



FACULTAD DE BIOLOGÍA



Center for Research
in Molecular Medicine and
Chronic Diseases



ENSAYOS DE TOXICIDAD DE NANOCÁPSULAS CARGADAS CON FÁRMACOS INMUNOESTIMULANTES EN *Danio rerio*

Juan Manuel Fernández Rey
Curso 2019-2020

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	2
1. CÁNCER: INMUNOSUPRESIÓN Y TAMs	2
2. RE-EDUCACIÓN DE TAMs MEDIANTE ACTIVADORES DE TLRs	4
3. VENTAJAS DE LA NANOMEDICINA.....	5
4. PEZ CEBRA EN ESTUDIOS CON NANOMATERIALES Y XENOGRAFT	5
OBJETIVO	7
MATERIALES Y MÉTODOS	7
1. MANTENIMIENTO DEL PEZ CEBRA	7
2. ELABORACIÓN DE LAS NANOCÁPSULAS.....	7
3. DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS DE TOXICIDAD	8
3.1 MATERIALES.....	8
3.2 PRIMER EXPERIMENTO DE TOXICIDAD	8
3.3 SEGUNDO EXPERIMENTO DE TOXICIDAD.....	8
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
1. PRIMER EXPERIMENTO DE TOXICIDAD.....	9
2. SEGUNDO EXPERIMENTO DE TOXICIDAD	10
CONCLUSIÓN.....	12
FUTURAS DIRECCIONES	13
AGRADECIMIENTOS	14
ANEXO.....	15
BIBLIOGRAFÍA	16

RESUMEN

El presente trabajo de fin de grado tiene como objetivo la evaluación *in vivo* de la toxicidad de dos fármacos inmunoestimulantes, Resiquimod (R848) y Poly I:C, en embriones de *Danio rerio* (pez cebra). Investigamos el efecto de estos fármacos en su forma libre, y también cargados en el interior de nanocápsulas poliméricas de polímero 1, recubiertas o no con polímero 2. Ambos fármacos son capaces de inducir la reprogramación de macrófagos asociados a tumores (TAMs), desde un fenotipo M2 con propiedades protumorales a un fenotipo M1 con funciones antitumorales, mediante la activación de los receptores de tipo Toll (TLR) 7 y 8 en el caso de Resiquimod, y TLR3 en el caso de Poly I:C. Evaluamos la toxicidad de estos fármacos a 5 dosis diferentes (0,01mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,12 mg/ml y 0,25 mg/ml) mediante inyección intravenosa en peces cebra para establecer la dosis máxima inyectable que no causa mortalidad. En la segunda serie de experimentos, aumentamos el número de embriones por condición e inyectamos todos los grupos a una concentración de 0,25 mg/ml. A partir de los datos obtenidos, analizamos la toxicidad para cada grupo a las 24 horas post-inyección (hpi), a las 48hpi y a las 144hpi, y calculamos las curvas de supervivencia correspondientes a cada grupo. De acuerdo con estos análisis, podemos concluir que ninguno de los tratamientos investigados causa una mortalidad significativa en comparación con el grupo control.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de esta introducción se tratarán brevemente una serie de temas relevantes para este trabajo de fin de grado: conceptos de inmunoterapia antitumoral, TAMs como células diana en oncología, activadores de TLRs para la reprogramación de TAMs hacia un fenotipo con actividad antitumoral, el desarrollo y la evaluación de sistemas de liberación utilizando nanopartículas poliméricas para mejorar el efecto terapéutico además de reducir la toxicidad y, por último, el uso del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para la evaluación toxicológica y antitumoral de nuevas terapias dirigidas a la reprogramación del sistema inmune innato.

1. CÁNCER: INMUNOSUPRESIÓN Y TAMs

El cáncer es una enfermedad susceptible de aparecer en cualquier tejido de nuestro cuerpo caracterizada por la proliferación celular descontrolada. En fases avanzadas, los tumores suelen invadir otros tejidos diferentes a aquel en el que se originaron, proceso conocido como metástasis. De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, en 2018 se diagnosticaron alrededor de 18 millones de nuevos casos de esta enfermedad de los cuales un 23,4 % se registraron en el continente europeo [1].

El concepto de cáncer actual difiere de aquella primera idea del cáncer como una masa homogénea de células casi idénticas. Hoy en día sabemos que los tumores están formados por poblaciones celulares genéticamente diferentes, que van evolucionando con la progresión de la enfermedad y adquieren capacidades distintivas como la habilidad para priorizar rutas de señalización molecular proliferativa, la evasión de mecanismos supresores del crecimiento (ej. Genes p53 y RB), el escape de la muerte celular programada, la capacidad de replicación continua, la inducción de angiogénesis, la desregulación del metabolismo energético de la célula, la habilidad para invadir otros tejidos generando metástasis y la manipulación del sistema inmune para favorecer su crecimiento [2, 3]. Numerosos estudios han demostrado la importante inmunosupresión en pacientes con cáncer, poniendo de manifiesto la relevancia de conseguir una reprogramación efectiva del sistema inmune en estos pacientes [3].

El tipo celular del sistema inmune en el que centramos nuestra atención en el presente trabajo son los macrófagos asociados a tumores (TAMs), que en algunos tumores sólidos llegan a representar entre un 30% y un 50% de la masa total [4]. Los TAMs forman parte del microambiente tumoral y presentan unas funciones y un fenotipo protumoral, conocido como M2, que facilita el crecimiento del tumor, la remodelación del tejido circundante, los procesos de angiogénesis y la supresión de la inmunidad adaptativa [3, 5, 6]. Mediante la secreción de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y otras citoquinas, prostaglandinas y metabolitos inmunosupresores, son las propias células tumorales las que reclutan a los macrófagos y promueven su fenotipo M2 [7, 8]. La polarización de TAMs hacia un fenotipo M2 es inducido por citoquinas antiinflamatorias (ej. IL-4, IL-13, IL-10 y CSF-1) [5, 7] y se caracteriza por la producción de IL-10 que promueve y mantiene la inmunosupresión tumoral [5]. Además, los macrófagos con un fenotipo M2 sintetizan enzimas proteolíticas capaces de digerir la matriz extracelular, favoreciendo la metástasis [5]. Por el contrario, en el otro extremo teórico de la polarización nos encontramos a los macrófagos con fenotipo M1, con funciones antitumorales, que se caracterizan por la producción de citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α y de IL-12, además de presentar una activación del metabolismo de la arginina con altos niveles de expresión de la óxido nítrico sintasa (iNOS) dirigida a la producción de NO [5, 7].

Numerosas evidencias experimentales demuestran como la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 o M2 condicionan el desarrollo del cáncer. La presencia de TAMs con un fenotipo M2 es un claro indicador de un mal pronóstico de la enfermedad [5]. Por el contrario, en algunos casos, por ejemplo, en cáncer colorrectal la presencia de macrófagos M1 ha sido correlacionada con mayores índices de supervivencia [9].

