con 1 ml de DMEM completo y se añaden entre  $10^5$ - $5 \times 10^6$  células en suspensión. Se realiza una centrifugación (1500 rpm, 5min) y se coloca el tubo en condiciones de cultivo durante 2 días permitiendo la aireación. Se retira el medio y se añaden 100µL de DMEM completo y 22µl de trombina (Sigma-Aldrich) disuelta en  $\text{CaCl}_2$  0,25mM. Posteriormente se añaden 33 µl de fibrinógeno y se realiza una incubación de 2 horas en condiciones de cultivo celular. El explante se implantará subcutáneamente. A la finalización del experimento, en todos los casos se extraerán los tumores y los órganos apropiados para análisis posterior.

En el caso de tratamientos combinados con CELYVIR, utilizaremos el adenovirus oncolítico humano ICOVIR5 y la línea celular murina semipermissiva CMT64RGD en nuestro modelo con





ratones inmunocompetentes C57BL/6. Un millón de células CMT64RGD se inocularán subcutáneamente en ratones hembra C57BL/6. Una vez se establezcan los tumores los ratones se tratarán intraperitonealmente con CPMS murinas infectadas, a partir de los quince días post-inoculación. Esta terapia se realizará semanalmente, acorde a los resultados previos obtenidos con este modelo. Durante el tratamiento se medirá el volumen tumoral diariamente y semanalmente se obtendrá sangre periférica para el estudio de subpoblaciones leucocitarias. Finalmente, los animales serán sacrificados en el punto final y los órganos y tumores se extraerán para su análisis posterior.

**Análisis de subpoblaciones de células inmunes:** se estudiarán las subpoblaciones de células inmunes en los tumores de los ratones y perros (en biopsias pre- y post-tratamiento) tratados con las combinaciones propuestas, utilizando citometría de flujo y técnicas de inmunohistoquímica. Estudiaremos la cantidad y el estado de activación de los linfocitos B (B220+) , linfocitos T helper (CD3+ CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD3+ CD8+), linfocitos T reguladores (CD3+ CD4+ FoxP3+), células mieloides supresoras (CD45+ CD11b+ Gr1+), células NK (CD3- CD56+), células dendríticas (CD11c+), macrófagos (F4/80+ CD11b+), neutrófilos (Gr1+) y eosinófilos (CD193+). En la mayoría de los casos utilizaremos marcadores indicativos de actividad, anergia, etc....

**Citometría de flujo y Cell Sorting:** Para la caracterización inmunofenotípica de las diferentes poblaciones celulares será utilizado un citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec). Tras una selección primaria basada en el tamaño y la complejidad celular para excluir partículas contaminantes, se capturarán los datos de fluorescencia de cada célula teñida con los anticuerpos adecuadamente conjugados para cada uno de los canales de emisión, almacenando la información de un mínimo de 10.000 eventos. Los resultados obtenidos serán analizados mediante el software avanzado FlowJo™ (Tree Star Software). Cuando se requiera el aislamiento por Cell Sorting para su posterior cultivo de una población previamente caracterizada, utilizaremos un separador celular FacsAria™ (BD Biosciences).

**Separación inmunomagnética:** se utilizará un sistema MACS™ (Miltenyi Biotec) de inmunoselección magnética. En este caso, serán utilizados anticuerpos monoclonales conjugados con una partícula superparamagnética de unos 50nm de diámetro. La matriz de dichas partículas es biodegradable, con lo que no se hace necesaria su eliminación tras el proceso de selección

ya que no interfieren con experimentos subsecuentes. Si no existiese el anticuerpo marcado directamente con las partículas se puede utilizar un anticuerpo secundario que reconozca el anticuerpo primario o el fluorocromo al que se halle conjugado.

**Análisis histológico de tumores:** El procesamiento de las muestras para su estudio histopatológico se realizará siguiendo los procedimientos que ya tenemos estandarizados. En los modelos de tumores óseos, donde utilizaremos implantes cerámicos se realizará un estudio no destructivo de las muestras mediante rayos X con el equipo IVIS que disponemos, que captura de imágenes de bioluminiscencia, fluorescencia e imágenes de rayos X. Posteriormente se descalcificarán las muestras con ácido fórmico al 4% y ácido clorhídrico al 4% (3 inmersiones de 24 horas) y se procesarán para su inclusión en parafina. En todos los casos se realizarán las tinciones de hematoxilina /eosina y tricrómico de Masson. En el resto de órganos y tumores no óseos se realizarán cortes histológicos de los mismos fijados en formaldehído 10% en PBS e incluidos en parafina (estación Leia EG 11504). Las secciones de tejido se realizarán de 5  $\mu$ m de grosor con un microtomo semiautomático (Leica RM2255) y se procederá tanto a su tinción convencional con H&E para estudiar la arquitectura y morfología tisular, así como a su procesamiento para técnicas inmunohistoquímicas específicas (procesador automático Leica iP1020). En este caso se utilizarán los anticuerpos primarios específicos para la caracterización y progresión tumoral. Los anticuerpos secundarios empleados van conjugados con biotina o fluorocromos (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Las inmunohistoquímicas en las que la detección del anticuerpo primario se realice mediante el sistema avidina-estreptavidina/peroxidasa, se utilizará el kit ABC (Avidin-Biotin Complex) Vectastain Elite (Vector Laboratories) y para localizar los anticuerpos emplearemos DAB (Vector Laboratories) como sustrato cromogénico para la peroxidasa. La intensidad de tinción se controla bajo un microscopio óptico (Eclipse 50i, Nikon). Finalmente se realizará una contratinción de los núcleos celulares con hematoxilina suave. La captura de imágenes se realizará con una cámara digital (DS-Fi1, Nikon) y un programa de análisis de datos (NIS Elements Software, Nikon).

