

# Establecimiento de un modelo preclínico de neuroblastoma en ratones inmunocompetentes

A.L. Luis<sup>1</sup>, M. Espinoza<sup>1</sup>, L. Franco<sup>2</sup>, A. González-Murillo<sup>2</sup>, G.J. Melen<sup>2</sup>, J.C. Ollero Fresno<sup>1</sup>, L. Madero<sup>2</sup>, M. Ramírez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cirugía Pediátrica, <sup>2</sup>Oncología. Hospital Universitario Infantil Niño Jesús. Madrid.

## RESUMEN

**Objetivo.** Desarrollar un modelo animal de neuroblastoma (NB) que posibilite estudios relacionados con la inmunidad tumoral.

**Material y métodos.** Se utilizaron dos tipos de células NB. La línea 36769 procedía del ratón TH-MYCN<sup>+</sup> en el que la sobreexpresión del gen MYCN está gobernada por el promotor de la tirosin hidroxilasa de rata. La línea 4040 procedía de ratones TH-MYCN<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup>, que además expresan una mutación activadora del gen ALK.

De cada tipo celular se implantaron 1x10<sup>6</sup> neuroesferas en ratones 129/SVJ (mismo fondo genético que los donantes, n=8), mediante inyección ortotópica en glándula suprarrenal izquierda por abordaje intraperitoneal, a través de laparotomía transversa supraumbilical. Se realizó seguimiento clínico diario postquirúrgico de los animales hasta su sacrificio a las 4 semanas.

La presencia de tumor se confirmó macroscópicamente. La pieza tumoral se extirpó y se procesó para estudios de inmunidad celular y mediadores moleculares de tolerancia. Se investigó la existencia de metástasis por citometría de flujo en bazo, médula ósea y sangre periférica.

**Resultados.** 1) En todos los ratones trasplantados se generó NB ortotópico. 2) La pieza tumoral se encontró infiltrada por diversas subpoblaciones inmunes, con inmunofenotipo efector, regulador y supresor, similar a la situación descrita en los NB humanos. Además, los mediadores moleculares del microambiente apuntan a un estado de tolerancia protumoral.

**Conclusiones.** La implantación ortotópica de neuroesferas NB en ratones singénicos nos ha permitido generar un modelo de NB en el que ha sido posible estudiar la inmunidad tumoral.

**PALABRAS CLAVE:** Neuroblastoma; Modelo preclínico; Transgénico; Singénico; Inmunoterapia.

**Correspondencia:** Dra. Ana Lourdes Luis Huertas. Hospital Universitario Niño Jesús. Servicio de Cirugía Pediátrica. Avenida Menéndez Pelayo, 65. 28009 Madrid.

E-mail: analluiscp@gmail.com

*Este trabajo ha sido financiado con Fondos Públicos por: el Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI/02487; EC11-061, y EC07/90591), y del Gobierno de la Comunidad de Madrid (S-BIO-0204-2006, MesenCAM; P2010/BMD-2420, CellCAM).*

*Otras financiaciones: Asociación Pablo Ugarte (Lucha Cáncer Infantil) y Asociación NEN (Asociación de padres, familiares y amigos de Niños Enfermos con Neuroblastoma).*

Recibido: Mayo 2016

Aceptado: Diciembre 2016

## ESTABLISHMENT OF A PRECLINICAL NEUROBLASTOMA MODEL IN IMMUNOCOMPETENT MICE

### ABSTRACT

**Aim.** To develop a NB animal model which makes possible studies related to tumor immunity.

**Materials and methods.** Two types of NB cells were used. Cell line 36769 was derived from TH-MYCN<sup>+</sup> mouse in which overexpression of the MYCN gene is governed by rat tyrosine hydroxylase promoter. Cell line 4040 was derived from TH-MYCN/ALK mice, which in addition express an activating mutation of ALK gene.

For each cell type, 1x10<sup>6</sup> neurospheres were implanted in 129/SVJ mice (with the same genetic background as donors, n=8), via orthotopic injection in the left suprarenal gland by intraperitoneal approach, through a transverse supraumbilical laparotomy.

Daily postsurgical clinical follow-up of the animals was done until they were sacrificed at four weeks.

The tumor presence was macroscopically confirmed. The tumoral sample was excised and was processed for cellular immunity and molecular tolerance mediator's studies.