2. RE-EDUCACIÓN DE TAMs MEDIANTE ACTIVADORES DE TLRs

Debido a su papel clave en la progresión tumoral, los TAMs se han convertido en una prometedora diana para tratamientos antitumorales que tienen por objetivo su eliminación o su reprogramación hacia un fenotipo M1 [10]. La activación de las funciones proinflamatorias y antitumorales, es decir, la reprogramación de los TAMs de un fenotipo M2 a un M1, puede lograrse mediante el tratamiento con activadores de receptores de tipo Toll (TLRs) [4, 11].

En el sistema inmune, los TLR se encargan del reconocimiento de patrones asociados a patógenos con el fin de activar la respuesta inmune oportuna [12]. Los TLR3/7/8, son receptores con una localización predominantemente intracelular, en las membranas de endosomas, que se encargan del reconocimiento de ácidos nucleicos derivados de patógenos [12]. El Resiquimod (R848), es un ligando de receptores de tipo toll (TLR7 y TLR8) presentes en macrófagos. R848 ejerce su efecto mediante la translocación al núcleo de factores de transcripción de la familia NF- κ B [13] y la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF α , IFN- α , IL-1, IL-6, IL-8, además de incrementar la regulación de moléculas coestimuladoras como CD28 y CD80 [14, 15]. Asimismo, R848 incrementa la propia expresión de sus receptores: TLR7 y TLR8 [16]. La eficacia del R848 para la reversión del fenotipo de TAM de M2 a M1 se ha comprobado *in vitro* en macrófagos humanos, e *in vivo* en modelos murinos con adenocarcinoma ductal pancreático [14, 17].

Por su parte, el Poly I:C es un análogo sintético de RNA de doble cadena formado por dos moléculas. A una de ellas se la conoce como ácido poliosínico y a la otra como ácido policitídílico [18]. Poly I:C es un ligando de receptores de tipo Toll, en este caso TLR3. Estudios *in vitro* en los que se evaluó la influencia de la señalización a través de TLR3 y TLR4 en el cambio de fenotipo de TAM demuestran que el tratamiento con Poly I:C incrementa la expresión de marcadores M1 (CD86, CD80 y CD40) [15, 19]. En otro estudio, se demostró que Poly I:C es capaz de reeducar macrófagos con fenotipos M2 (expuestos a IL-4 o a sobrenadantes de líneas tumorales) hacia un fenotipo M1, demostrando un aumento de marcadores y quimiocinas proinflamatorias: MHC II (complejo mayor de histocompatibilidad II), CCL5 y CXCL10 [12]. Cabe destacar que en la actualidad Poly I:C, en diferentes formulaciones y algunos análogos, se encuentran en fases tempranas de ensayos clínicos en oncología [11, 12].

Con el objetivo de mejorar la eficacia de estos fármacos y reducir su toxicidad sistémica, el grupo de investigación dirigido por la Prof. María José Alonso trabaja en el desarrollo de nanocápsulas poliméricas constituidas por un núcleo oleoso y una o varias cubiertas poliméricas que han mostrado su capacidad para la liberación selectiva de moléculas activas en macrófagos [20]. En este trabajo, hemos evaluado una serie de nanocápsulas, conteniendo R848 en el núcleo

lipídico y Poly I:C asociado a la superficie exterior mediante interacciones electrostáticas. Hipotéticamente, las nanocápsulas son endocitadas según un mecanismo mediado por receptores de membrana e internalizadas por los macrófagos a través de la formación de endosomas, lugar de localización de los receptores intracelulares TLR3, TLR7 y TLR8. La degradación de estas nanocápsulas en los endolisosomas favorecerá previsiblemente la liberación de R848 y Poly I:C en su lugar de acción [20, 21, 22]. Los prototipos con los mejores resultados en estudios *in vitro* con macrófagos humanos fueron seleccionados para realizar los ensayos de toxicidad de este trabajo de fin de grado.

3. VENTAJAS DE LA NANOMEDICINA

El uso de nano-vehículos para el transporte de fármacos inmunomoduladores aporta varias ventajas frente a la administración libre del fármaco. Principalmente, con el desarrollo de nanocápsulas (NCs) poliméricas, esperamos proteger los fármacos encapsulados frente a su degradación hasta que llegan a la diana terapéutica y pretendemos evitar que los fármacos interactúen con tejidos hacia los que no van dirigidos, permitiéndonos reducir la dosis administrada y disminuir su toxicidad sistémica [23, 24]. A modo de ejemplo, Zhu *et al* han desarrollado NCs con capacidad para liberar docetaxel en respuesta a un cambio de pH. Estas nanopartículas están formadas por “*poly lactic-co-glycolic acid*” (PLGA) funcionalizado con residuos de manosa en su superficie para unirse al receptor de manosa, sobreexpresado en los macrófagos asociados a tumores (TAMs). Con el objetivo de conseguir una internalización selectiva por parte de los TAMs, estas NCs se cubrieron con residuos de polietilenglicol (PEG) unidos a “*stearic acid hydrazide*” ($C_{18}H_{38}N_2O$), para proteger los residuos de manosa a pH fisiológico, pero cuya hidrólisis se cataliza al pH 6,8 del microambiente tumoral, permitiendo la interacción con los receptores de manosa de los TAMs y su posterior internalización [25].

4. PEZ CEBRA EN ESTUDIOS CON NANOMATERIALES Y XENOGRAFT

El pez cebra (*Danio rerio*) se considera un “*gold standard*” para los estudios de toxicidad de nuevos materiales en biomedicina debido a sus características [21, 24, 26, 27]. Su pequeño tamaño junto con su elevada capacidad para producir progenie nos permite hacer ensayos con muestras grandes, obteniendo estadísticas más robustas al reducir el efecto de la variabilidad individual [24]. Otra ventaja de esta especie animal es la de tener un desarrollo muy bien caracterizado, que nos permite discernir los efectos de una toxicidad de manera clara. Además, en lo relativo a los estudios con xenotrasplantes, el pez cebra demuestra soportar el crecimiento de líneas tumorales humanas sin necesidad de inmunosupresión (necesaria en modelos murinos), dado que no presenta un sistema inmune adaptativo durante el primer mes de desarrollo, aunque sí cuenta con un sistema inmune innato [24, 26]. Una última característica de interés

es la transparencia en las primeras etapas de su desarrollo, lo que facilita el seguimiento de la proliferación de células tumorales además de hacerlo ideal para estudios de biodistribución y permeabilidad de nanocompuestos [28].

En cuanto a los estudios de toxicidad de nanomateriales o fármacos, el pez cebra nos permite investigar los efectos de las siguientes vías de administración: oral, por inmersión o microinyección (intravenosa o intraperitoneal). La última de ellas es la preferible para materiales con una futura aplicación en clínica, ya que simula la administración parenteral en humanos [26]. Las microinyecciones intravenosas se practican en la parte baja del ducto de Cuvier a las 48 horas post-fecundación (hpf), cuando se estima que el animal tiene un volumen de sangre de 60 nL [26]. Los objetivos de estos estudios pueden ser obtener el perfil toxicológico de una muestra evaluando los efectos de una concentración a lo largo del tiempo, o de varias concentraciones a tiempos determinados. Algunos ejemplos de nanomateriales que ya han sido testados en Zebrafish vía microinyección incluyen nanopartículas de óxido de grafeno recubierto con polietilenglicol, nanopartículas de quitosano y nanocápsulas de inulina [21, 22, 27].