**Ensayos de transferencia adoptiva:** como se describe anteriormente se generarán tumores y se realizará el tratamiento con CELYVIR. Los animales serán sacrificados en momentos específicos y se obtendrán las células nucleares de la sangre periférica y los esplenocitos. A continuación se aislarán diversas subpoblaciones inmunológicas utilizando la técnica

inmunomagnética MACS (Miltenyi Biotech) con anticuerpos monoclonales conjugados con partículas superparamagnéticas. Las poblaciones purificadas se infundirán en ratones portadores de nuevos tumores CMT64RGD, estudiando en estos ratones si se ha conferido una actividad antitumoral por la inoculación de cada subtipo específico de población inmune. Al igual que en el modelo original el tamaño del tumor se medirá diariamente y se realizarán análisis de sangre periférica. Los animales serán sacrificados en el punto final y los tumores se extraerán para su análisis. Los estudios patológicos y de citometría de flujo deberían confirmar la presencia de células inmunes infiltrando los tumores. Se harán estudios histológicos, inmunohistoquímicos y de biología molecular para analizar la potencial activación de las células inmunes infiltradas, como hemos descrito.

**Análisis de expresión génica:** los análisis globales del perfil de expresión génica se llevarán a cabo mediante RNAseq en 3 réplicas biológicas por cada grupo experimental. Brevemente, el RNA será extraído mediante TriReagent (Sigma) seguido de purificación por columnas (Qiagen). Para la fabricación de la librería se utilizará el kit TruSeq stranded total RNA RiboZero (Illumina) que permite el análisis de RNAs codificantes y algunos tipos de RNAs no codificantes. Las librerías se secuenciarán en un equipo NextSeq 500 de Illumina (8-9 transcriptomas por carrera en el modo High output). Las secuencias se alinearán al transcriptoma de referencia (UCSC hg38) con TopHat y las diferencias de expresión entre los diferentes grupos experimentales se determinarán mediante Cufflinks/Cuffdiff. Una vez determinados y seleccionados los genes diferencialmente expresados en función de las diferencias de expresión y su relevancia procederemos a su validación experimental en los mismos modelos celulares mediante RT-qPCR, western-blot o ELISAs.

**Obtención y caracterización de CPMs murinas y caninas:** para los experimentos de combinación con CELYVIR, se obtendrán células progenitoras mesenquimales caninas y murinas de tejido adiposo de animales donadores sanos. El tejido adiposo se digerirá con colagenasa durante 2 horas a 37°C. Tras la filtración y lavado las células de la fracción vascular se sembrarán y se cultivarán en medios comerciales específicos para el cultivo de MSC murinas (MesenCult + murine MSCsupplements de Stem Cell Technologies) o DMEM+10%FBs en el caso de las CPMs caninas. Las células se mantendrán a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y saturada de humedad. A partir del tercer pase se suele obtener una población homogénea de



CPMs, que se caracterizarán por su morfología fibroblástica definida, un fenotipo determinado (CPMs murinas: negativas para los antígenos CD34, CD14, CD11b y CD45 y positivas para Sca1, CD44 y CD29; CPMs caninas: negativas para los antígenos CD34, CD11b y CD45 y positivas para CD90, CD44 y CD29) y una marcada capacidad de diferenciación hacia tejidos de línea mesenquimal utilizando medios específicos.

**Tratamientos clínicos en el hospital veterinario:** previamente ya se obtuvo la aprobación del Comité de Ética en Investigación Animal del Hospital Veterinario de la Universidad Alfonso X (UAX) para este tipo de tratamiento, en pacientes caninos oncológicos desahuciados, y previa autorización con consentimiento informado del dueño del perro. Para el tratamiento se infectarán ex vivo las CPM con los adenovirus ICOCAV y serán inoculadas de forma intravenosa en los perros, solos o en combinación con los tratamientos pertinentes,

Los pacientes veterinarios del estudio se seleccionarán con los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Pacientes caninos diagnosticados de cáncer, sin respuesta a tratamientos previos.
- 2) Ausencia de enfermedades intercurrentes.
- 3) Buen estado general, determinado por su estado clínico, los resultados de analítica sanguínea, urianálisis y pruebas de diagnóstico por imagen.
- 4) Carácter dócil, manejables sin sedación química.