The existence of metastasis was investigated by flow cytometry in the spleen, bone marrow and peripheral blood.

**Results.** 1) Orthotopic Neuroblastoma was generated in all the transplanted mice. 2) The tumors were infiltrated by several immune subpopulations, with effector, regulatory and suppressor immunophenotype. This was similar to the immunophenotype described in human NB. Furthermore, the molecular mediators of the environment point to a state of protumoral tolerance.

**Conclusion.** The orthotopic implantation of NB neurospheres in syngeneic mice has allowed us to generate a NB model in which it has been possible to study the tumor immunity.

**KEY WORDS:** Neuroblastoma; Preclinical model; Transgenic; Syngeneic graft; Immunotherapy.

## INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracranial más frecuente en la población pediátrica. Su tratamiento supone un reto para oncólogos y cirujanos pediátricos ya que, a pesar de los avances en las terapias de quimioterapia, radioterapia y trasplante de médula ósea, no se han conseguido

mejoras en la supervivencia en la última década, siendo su mortalidad aún cercana al 50% en los grupos de alto riesgo<sup>(1,2)</sup>.

En el intento de mejorar su supervivencia, se hace necesario el desarrollo de modelos preclínicos de NB, que permitan la investigación de aspectos citogenéticos y moleculares, que ayuden a esclarecer su origen, así como al desarrollo de nuevas terapias avanzadas<sup>(3-6)</sup>.

En este trabajo se describe el establecimiento de un modelo murino de trasplante de NB en un animal inmunocompetente. Dicho modelo posibilita estudios relacionados con la inmunidad tumoral, un campo de vital importancia en la investigación y el desarrollo de tratamientos futuros de inmunoterapia y viroterapia oncolítica en dicho tumor.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Animales:** se usaron ratones comprados al repositorio del National Cancer Institute (Frederick, Maryland, EEUU), mantenidos en el Animalario del CIEMAT (Registro Número 28079-21 A), cumpliendo con todas las recomendaciones y las leyes españolas y europeas (FELASA: Federación Europea de Asociaciones de Laboratorio de Animales en la Ciencia).

Se trasplantaron células de NB procedentes de dos líneas celulares de ratones con NB, en 8 ratones *wild type* (WT) 129/SJV, del mismo fondo genético que los donantes.

La primera línea celular: 36769 ( $n=4$ ), procedía de ratones con NB: TH-MYCN<sup>+</sup>, en el que la sobreexpresión del gen MYCN está gobernada por el promotor de la tirosina hidroxilasa de rata.

La segunda línea celular: 4040 ( $n=4$ ), se obtuvo de ratones, con NB, TH-MYCN<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup>, que además expresan una mutación activadora del gen ALK.

Ambas líneas fueron cedidas por el Doctor Louis Chesler, del Royal Marsden, Londres.

Las células fueron transducidas con un vector lentiviral EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) con el fin de transformarlas en células fluorescentes que permitiera localizarlas por citometría de flujo en órganos periféricos y poder determinar la existencia o no de metástasis.

Las neuroesferas de NB de cada línea celular se cultivaron en medio DMEM:F12 (1:1), suplementado con B27 sin vitamina A (Gibco), mFGF (*murine Fibroblastic Grow Factor*: 40 ng/ml, R&D Systems), mEGF (*murine Epidermic Grow Factor*: 20 ng/ml, R&D Systems) y 1% penicilina-estreptomina (Gibco). Las células se mantuvieron a niveles de subconfluencia con renovación del medio cada 3-4 días.

El procedimiento quirúrgico se realizó bajo anestesia general mediante inyección subcutánea de ketamina (50 ng/g), utilizando atipamezol (2,5 ng/g) como reversor anestésico postquirúrgico.

De cada tipo celular, se implantaron  $1 \times 10^6$  neuroesferas en los ratones WT 129/SJV mediante inyección ortotópica en la glándula suprarrenal izquierda, por abordaje intraperitoneal a través de laparotomía transversa supraumbilical. Para el acce-

so a la región retroperitoneal y zona suprarrenal, se exteriorizó la cámara gástrica y asas de intestino delgado, y se desplazó el bazo hacia la línea media. Se utilizaron suturas absorbibles de 7/0 para la ligadura de sangrados capilares puntiformes en el mesenterio o en la pared abdominal. Tras la confirmación de una adecuada hemostasia, se procedió al cierre de la cavidad abdominal por planos, con suturas absorbibles de 6/0 y 5/0. Se realizó una sutura intradérmica con material absorbible de 5/0 para el cierre del plano cutáneo.