Como parte de su sistema inmune innato, *D. rerio* cuenta con macrófagos desde las etapas tempranas de su desarrollo. La presencia de este tipo celular ha sido demostrada y caracterizada con marcadores como la L-Plastina y la mieloperoxidasa, revelando su presencia en el tejido hematopoyético caudal [29]. Asimismo, se ha demostrado que los macrófagos en pez cebra responden a lesiones adoptando un fenotipo M1 caracterizado por la presencia de TNF- α e IL-6, y que en fases tardías de la respuesta evolucionan a un fenotipo M2 con expresión de CCR2 y CXCR4b, al igual que ocurre en mamíferos [9, 29, 30]. Algunos estudios han demostrado el reconocimiento de nanopartículas (NPs) por macrófagos en *D. rerio*, como es el caso de NPs cargadas con antibióticos para combatir a *Mycobacterium marinum* [24]. En esta línea, un reciente estudio de nuestro grupo de investigación ha comparado la citotoxicidad de nanocápsulas de inulina y quitosano en pez cebra, con particular atención a su interacción con macrófagos y biodistribución [22].

Por último, queda mencionar brevemente el papel de *Danio rerio* en estudios de xenotransplante de líneas celulares tumorales. La metodología de este tipo de estudios incluye la microinyección, generalmente a las 48hpf, de la línea celular de interés con algún marcaje, como la proteína verde fluorescente (GFP), la toma de imágenes y el estudio de progresión tumoral post-tratamiento. Por ejemplo, para el estudio de los efectos de dos tipos de gomesinas sobre la progresión de una línea de melanoma (MM96L) en modelos xenograft AVATAR-Zebrafish se usó el marcaje fluorescente en membrana de las células con Dil, mientras que en otro estudio con una línea colorrectal (HCT-116-GFP) se optó por el marcaje con la proteína verde fluorescente (GFP) [31, 32]. El marcaje nos permite seguir el desarrollo de

las células bien en coinyección con el tratamiento, o bien con una aplicación posterior del tratamiento o sin tratamiento, y permitiendo evaluar la efectividad de diferentes terapias.

OBJETIVO

- Determinar la toxicidad de R848 y Poly I:C, en su forma libre y en nanocápsulas de polímero 1, con y sin recubrimiento de polímero 2, administrados vía microinyección intravenosa en embriones de *Danio rerio*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MANTENIMIENTO DEL PEZ CEBRA

Los embriones usados para los experimentos de este TFG se obtuvieron del cruce de ejemplares de *Danio rerio* de tipo salvaje, línea AB. Los adultos cruzados (1 macho x 3 hembras) se mantuvieron a un ratio de 1 litro de agua por pez en un acuario de 30 litros con un ciclo de luz-oscuridad de 14:10 h y una temperatura de 28,5 °C. La experimentación y el manejo de los peces se realizaron con la aprobación del Comité de Bioética para el Cuidado y Uso de Animales de experimentación de la Universidad de Santiago de Compostela y los protocolos standard de España, directiva 2012-63-DaUE. Al final de los experimentos, los embriones se eutanasiaron mediante sobredosis de tricafina.

2. ELABORACIÓN DE LAS NANOCÁPSULAS

Las nanocápsulas utilizadas en este trabajo de fin de grado fueron elaboradas en el laboratorio de la Prof. María José Alonso, siguiendo el método de desplazamiento de disolvente [33]. La fase orgánica contiene R848 y se compone de D-L- α -tocoferol (Vitamina E) comprada en *EMD Millipore Corp.* (Massachusetts, EEUU), succinato de D-alfa tocoferil polietilenglicol 1000 comprado a *Antares Pharma Inc.* (Tennessee, EEUU), colato de sodio comprado a *Dextra Laboratories Ltd* (Reading, Reino Unido) y etanol absoluto comprado a *Scharlau* (Australia Meridional, Australia). La fase acuosa se compone de polímero 1 y agua Mili-Q obtenida con “*Mili-Q Integral System*” de *EMD Millipore Corp.*. La fase orgánica se añadió a la fase acuosa con una jeringa con aguja incorporada “Myjector U-100 Insulin 0,5 ml 29G – 0,33 x 12 mm” de Terumo (Maryland, EEUU) en un vaso de precipitados bajo agitación magnética. Se mantuvo la preparación en agitación hasta la evaporación del etanol. Posteriormente se enrasó el con agua Mili-Q, se filtró usando un sistema de filtración Amicon, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania), con un tamaño de poro de 100 kDa y se centrifugó durante 25 minutos a 7000 G y 15°C. Una vez aislada la preparación, se resuspendió en agua, se añadió el Poly I:C y se realizó el control de tamaño y potencial Z. El polímero 2 se añadió al final del proceso por incubación, tras la mezcla de ambas fases y purificación de las mismas. Por motivos de confidencialidad y posible patentabilidad de las nanocápsulas, en este trabajo nos referimos a los componentes de las nanocápsulas como “polímero 1” y “polímero 2”.

3. DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS DE TOXICIDAD

Los experimentos de toxicidad de este trabajo se dividieron en dos grupos. En el primero de ellos, comprobamos las toxicidades de seis tratamientos diferentes a cinco concentraciones, con el objetivo de seleccionar las condiciones apropiadas para el segundo, en el que aumentamos el número de peces para evaluar los efectos de una sola dosis de cada tratamiento.

3.1 MATERIALES

La microinyección se practicó con agujas de borosilicato (0,84mm O.D x 0,35mm I.D; World Precision Instruments) en el ducto de Cuvier de embriones de 48 horas post fecundación (hpf) con un micromanipulador y el Microinyector Eléctrico IM-31 (Narishige) a una presión de inyección de 10 kPa durante 20 ms y una presión de balance de 0,9 kPa.

Los embriones se anestesiaron añadiéndole al agua en la que se encontraban una concentración stock de triclaína (MS-222) de 4 mg/mL hasta una concentración final de 0,003%. El resiquimod (R848) se obtuvo de las casas *Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Alemania) y *MedChemExpress* (Monmouth Junction, NJ, EE. UU.) y el Poly I:C a las casas *HMW Pharmaceuticals Private Limited* (Hyderabad Telanga, India) e *InvivoGen* (California, EEUU).

3.2 PRIMER EXPERIMENTO DE TOXICIDAD

Este experimento se compone de dos réplicas en las que se realizó un seguimiento de los embriones durante seis días después de la inyección del tratamiento. Los embriones de 48 hpf se microinyectaron con 6 grupos de tratamientos: nanocápsulas de polímero 1 (NCs) vacías, NCs con R848, NCs con R848 y Poly I:C, R848 fármaco libre en disolución, Poly I:C fármaco libre en disolución y la combinación de ambos fármacos libres en disolución. Todos los tratamientos se diluyeron hasta la concentración deseada en agua libre de endotoxinas para su inyección.

Las concentraciones evaluadas en este experimento para cada grupo fueron 5: 0,25 mg/mL, 0,12 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,03 mg/mL y 0,01 mg/mL. En el grupo de Poly I:C y R848 libres, la relación entre fármacos fue 1:1.

Para cada condición se microinyectaron 5 peces y 35 controles inyectados con agua libre de endotoxinas, haciendo un total de 185 peces por réplica, 370 peces durante todo el experimento.