Los pacientes candidatos al ensayo terapéutico serán atendidos en la consulta de Oncología del Hospital Veterinario de la UAX. La metodología del estudio comprende:

- 1) Diagnóstico del tipo y extensión de la neoplasia: se determinará el tipo de tumor mediante estudios histológicos o citológicos y se realizará el estadiaje del tumor (clasificación TNM) en función de los resultados de la exploración física y de los estudios complementarios por imagen pertinentes (radiografía, ecografía, tomografía computerizada y/o resonancia magnética).
- 2) Estudio de sangre periférica: hematología y bioquímica básica, perfil de subpoblaciones linfocitarias y título de anticuerpos antiadenovirus canino. Biopsia tumoral (si la localización tumoral lo permite) y estudio completo anatopatológico incluyendo análisis de inmunohitoquímica de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y presencia de cápsides adenovirales.
- 3) Inoculación de un preparado de CPMs infectadas con ICOCAV. La preparación del inoculado se realizará en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología Celular (Instituto de Salud Carlos III). La inoculación a los pacientes se realizará en el HV-UAX. Se procederá a la administración



intravenosa (vena cefálica, safena o yugular) con un catéter intravenoso, utilizando un equipo de transfusión sanguínea con un filtro estándar antiagregados (de 200  $\mu\text{m}$ ), durante 15 minutos. Durante la administración se monitorizará la temperatura y frecuencia cardiaca/respiratoria del

paciente cada 5 minutos

4) Monitorización del paciente post-administración: después de la administración, el paciente será sometido a vigilancia en el área de hospitalización durante un mínimo de 4 horas, con controles específicos de temperatura y constantes vitales cada hora. Durante la hospitalización se obtendrán muestras de orina y saliva para determinar la presencia de partículas virales (en los estudios de toxicidad realizados por otros equipos investigadores se ha demostrado que los pacientes tratados no mostraron evidencias de eliminación vírica).

5) El procedimiento descrito se repetirá (si las condiciones clínicas del paciente lo permiten) cada 15 días hasta un total de 4 ciclos.

6) Al final del tratamiento, se procederá a un estudio de eficacia realizando un estadiaje tumoral (clasificación TNM, basada en los datos de la exploración física y los estudios por imagen pertinentes) para determinar el tipo de respuesta, definida como respuesta completa (desaparición de todo signo de tumor), respuesta parcial (disminución del volumen tumoral en más de un 50%), enfermedad estable (disminución del volumen tumoral menor del 50% sin aparición de nuevas lesiones) o enfermedad progresiva (crecimiento del volumen tumoral o aparición de nuevas lesiones). También se repetirá la biopsia tumoral con el estudio completo anato-patológico incluyendo análisis inmunohistoquímica de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y presencia de cápsides adenovirales.

7) En caso de fallecimiento del paciente durante el protocolo terapéutico o al finalizar el mismo, se realizará una necropsia completa y sistemática.



## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Maris JM. N Engl J Med. 2010; 362:2202.
2. Edwards BK et al. Cancer. 2014;120(9):1290-314.
3. van den Boorn JG et al. Immunity. 2013;39(1):27-37.
4. Zitvogel L, et al. Immunity. 2013;39(1):74-88.
5. Matsushita H, et al. Nature. 2012;482(7385):400-4.
6. Coussens LM, et al. Science. 2013;339(6117):286-91
7. Motz GT, and Coukos G. Immunity. 2013; 39(1):61-73.
8. Naik JD et al. Clin Cancer Res. 2011;17(13):4214-24
9. Russell SJ et al. Nat Biotechnol. 2012;30(7):658-70.
10. Roberts SS, et al. Front Oncol. 2015 Aug 7;5:181.
11. Schwinger W, et al. Ann Oncol (2005) 16(7):1199–206.
12. Sankar S, et al. Cancer Genet. 2011 Jul;204(7):351-65
13. Yu AL, et al. N Engl J Med (2010) 363(14):1324–34.
14. Schietinger A, et al. Immunity. 2016 Aug 16;45(2):389-401.
15. García-Castro J, et al. Cancer Gene Ther. 2010 Jul;17(7):476-83
16. Melen GJ, et al. Cancer Lett. 2016 Feb 28;371(2):161-70.
17. Lettieri CK, et al. Expert Rev Anticancer Ther. 2012 Feb;12(2):229-4
18. Dodd RD, et al. Dis Model Mech. 2010 Sep-Oct;3(9-10):557-66