Se hizo seguimiento clínico diario postquirúrgico de todos los animales hasta su sacrificio a las 4 semanas de la inyección, realizándose posteriormente la necropsia mediante el mismo abordaje quirúrgico intraabdominal al descrito en el proceso del implante, en todos los casos.

Se valoró la existencia de tumor mediante estudio anatómico macroscópico de la cavidad abdominal.

Se realizó extirpación de la glándula suprarrenal izquierda, y parte de la pieza tumoral se fijó en formaldehído (10%) y se incluyó en parafina, para la posterior tinción con hematoxilina-eosina (HE) para el estudio anatomopatológico microscópico en microscopio de luz.

El resto del tumor se procesó para la detección del infiltrado leucocitario (CD45<sup>+</sup>) y estudio de las subpoblaciones linfocitarias mediante la realización de citometría de flujo (FACS Canto II, Beckton Dickinson) y para el estudio de la expresión génica de mediadores moleculares del microambiente tumoral: *CTLA-4* y *PD-1*, mediante qRT-PCR (*“quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction”*).

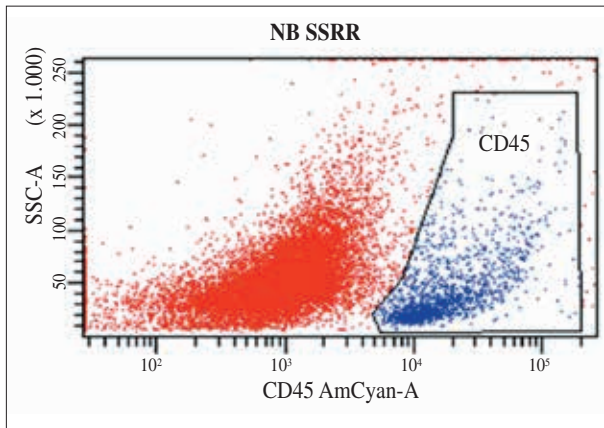
Por último, se realizó citometría de flujo (FACS Canto II, Beckton Dickinson) en bazo, médula ósea y sangre periférica para la investigación de metástasis.

## RESULTADOS

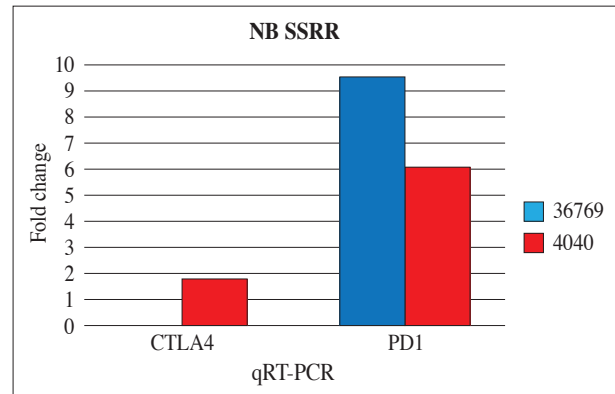
En todos los casos ( $n=8$ ) se consiguió el implante celular sobre la glándula suprarrenal izquierda por abordaje intraperitoneal, mediante laparotomía transversa izquierda en 6/8 animales, y ampliada a línea media en los 2/8 casos restantes.

En todos los procedimientos se observó la existencia de un “habón” sobre la glándula suprarrenal durante la inyección, sin objetivarse extravasaciones a cavidad abdominal, por lo que no se requirieron inyecciones adicionales en ningún caso. No se observaron complicaciones hemorrágicas, ni lesiones de órganos vecinos durante los implantes suprarrenales. Los 8 ratones sobrevivieron al trasplante ortotópico de células de neuroblastoma. No se constató ningún caso de hemorragia intraabdominal, como complicación postoperatoria, confirmando un curso postoperatorio favorable en todos los animales, durante las 4 semanas de seguimiento.

En el momento del sacrificio, se confirmó un buen estado clínico de los ratones, y en ningún caso se palpó tumoración abdominal o en el dorso, en la zona lumbar. La herida quirúrgica presentaba buen aspecto, sin signos de infección, y con reabsorción de la sutura en 7/8 casos. En un ratón se observó



**Figura 1.** Imagen que muestra la cuantificación de las subpoblaciones inmunitarias CD45, mediante citometría de flujo. Disgregado celular tumoral procedente de tumor suprarrenal izquierdo extraído de un ratón del grupo 4040 TH-MYCN<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup>.