3.3 SEGUNDO EXPERIMENTO DE TOXICIDAD

Para este experimento se realizaron tres réplicas que incluían el seguimiento durante seis días post-inyección (dpi) de embriones microinyectados a las 48 hpf con la combinación de los fármacos libres R848 y Poly I:C, NCs de polímero 1 conteniendo estos fármacos, y las mismas nanocápsulas recubiertas con una cubierta adicional de polímero 2 (NCs 2).

Todos los tratamientos se diluyeron en agua libre de endotoxinas para su inyección a una concentración de 0,25 mg/mL

de cada uno de los fármacos. El agua libre de endotoxinas se microinyectó a un grupo control. Se incluyó para este ensayo un grupo de peces no inyectados (Blanco). Cada réplica incluyó 15 peces por grupo más 15 peces blanco, haciendo un total de 75 peces por réplica, 225 peces durante todo el experimento.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis se realizaron usando la versión 8.4.1 (460) de GraphPad Prism.

Para los cálculos de los primeros estudios de toxicidad, se escogieron los valores del número de muertes de las dos réplicas a las 24 hpi y 48 hpi. Se calcularon las medias y las desviaciones estándar. Para comprobar la significancia de los grupos con valores diferentes al control se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov, indicado para variables desparejadas no paramétricas que presentan una distribución acumulativa. Para el cálculo de los segundos estudios de toxicidad, se escogieron los valores del número de muertes de las tres réplicas a las 24 hpi, 48 hpi y 144 hpi y se siguió el procedimiento de los anteriores experimentos. Para eliminar la mortalidad no debida a microinyección, se restaron las muertes del Blanco correspondientes a las 24 hpi, 48 hpi y 144 hpi a cada grupo. En este experimento se calculó la curva de supervivencia para cada grupo usando el estimador de Kaplan-Meier. La significancia de las funciones de cada grupo con respecto al control se analizó mediante el test de Mantel-Cox. Para la construcción de la curva también se restaron las muertes del Blanco a las muertes de cada grupo durante los seis días de seguimiento del experimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

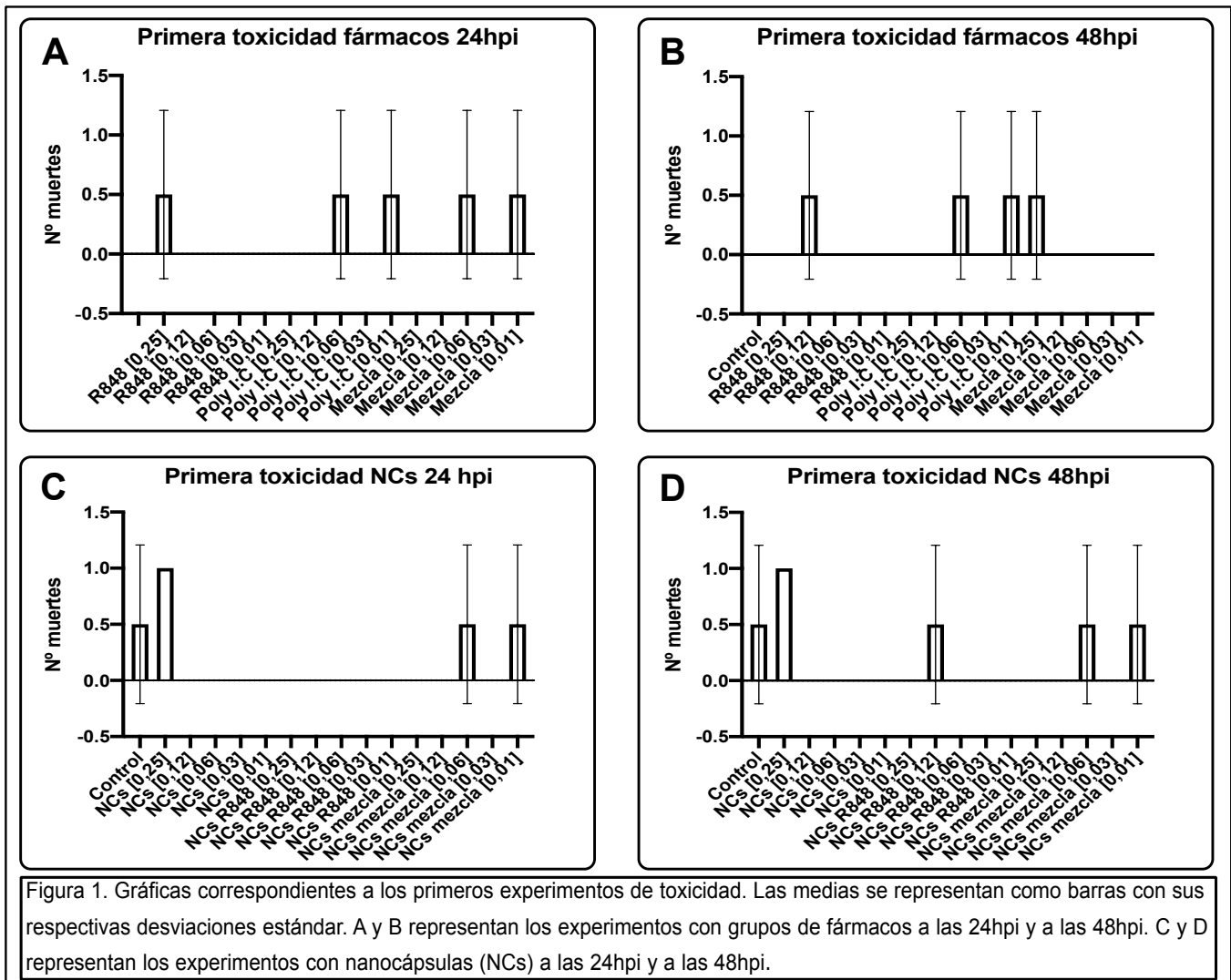
1. PRIMER EXPERIMENTO DE TOXICIDAD

El objetivo de este experimento inicial ha sido apreciar si existían diferencias significativas en la mortalidad de peces cebra a las diferentes concentraciones a las que se inyectó cada tratamiento; Poly I:C libre, R848 libre, la mezcla de ambos fármacos libres, NCs de polímero 1 vacías, NCs de polímero 1 conteniendo R848 y NCs de polímero 1 conteniendo R848 y pIC. Los resultados obtenidos, a las 24hpi y 48hpi, momentos con mayores diferencias entre la mortalidad de cada grupo, se resumen en la figura 1. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos y el control, siendo todos los P valor mayores de 0,99 (Anexo Tabla 1 pag. 15).

Al no encontrar cambios significativos en la mortalidad, decidimos aumentar el tamaño muestral de cada grupo (de 5 a 15 peces), el número de réplicas (de 2 a 3) y centrarnos en la concentración máxima (0,25 mg/mL) para el segundo experimento de toxicidad.

Estudios similares de toxicidad de nanomateriales usando *D. rerio*, fijaron un tamaño muestral de entre 20 y 21 embriones, con un número de réplicas que oscila entre 1 y 3 [21, 22].

De acuerdo con nuestros resultados, existen publicaciones que informan de la supervivencia de *D. rerio* a concentraciones de pIC y R848 más altas que las utilizadas en este experimento [22, 34], si bien el modo de administración difiere para los fármacos y la combinación de ambos fármacos nunca ha sido evaluada en pez cebra.

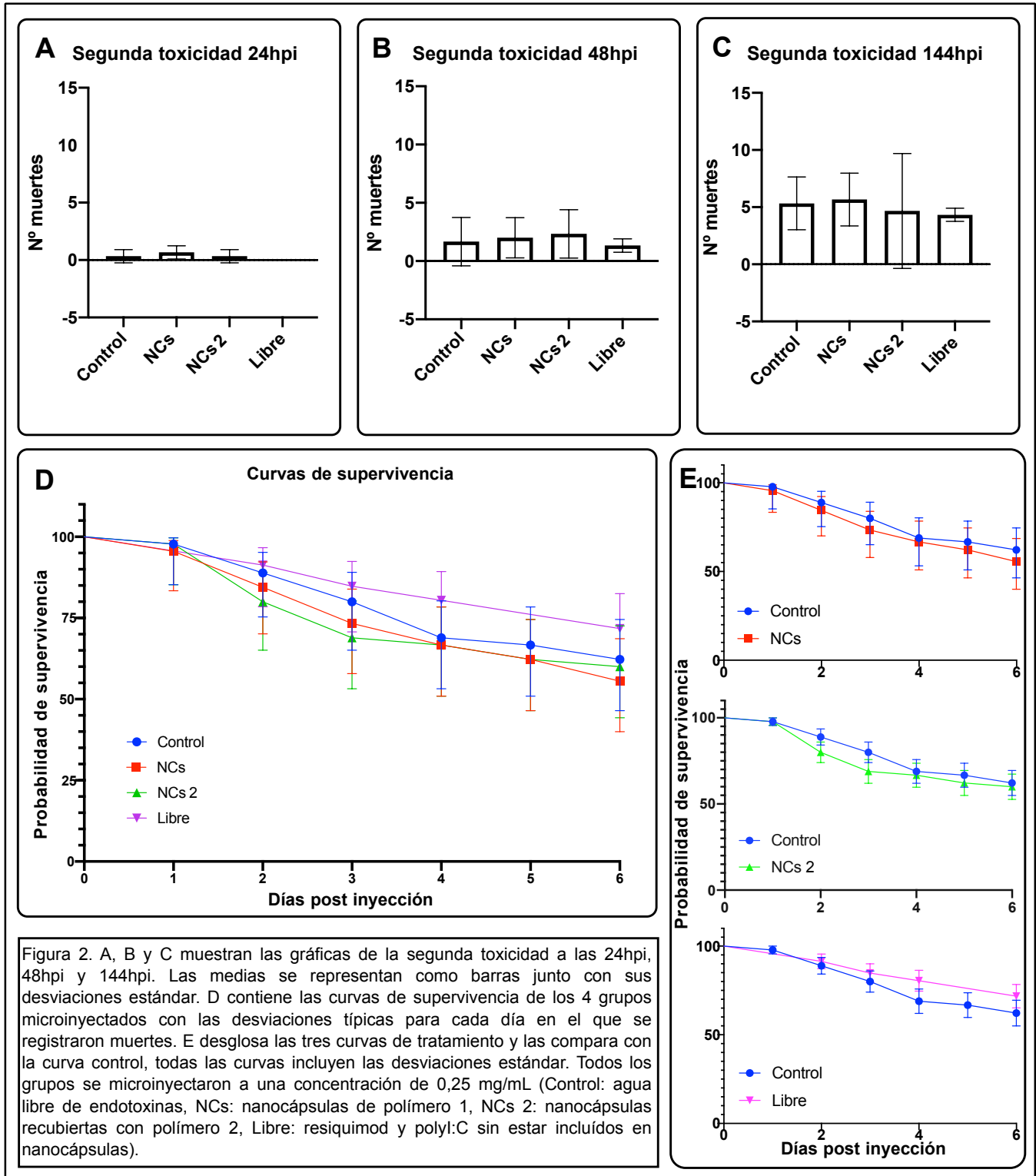


2. SEGUNDO EXPERIMENTO DE TOXICIDAD

Los resultados de este experimento se resumen en la figura 2. Al igual que en los experimentos anteriores, la comparación de cada grupo con el control a las 24hpi, 48hpi y 144hpi, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, no mostró valores P significativos ($0,05 > P$) (Anexo Tabla 2 pag. 15).

En este caso, se incluyeron los datos a las 144hpi debido a que la mortalidad en todos los grupos, salvo el blanco, rondaba el 30%, el doble que a las 48hpi (15%). Habiendo una diferencia tan grande entre las 48hpi y las 144hpi, la representación de la mortalidad en el último día de seguimiento es importante para mostrar la mortalidad esperable tras los 6dpi.

Para su representación en las gráficas, a la mortalidad de cada grupo se le restó la mortalidad del Blanco, de forma que eliminamos la mortalidad propia de los peces durante su desarrollo. Las comparaciones entre grupos en este caso tampoco aportan valores de P significativos (Anexo Tabla 2 pag. 15), lo que podemos interpretar como una reducida toxicidad de los tratamientos evaluados. El valor de P más bajo (0,10) correspondió a la comparación del Blanco con el grupo control a las 144hpi (Anexo Tabla 2, pag. 15).



El mayor tamaño muestral de este experimento permitió ejecutar el análisis de Kaplan-Meier para obtener las probabilidades de supervivencia de *D. rerio* durante el ensayo. Con este análisis se pueden representar las funciones de supervivencia de grupos tratados y no tratados durante el curso de un experimento, lo que posibilita la comparación, mediante el test de Mantel-Cox, de funciones enteras y no de momentos puntuales. Varios estudios utilizan esta metodología para determinar si la supervivencia de modelos animales se ve afectada después de someterlos a un tratamiento (ratones) o insecticida (mosquitos) [35, 36, 37]. El tamaño muestral de los estudios con ratones oscila entre los 5 y los 19 ratones para la obtención de las funciones de supervivencia [35, 36].

Para construir las funciones de supervivencia, las tres réplicas se trataron como una sola, de manera que por cada grupo tenemos los datos de 45 peces. Cuando las curvas se comparan con el test de Mantel-Cox, se ve que los valores de P oscilan entre 0,30 y 0,71 (Anexo Tabla 2 pag. 15), correspondiendo el más bajo a la comparación entre el grupo control y los fármacos libres. De todos modos, los valores obtenidos se alejan de cualquiera considerado significativo ($0,05 > P$). En el desglose de cada curva comparada con la curva del control (Figura 2-E), se aprecia como todas las desviaciones estándar se solapan durante todos los días que duró el experimento, incluida la curva de los fármacos libres (para la que no se registraron muertes a día 5 post-inyección) con la del control. En conjunto, los datos indican que ningún tratamiento provoca una mortalidad significativamente mayor cuando se comparan con el control.