**Figura 2.** Gráfico en el que se representan los niveles de expresión génica de las moléculas CTLA-4 y PD-1 del microambiente tumoral, mediante cuantificación con qRT-PCR. Se demuestra expresión génica de CTLA-4 en la línea 4040-THMYCN<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup>, y del receptor PD-1 en ambas líneas celulares: 4040-THMYCN<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup> y 36769-THMYCN<sup>+</sup>.

una pequeña dehiscencia superficial en el margen lateral de la incisión, con un adecuado cierre de los planos profundos de la pared abdominal.

En todos los casos se confirmó macroscópicamente la existencia de tumor en la glándula suprarrenal izquierda, observando masas de mayores dimensiones y más vascularizadas en el grupo en el que se implantó la línea celular 4040; evidenciándose extensión retroperitoneal hasta la línea media en 3 de ellos.

No se evidenciaron lesiones sospechosas de NB en ningún otro órgano abdominal en el estudio anatómico macroscópico.

Los estudios anatomopatológicos microscópicos confirmaron la existencia de neuroblastoma en todas las piezas tumorales extirpadas, consistentes en infiltraciones de neuroblastos en distinto grado de diferenciación neuronal con escaso estroma schwanniano y alto índice de cariorrexis.

La citometría de flujo demostró infiltración leucocitaria tumoral en todos los tumores. La figura 1 muestra un ejemplo de la cuantificación del infiltrado inmune de los tumores.

Se detectó un número ínfimo de células tumorales en médula ósea y sangre periférica en todos los ratones trasplantados, y en bazo, en 2/4 de los animales del grupo 4040-TH-MYCN<sup>+</sup>.

Se detectaron niveles de expresión génica de PD-1 en todos los tumores, y de CTLA-4 en los generados a partir de la línea celular 4040; como muestra la figura 2.

## DISCUSIÓN

El NB, uno de los tumores más frecuentes entre la población pediátrica, cuenta aún con una mortalidad inaceptable en los casos metastásicos, a pesar de la aplicación de nuevos protocolos de quimioterapia, radioterapia o trasplante de médula ósea. La constatación de la aparición de “tolerancias” a

estos tratamientos, o la elevada toxicidad de los mismos en muchos casos, crea la necesidad del desarrollo de terapias innovadoras complementarias, con otros mecanismos de acción, muy específicos, que minimicen estos riesgos. En este sentido, los tratamientos de inmunoterapia, basados en la activación de la respuesta inmune antitumoral del paciente, han sido ya probados con éxito en muchos tumores en adultos<sup>(3,4,7)</sup>.

En búsqueda de estas nuevas terapias oncológicas en el NB, es necesario el desarrollo de modelos experimentales que permitan la investigación de aspectos genéticos, inmunitarios o moleculares, involucrados en la etiopatogenia del tumor, así como el estudio de posibles cambios a estos niveles ante la aplicación de tratamientos en las fases preclínicas del desarrollo de nuevos fármacos de futura aplicación en los pacientes<sup>(7-9)</sup>.

En este sentido, se dividen en dos grupos principales los modelos animales de NB utilizados en la actualidad: los modelos genéticos y los modelos de trasplante de células de neuroblastoma.

Dentro del primer grupo, se ha desarrollado ampliamente en los últimos 15 años el modelo TH-MYCN: modelo murino transgénico de NB, que reproduce las características genéticas y clínicas del NB de alto riesgo con amplificación de N-MYC, del humano<sup>(7-11)</sup>. Consiste en la obtención de ratones transgénicos TH-MYCN<sup>+</sup> en los que la expresión del oncogén n-MYC está controlada por el promotor del gen de la tirosina-hidroxilasa de la rata, con expresión selectiva en las células precursoras neuronales de origen simpaticoadrenal. Son ratones con tumores espontáneos, de localización en los ganglios de la cadena simpática paraespinal o periadrenal, pero con escasa tendencia a la diseminación metastásica. Histológicamente, se corresponden con tumores con escaso estroma schwanniano y alto índice mitótico, características compartidas con los pacientes con NB metastásicos con amplificación de n-MYC, y con los tumores obtenidos en estos animales.