Todos los grupos compartían dos condiciones, la técnica de microinyección y el agua libre de endotoxinas en la que se formularon las nanocápsulas. El Blanco, que no sufrió microinyección ni se expuso al agua libre de endotoxinas, registra menos muertes que cualquiera de los otros grupos a las 144hpi, aunque cuando se las compara con el control en los momentos escogidos siguen sin ser significativas (Anexo Tabla 2 pag. 15). En futuros experimentos, sería interesante evaluar la toxicidad del agua libre de para determinar si esta diferencia en mortalidad se debe a esa condición.

CONCLUSIÓN

- Ninguno de los tratamientos evaluados ha demostrado una toxicidad significativa a las dosis y tiempos evaluados. Los peces cebra tratados con una combinación de los fármacos Poly I:C y Resiquimod libres, encapsulados en nanocápsulas de polímero 1, con una cubierta adicional o no de polímero 2, presentan una mortalidad similar a los peces control (no tratados), hasta una dosis máxima evaluada de 0,25 mg/mL de cada fármaco.

FUTURAS DIRECCIONES

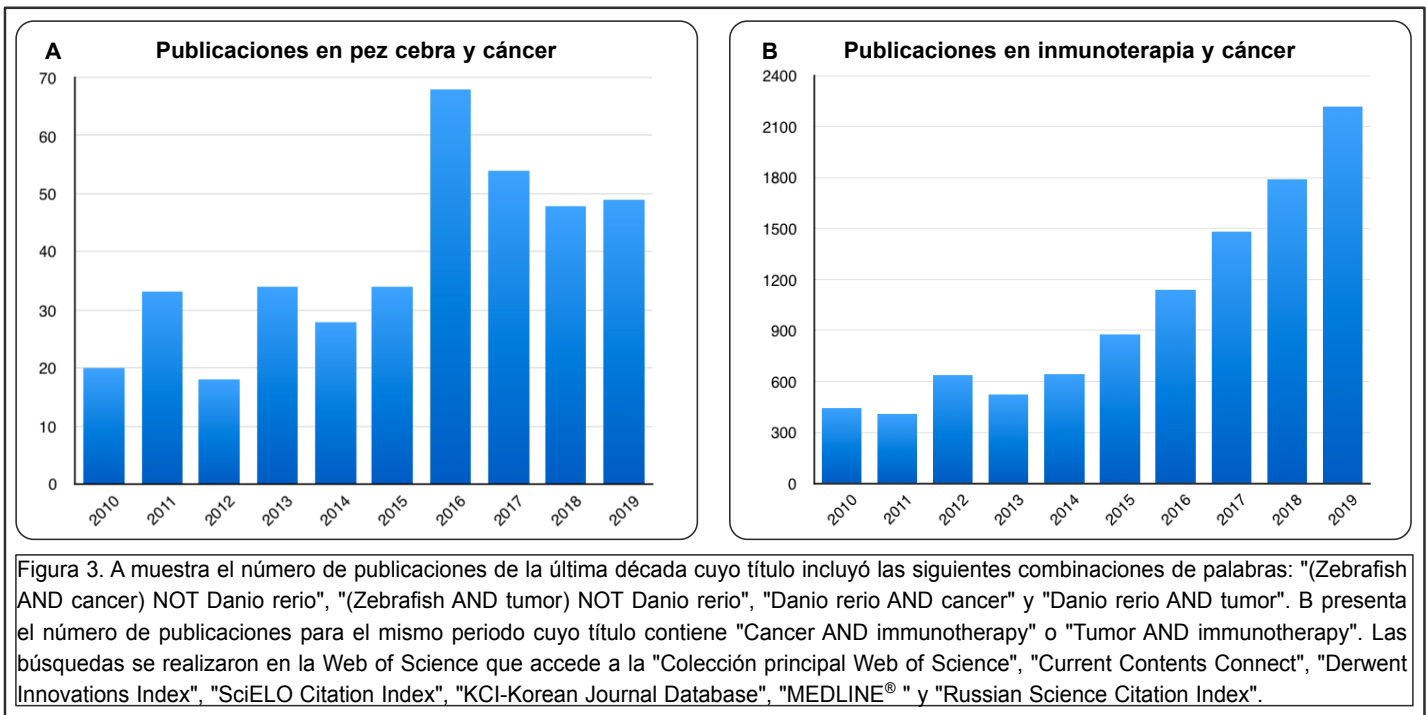
En este trabajo de fin de grado utilizamos la especie *Danio rerio* para investigar la toxicidad de dos fármacos inmunoestimulantes libres o cargados en nanocápsulas poliméricas. Estos tratamientos están siendo evaluados en paralelo por el grupo de la Prof. María José Alonso, el Dr. Fernando Torres Andón y sus colaboradores en modelos *in vitro* y en modelos preclínicos murinos de cáncer de pulmón. El planteamiento original de este TFG incluía evaluar la actividad antitumoral de los mismos tratamientos utilizando modelos de cáncer de pulmón (A549) xenograft en pez cebra. Debido a las limitaciones provocadas por el Sars-CoV-2, los experimentos de actividad antitumoral fueron suspendidos. En esta última sección, se aporta una breve explicación de por qué seleccionamos xenografts en *D. rerio* como modelo para evaluar la eficacia antitumoral de estimuladores de la inmunidad innata, como Poly I:C y Resiquimod.

La estimulación de receptores tipo Toll (TLRs) y de sus correspondientes vías de señalización moleculares en *Danio rerio* han sido estudiados en numerosos estudios, con el foco puesto en la validez de este modelo para el estudio de vacunas para la acuicultura [38, 39, 40, 31, 42]. Los genes codificantes para TLR3/4/7/8 en pez cebra comparten más de un 50% de identidad (63% de similaridad en el caso del TLR3) con sus correspondientes en humanos, y la expresión de los mismos es detectable a partir de las 12hpf [39, 42]. Las secuencias de elementos claves de la vía de señalización: TIR, MyD88, SARM, IRAK4 o TRAF-6 comparten un 50-70% de identidad con sus ortólogos en humanos [39, 42]. La activación de TLR3 ha sido demostrada en pez cebra tras la infección con el virus de la hemorragia septicémica (VHSV), *Listeria monocytogenes* [38, 41], *Edwardsiella tarda* o SHRV (rhabdovirus de cabeza de serpiente) [42]. Que la expresión de TLRs y moléculas implicadas en sus vías de señalización aumente en respuesta a agente patógenos, apunta a una semejanza funcional en el sistema inmune entre mamíferos y *D. rerio*. Se ha sugerido la presencia de rutas de señalización de TLRs en el ancestro común de los Eumetazoa y las esponjas para explicar la presencia tan conservada de estos receptores y las moléculas implicadas en su ruta de señalización [40]. Compartir vías de señalización y la estructura de TLRs con *Danio rerio* apoya su uso como posible organismo modelo en inmunoterapia contra el cáncer en futuros estudios, que podrían beneficiarse de las ventajas de este organismo modelo.

La utilización de PolyI:C para el tratamiento del cáncer ha sido estudiado principalmente en modelos murinos o ensayos *in vitro*. Existen numerosas publicaciones demostrando su eficacia, en combinación con anticuerpos anti-IL6 o con inhibidores de caspasas (zVAD) entre otros, en líneas tumorales de pulmón, de mama y de colon [43, 44, 45]. También existen estudios que demuestran la eficacia de R848 en inmunoterapia contra el cáncer en ratón e *in vitro* [14, 17]. En la

actualidad, PolyI:C y R848 se encuentran en las fases 1 y 2 de diferentes ensayos clínicos, en combinación con otros tratamientos como la radioterapia (Poly I:C) o componentes biológicos como la proteína NY-ESO-1 (R848) [46].