**Figura 3.** Imagen que muestra necropsia de ratón perteneciente al grupo 4040 TH-MYC<sup>N</sup>/ALK<sup>+</sup>. El asterisco (\*) señala el tumor retroperitoneal originado a partir de la implantación suprarrenal izquierda de 1x10<sup>6</sup> neuroesferas de la línea celular 4040 TH-MYC<sup>N</sup>/ALK<sup>+</sup>.

La principal ventaja de este modelo es la generación de tumores de forma espontánea, en un microambiente tisular y tumoral “adecuado” por asentarse en las localizaciones habituales, y lo más importante, en un huésped inmunocompetente, lo que permite la investigación de aspectos inmunitarios en el tumor o su microambiente<sup>(12,13)</sup>.

Entre las limitaciones más destacadas se encuentran: la escasa localización adrenal, la escasa tendencia metastásica o la baja ratio de generación tumoral, con una penetrancia variable según los fondos genéticos.

En el intento de obviar estas desventajas, han surgido recientemente los modelos de trasplante de líneas celulares de NB, que permiten la generación de tumores en un menor período de tiempo, con mayor número de animales, al no depender de la generación espontánea del tumor. Dentro de este grupo, se han desarrollado distintas opciones en función del origen de la línea celular: células de NB humano, o de origen animal; o según la localización del implante: sobre la glándula adrenal (*trasplante ortotópico*), a nivel subcutáneo (*trasplante ectópico*) o infusión de células tumorales en sangre periférica<sup>(14,15)</sup>.

De todas estas modalidades, la más ventajosa parece la del trasplante *singénico* (células de la misma especie animal y mismo fondo genético) al aplicarse sobre animales immuno-

competentes. También la modalidad *ortotópica* que, aunque de mayor dificultad técnica, permite la generación de tumores de localización adrenal y, por lo tanto, en un microambiente tumoral y tisular apropiados, tal y como se ha demostrado en distintos estudios en los que se han observado tumores de mayores dimensiones, más vascularizados y con diferentes subpoblaciones leucocitarias a los ectópicos de localización subcutánea<sup>(9,16)</sup>.

Con este trabajo, hemos podido desarrollar este modelo de trasplante *singénico* de NB (ratones donantes y receptores de mismo fondo genético: 129/SVJ) y *ortotópico* (implante en glándula adrenal), de células procedentes del modelo murino transgénico TH-MYC<sup>N</sup>. Hemos podido generar así los tumores de mayor interés, en las condiciones más deseables en el contexto experimental: NB con amplificación n-MYC, y por lo tanto los más agresivos, suprarrenales, y asentados en huéspedes inmunocompetentes. Estas condiciones nos han permitido el estudio de la infiltración leucocitaria, de la expresión de moléculas participantes de la respuesta inmune antitumoral, o de la interacción entre el tumor y su microambiente<sup>(9,10,12,15,17)</sup>.

Se pudieron vencer los aspectos de mayor dificultad, como el cultivo y expansión *in vitro* de neuroesferas de neuroblastoma siguiendo los protocolos seguidos por otros autores en publicaciones recientes, y que fueron exitosos también en nuestro caso, permitiendo el implante de 1x10<sup>6</sup> células tumorales en cada animal, según se describe en los mismos<sup>(18,19)</sup>.

En cuanto al procedimiento quirúrgico, se han descrito distintos abordajes: retroperitoneal, intraperitoneal o punciones ecoguiadas, según la experiencia de cada grupo. En nuestro caso, se optó por el abordaje intraperitoneal mediante laparotomía transversa, lo que nos permitió una adecuada y segura accesibilidad, con la consecución de implante celular sobre la glándula suprarrenal, sin complicaciones hemorrágicas, ni daño de órganos vecinos, y con una buena recuperación postquirúrgica en todos los animales.

En relación al estudio de las piezas tumorales, se comprobó que las características histológicas correspondían a las de los tumores metastásicos humanos con amplificación n-myc, y a los descritos en el modelo transgénico THMYC<sup>N</sup>: con una elevada infiltración neuroblástica, escaso estroma y alto índice mitótico<sup>(11,13)</sup>.