El uso de modelos murinos en los experimentos descritos limita el tamaño muestral, por cuestiones económicas, éticas y de la biología del animal. Asimismo, la experimentación *in vitro* presenta limitaciones importantes para el estudio del sistema inmune. Por lo tanto, consideramos interesante la utilización de *D. rerio* como un posible modelo *in vivo*, previo a la utilización de ratones u otros mamíferos. En la figura 3 podemos apreciar cómo el número de publicaciones relacionadas con inmunoterapia y cáncer ha aumentado exponencialmente en la última década, al igual que un aumento paulatino de las publicaciones que incluyen a *Danio rerio* en investigación contra el cáncer. Teniendo en cuenta sus ventajas como organismo modelo y su uso actual en el laboratorio, no es descabellado pensar que la incorporación de *D. rerio* en la investigación en inmunoterapia podría ayudar al avance de este campo.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todo el personal de *ZebraBioRes*, laboratorio de la Prof. Laura Sánchez, su colaboración en los ensayos de toxicidad de pez cebra y mantenimiento de los peces. Agradezco especialmente, a Pablo Cabezas Sáinz por enseñarme a practicar la microinyección al resto del personal por su ayuda en el mantenimiento de los peces.

También agradezco a la Prof. María José Alonso y a todo el personal de su laboratorio, *MJ Alonso LAB*, su colaboración en la realización de este TFG. Igualmente, me gustaría agradecer a Carmen Fernández Varela por la elaboración de las nanocápsulas usadas en este trabajo, así como a Fernando Torres Andón por su participación como co-tutor.

ANEXO

Tabla 1. Datos en bruto representados en la figura 1 y valores P de las obtenidos test de Kolmogorov-Smirnov. *Los controles se estandarizaron a 5 unidades.**Las concentraciones se presentan como mg/mL.Tabla 2. Datos en bruto de la segunda toxicidad y valores P de los tests Kolmogorov-Smirnov y Mantel-Cox.

PRIMERA TOXICIDAD	24hpi (1ª réplica)	24hpi (2ª réplica)	48hpi (1ª réplica)	48hpi (2ª réplica)
Control-Fármacos*	0	0	0	0
R848 [0,25]**	1	0	1	0
R848 [0,12]	0	0	2	0
R848 [0,06]	0	0	0	0
R848 [0,03]	0	0	0	0
R848 [0,01]	0	0	0	0
Poly I:C [0,25]	0	0	0	0
Poly I:C [0,12]	0	0	0	0
Poly I:C [0,06]	1	0	1	0
Poly I:C [0,03]	0	0	0	0
Poly I:C [0,01]	1	0	1	0
Mezcla [0,25]	0	0	1	0
Mezcla [0,12]	0	0	0	0
Mezcla [0,06]	1	0	1	0
Mezcla [0,03]	0	0	0	0
Mezcla [0,01]	1	0	1	0
Control-NCs	0	1	1	0
NCs vacías [0,25]	1	1	1	1
NCs vacías [0,12]	0	0	0	0
NCs vacías [0,06]	0	0	0	0
NCs vacías [0,03]	0	0	0	0
NCs vacías [0,01]	0	0	0	0
NCs R848 [0,25]	0	0	0	0
NCs R848 [0,12]	0	0	1	0
NCs R848 [0,06]	0	0	0	0
NCs R848 [0,03]	0	0	0	0
NCs R848 [0,01]	0	0	0	0
NCs mezcla [0,25]	0	0	0	0
NCs mezcla [0,12]	0	0	0	0
NCs mezcla [0,06]	1	0	1	0
NCs mezcla [0,03]	0	0	0	0
NCs mezcla [0,01]	1	0	2	0
COMPARACIÓN GRUPOS	P valor			
	24 hpi		48hpi	
Todos los grupos con su control				
		> 0,99		> 0,99

Tabla 2. Datos en bruto de la segunda toxicidad y P valores de los tests Kolmogorov-Smirnov y Mantel-Cox.

SEGUNDA TOXICIDAD	1ª réplica			2ª réplica			3ª réplica		
	24 hpi	48 hpi	144 hpi	24 hpi	48 hpi	144 hpi	24 hpi	48 hpi	144 hpi
Blanco	0	0	1	0	0	0	0	1	3
Control	0	4	5	1	1	9	0	1	6
NCs	1	4	8	0	1	8	1	2	6
NCs 2	0	0	1	1	3	11	0	5	7
Libre	0	1	5	0	2	6	1	2	7
COMPARACIÓN GRUPOS	P valor			COMPARACIÓN CURVAS			P valor		
	24 hpi	48 hpi	144 hpi						
Control / NCs	> 0,99	> 0,99	> 0,99	Control / NCs			0,50		
Control / NCs 2	> 0,99	> 0,99	> 0,99	Control / NCs 2			0,71		
Control / Libre	> 0,99	> 0,99	> 0,99	Control / Libre			0,30		
Control / Blanco	> 0,99	0,40	0,10	-			-		

BIBLIOGRAFÍA

1. GLOBOCAN 2018 [Online]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr> [Accedido a 1 de Marzo de 2020].
2. Hanahan, D., *et al.* (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, vol. 144, nº 5, p. 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
3. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., *et al.* (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, vol. 454, p. 436–444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>.
4. Torres Andón, F. y Alonso, M^a. J. (2015). Nanomedicine and cancer immunotherapy – targeting immunosuppressive cells. *Journal of Drug Targeting*, vol. 23, nº. 7-8, pp. 656-671. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1073295>.
5. Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., *et al.* (2017). Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 14, pp. 399–416. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.217>.
6. Muliaditan, T., Caron, J., Okesola, M., *et al.* (2018). Macrophages are exploited from an innate wound healing response to facilitate cancer metastasis. *Nat Commun.* 9, nº. 2951. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05346-7>.
7. Mantovani, A., Sozzani S., *et al.* (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, vol. 23, nº 11, pp. 549-555. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02302-5).
8. Ransohoff, R (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?. *Nat Neurosci.* 19, pp. 987–991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>.
9. Narayanan, S., Kawaguchi, T., *et al.* (2019). Tumor Infiltrating Lymphocytes and Macrophages Improve Survival in Microsatellite Unstable Colorectal Cancer. *Sci Rep.* 9, 13455. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49878-4>.
10. Maniati E., Berlato, C., *et al.* (2019). Mouse Ovarian Cancer Models Recapitulate the Human Tumor Microenvironment and Patient Response to Treatment. *Cell*, vol. 30, nº. 2, pp. 525-540. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.034>.
11. Aznar, M.A., Planelles, L., Perez-Olivares, M., *et al.* (2019). Immunotherapeutic effects of intratumoral nanoplexed poly I:C. *J. immunotherapy cancer*, vol. 7:116, nº. 1. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0568-2>.
12. Maeda, A., *et al.* (2019). Poly(I:C) stimulation is superior than Imiquimod to induce the antitumoral functional profile of tumor-conditioned macrophages. *Eur. J. Immunol.*, vol. 49, pp. 801-811. <https://doi.org/10.1002/eji.201847888>.
13. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Resiquimod, CID=159603, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resiquimod> [Accedido a 23 de Febrero de 2020].