El estudio celular y molecular de los neuroblastomas, se focalizó en la valoración de existencia de poblaciones celulares inmunes (CD45<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo, y en la expresión de moléculas reconocidas como reguladoras del sistema inmune antitumoral (CTLA-4 y PD-1), mediante qRTPCR, siguiendo el segundo objetivo de nuestro estudio, en relación a la investigación de la inmunidad tumoral<sup>(10,17,20)</sup>.

Este interés se basó en el hecho de que el conocimiento de la respuesta inmunitaria en el neuroblastoma, mediante el estudio de las poblaciones celulares del sistema inmune que pueblan el tumor, es vital para el desarrollo de tratamientos que potencian esta inmunidad antitumoral “natural”, como la viroterapia oncolítica o la inmunoterapia adoptiva mediante la infusión de TILS (*tumor infiltrating lymphocytes*), y que se

incluyen dentro de las principales líneas actuales de investigación en el tratamiento del neuroblastoma<sup>(3,5,21,22)</sup>.

Por otro lado, la demostración de la importancia del microambiente tumoral en el estado de esta respuesta inmune, mediante la expresión de moléculas que modulan pasos críticos del ciclo inmune en el cáncer, ha promovido la investigación de tratamientos reguladores de la función de estos mediadores, como CTLA-4 que inhibe la activación (“*priming*”) de los linfocitos T, o el receptor PD-1: que disminuye su respuesta citotóxica en el tumor. Estas terapias denominadas “*check-point inhibitors*”, se incluyen junto a la inmunoterapia, en las denominadas “*targeted therapies*” (“*terapias diana*”), que son objeto primordial de la investigación actual en el tratamiento del neuroblastoma o de otros tumores en niños y adultos<sup>(6,20,23,24)</sup>.

La necesidad de investigaciones sobre el sistema inmunitario en el NB, como en otros tumores pediátricos, se justifica además, por la peculiaridad de que las mutaciones o cambios epigenéticos que influyen en su etiopatogenia y pronóstico, acontecen en un corto período de tiempo, en muchos casos en la etapa intrauterina y, por lo tanto, en pacientes con un sistema inmune aún “virgen”, a diferencia de lo que ocurre en adultos en los que en el origen del cáncer influyen mutaciones ocurridas a lo largo de los años, en el contexto de un sistema inmunitario “sensibilizado” con multitud de antígenos. Ante esta situación, es probable que la función inmune o los factores que la regulan, como los que influyen en su interacción con el microambiente del tumor, sean diferentes en los tumores pediátricos con respecto a los de adultos, y justifiquen en cierta medida la distinta respuesta a las diferentes modalidades de inmunoterapia en una u otra población<sup>(23)</sup>.

Es importante señalar también, en relación al interés del estudio del inmunofenotipo tumoral, la influencia de las características del infiltrado inmune tumoral en la respuesta a ciertos tratamientos de inmunoterapia. Así, se ha visto que los tratamientos anti-PD-1 son eficaces solo en aquellos tumores en los que hay una importante infiltración de linfocitos T citotóxicos, demostrándose refractariedad a los mismos en los que existe poca infiltración de esta subpoblación linfocitaria<sup>(6,25)</sup>.

Uno de los aspectos de discusión en los experimentos publicados sobre trasplante de líneas celulares de NB es precisamente la distinta agresividad tumoral en cuanto al crecimiento local y vascularización; o diferencias en el inmunofenotipo y expresión molecular tumoral y de su microambiente, en función del distinto tipo de línea celular tumoral<sup>(9,14)</sup>. En cierto modo, hemos podido detectar a nivel anatómico estas diferencias, ya que se evidenciaron neuroblastomas de mayores dimensiones y más vascularizados, en los ratones trasplantados con la línea celular 4040 THMYCN<sup>+</sup>/ALK<sup>+</sup><sup>(26)</sup>.

Como conclusión, y basándonos en nuestros resultados, podemos concluir que la implantación ortotópica de neuroferas de NB en ratones singénicos inmunocompetentes nos ha permitido generar un modelo de NB en el que ha sido posible estudiar la inmunidad tumoral y mediadores moleculares del microambiente que apuntan a un estado de tolerancia protumoral.

## AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Louis Chesler, Royal Marsden NHS Foundation Trust, London.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 289-97.
2. London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, et al. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 3286-92.
3. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010; 362: 2202-11.
4. Moreno L, Chesler L, Hargrave D, Eccles SA, Pearson AD. Pre-clinical drug development for childhood cancer. *Expert Opin Drug Discov*. 2011; 6: 49-64.
5. Ramirez M, Garcia-Castro J, Alemany R. Oncolytic virotherapy for neuroblastoma. *Discov Med*. 2010; 10: 387-93.
6. Ramsay AG. Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity. *Br J Haematol*. 2013; 162: 313-25.
7. Kiyonari S, Kadomatsu K. Neuroblastoma models for insights into tumorigenesis and new therapies. *Expert Opin Drug Discov*. 2015; 10: 53-62.
8. Chesler L, Weiss WA. Genetically engineered murine models--contribution to our understanding of the genetics, molecular pathology and therapeutic targeting of neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 2011; 21: 245-55.
9. Teitz T, Stanke JJ, Federico S, Bradley CL, Brennan R, Zhang J, et al. Preclinical models for neuroblastoma: establishing a baseline for treatment. *PLoS One*. 2011; 6: e19133.
10. Cheng AJ, Cheng NC, Ford J, Smith J, Murray JE, Flemming C, et al. Cell lines from MYCN transgenic murine tumours reflect the molecular and biological characteristics of human neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 1467-75.
11. Moore HC, Wood KM, Jackson MS, Lastowska MA, Hall D, Imrie H, et al. Histological profile of tumours from MYCN transgenic mice. *J Clin Pathol*. 2008; 61: 1098-103.
12. Robinson M, Li B, Ge Y, Ko D, Yendluri S, Harding T, et al. Novel immunocompetent murine tumor model for evaluation of conditionally replication-competent (oncolytic) murine adenoviral vectors. *J Virol*. 2009; 83: 3450-62.
13. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *Embo J*. 1997; 16: 2985-95.
14. Daudigeos-Dubus E, L LED, Rouffiac V, Bawa O, Leguerney I, Opolon P, et al. Establishment and characterization of new orthotopic and metastatic neuroblastoma models. *In Vivo*. 2014; 28: 425-34.
15. Khanna C, Jaboin JJ, Drakos E, Tsokos M, Thiele CJ. Biologically relevant orthotopic neuroblastoma xenograft models: primary adrenal tumor growth and spontaneous distant metastasis. *In Vivo*. 2002; 16: 77-85.

16. Kroesen M, Brok IC, Reijnen D, van Hout-Kuijjer MA, Zeelenberg IS, Den Brok MH, et al. Intra-adrenal murine TH-MYCN neuroblastoma tumors grow more aggressive and exhibit a distinct tumor microenvironment relative to their subcutaneous equivalents. *Cancer Immunol Immunother.* 2015; 64: 563-72.
17. Pistoia V, Morandi F, Bianchi G, Pezzolo A, Prigione I, Raffaghello L. Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma. *Front Oncol.* 2013; 3: 167.
18. Cao D, Kishida S, Huang P, Mu P, Tsubota S, Mizuno M, et al. A new tumorsphere culture condition restores potentials of self-renewal and metastasis of primary neuroblastoma in a mouse neuroblastoma model. *PLoS One.* 2014; 9: e86813.
19. Liu QX, Tang JY, Cai JY, Yin MZ, Li BS. The cultivation and identification of tumor stem cells from neuroblastoma derived tumor spheres. *Chin J Cancer.* 2010; 29: 1012-7.
20. Carlson LM, De Geer A, Sveinbjornsson B, Orrego A, Martinsson T, Kogner P, et al. The microenvironment of human neuroblastoma supports the activation of tumor-associated T lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2013; 2: e23618.
21. Melen GJ, Franco-Luzon L, Ruano D, Gonzalez-Murillo A, Alfranca A, Casco F, et al. Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. *Cancer Lett.* 2016; 371: 161-70.
22. Pesonen S, Kangasniemi L, Hemminki A. Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data. *Mol Pharm.* 2011; 8: 12-28.
23. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013; 39: 1-10.
24. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2015: 669-82.
25. Kodumudi KN, Siegel J, Weber AM, Scott E, Sarnaik AA, Pilon-Thomas S. Immune Checkpoint Blockade to Improve Tumor Infiltrating Lymphocytes for Adoptive Cell Therapy. *PLoS One.* 2016; 11: e0153053.
26. Berry T, Luther W, Bhatnagar N, Jamin Y, Poon E, Sanda T, et al. The ALK(F1174L) mutation potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Cell.* 2012; 22: 117-30.