14. Rodell C.B., Arlauckas S.P., *et al.* (2018). TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy. *Nat Biomed Eng.* 2, pp. 578-588. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0236-8>.
15. Vidyarthi, A., *et al.* (2018). TLR-3 Stimulation Skews M2 Macrophages to M1 Through IFN- $\alpha\beta$ Signaling and Restricts Tumor Progression. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01650>.
16. Adzavon Y.M., Zhao P., *et al.* (2017). TLR7 and TLR8 agonist resiquimod (R848) differently regulates MIF expression in cells and organs. *Cytokine*, vol. 97, pp. 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.06.006>.
17. Michaelis, K.A., Norgard, M.A., *et al.* (2019). The TLR7/8 agonist R848 remodels tumor and host responses to promote survival in pancreatic cancer. *Nat Commun.*, 10, n°. 4682. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12657-w>.
18. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Poly I:poly C, CID=135478809, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135478809> [Accedido a 23 de Febrero de 2020].
19. Röszer T (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation*, vol. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/816460>.
20. Torres Andón, F., *et al.* (2017). Targeting tumor associated macrophages: The new challenge for nanomedicine. Elsevier, *Seminars in Immunology*, vol. 34, pp. 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.09.004>.
21. Chang, H., *et al.* (2016). Predicting *in vivo* accumulation of nanoparticles in tumor based on *in vitro* macrophage uptake and circulation in zebrafish. *Journal of Controlled Release*, vol. 244, pp. 205-213. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.025>.
22. Crecente-Campo, J., *et al.* (2019). The size and composition of polymeric nanocapsules dictate their interaction with macrophages and biodistribution in zebrafish. *Journal of Controlled Release*, vol. 308, pp. 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.011>.
23. Riley, R.S., June, C.H., *et al.* (2019). Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 18, pp. 175–196. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0006-z>.
24. Evensen, L., *et al.* (2016). Zebrafish as a model system for characterization of nanoparticles against cancer. *Nanoscale*, n° 2. <https://doi.org/10.1039/C5NR07289A>.
25. Saije, Z., *et al.* (2013). Targeting of Tumor-Associated Macrophages Made Possible by PEG-Sheddable, Mannose-Modified Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, vol. 10, n°. 9, pp. 3525-3530. <https://doi.org/10.1021/mp400216r>.

26. Hao-Ran, J., *et al.* (2019). Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, vol. 311-312, pp. 301-318. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.022>.
27. Jeong, J., *et al.* (2015). *In vivo* toxicity assessment of angiogenesis and the live distribution of nano-graphene oxide and its PEGylated derivatives using the developing zebrafish embryo. *Carbon*, vol. 93, pp. 431-440. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.05.024>.
28. Teijeiro-Valiño, C., *et al.* (2017). Assessment of the permeability and toxicity of polymeric nanocapsules using the zebrafish model. Future Medicine Ltd, *Nanomedicine*, vol. 12, n°. 17, pp. 2069-2082. <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0078>.
29. R. Mathias, J., *et al.* (2009). Characterization of Zebrafish larval inflammatory macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 33, n°. 11, pp. 1212-1217. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.07.003>.
30. Nguyen-Chi, M., *et al.* (2015). Identification of polarized macrophage subsets in zebrafish. *eLife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.07288>.
31. Ikonopoulou, M.P., *et al.* (2018). Gomesin inhibits melanoma growth by manipulating key signaling cascades that control cell death and proliferation. *Sci Rep* 8, n°. 11519. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29826-4>.
32. Roel, M., *et al.* (2016). Marine guanidine alkaloids crambescidins inhibit tumor growth and activate intrinsic apoptotic signaling inducing tumor regression in a colorectal carcinoma zebrafish xenograft model. *Oncotarget*, n°. 7, pp. 83071-83087. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13068>.
33. Crecente-Campo, J. y Alonso, M., J. (2019). Engineering, on-demand manufacturing, and scaling-up of polymeric nanocapsules. *Bioeng Transl Med*, vol. 4, n°. 1, pp. 38-50. <https://doi.org/10.1002/btm2.10118>.
34. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (2019). Induction of innate cytokine responses by respiratory mucosal challenge with R848 in zebrafish, mice, and humans. *Elsevier, J Allergy Clin Immunol*, Letters to the editor, vol. 144, n°.1, pp. 342-345. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.04.003>.
35. Oestereich, L., *et al.* (2014). Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) un a small animal model. *Antiviral Research*, vol. 105, pp. 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.02.014>.
36. Vamos, E., *et al.* (2010). Neuroprotective effects of L-carnitine in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 64, n°. 4, pp. 282-286. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.06.020>.
37. M. Poché, R., *et al.* (2015). Treatment of livestock with systemic insecticides for control *Anopheles arabiensis* in western Kenya. *Malaria Journal*, vol. 14, n°. 351. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0883-0>.

38. Novoa, B., *et al.* (2006). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV). Elsevier, *Vaccine*, vol. 24, n°. 31-32, pp. 5806-5816. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.015>.
39. Jault, C., *et al.* (2004). Toll-like receptor gene family and TIR-domain Adapters in *Danio rerio*. *Molecular Immunology*, vol. 40, n° 11, pp. 759-771. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.001>.
40. Rauta, P. R., *et al.* (2014). Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signalling pathways, expressions and immune responses. Elsevier, *Immunology Letters*, vol. 158, n°. 1-2, pp. 14-24. <https://doi.org/10.1016/>.
41. Ding, C., *et al.* (2017). A potential aquaculture vaccine vector: Evaluation of a double-gene attenuated *Listeria monocytogenes* in zebrafish (*Danio rerio*). Elsevier, *Aquaculture*, vol. 479, pp. 311-320. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.018>.
42. Phelam, P., E., *et al.* (2005). Functional characterization of full-length TLR3, IRAK-4, and TRAF6 in zebrafish (*Danio rerio*). Elsevier, *Molecular Immunology*, vol. 42, n°. 9, pp. 1057-1071. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.11.005>.
43. Lau, W., H., *et al.* (2017). Combinatorial treatment with poly I:C and anti-IL6 enhances apoptosis and suppresses metastasis of lung cancer cells. *Oncotarget*, vol. 8, n°. 20, pp. 32884-32904. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15862>.
44. Charlebois, R., *et al.* (2017). PolyI:C and CpG Synergize with Anti-ErbB2 mAb for Treatment of Breast Tumors Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Research*, vol. 77, n°. 2, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1873>.
45. Takemura, R., *et al.* (2015). PolyI:C-Induced, TLR3/RIP3-Dependent Necroptosis Backs Up Immune Effector-Mediated Tumour Elimination In Vivo. *Cancer Immunology Research*, vol. 3, n°. 8. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0219>.
46. Cen, X., *et al.* (2018). The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and Tumor Immunity. *Front Pharmacol*, vol. 9, n°. 878. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00878>.