

Proyecto VyDA: Definición de nuevas dianas terapéuticas en Angiosarcoma a través de una plataforma colaborativa entre grupos de investigación, pacientes y asociaciones de pacientes.

Investigador principal coordinador: Javier Martín Broto
Co-Investigador principal: Mario de Jesús Pérez Jiménez
Co-investigador principal: David da Silva Moura
Co-investigador principal: Luis Valencia Cabrera
Co-investigador principal: Nadia Hindi Muñiz
Co-investigador principal: Agustín Riscos Núñez
Investigador principal en Hospital Universitario Virgen del Rocío:

Background

El Angiosarcoma representa un grupo raro de tumores malignos muy agresivos, que se originan en células endoteliales linfáticas o vasculares [1], y representan menos del 2% de todos los sarcomas de tejidos blandos (SPB). El Angiosarcoma puede generarse en cualquier lugar del cuerpo, presentándose más comúnmente como una enfermedad cutánea (alrededor del 60% de los casos), que afecta particularmente a cabeza y cuello, pudiendo también afectar órganos viscerales, huesos y retroperitoneo [2]. Pueden desarrollarse a cualquier edad, pero afectan principalmente a pacientes adultos y ancianos. El Angiosarcoma tiene una alta tasa de recurrencia local y de metástasis, asociándose con un mal pronóstico junto con opciones limitadas de tratamiento. La supervivencia global (SG) varía entre 6 y 16 meses [3]. Además, debido a la inespecificidad de los síntomas, es difícil distinguir el Angiosarcoma de otros tumores malignos como los carcinomas epiteliales, por lo que el diagnóstico sigue siendo un desafío. Histológicamente, el Angiosarcoma se caracteriza por células endoteliales anormales, pleomórficas, malignas, que pueden ser redondeadas, poligonales o fusiformes, y pueden tener una apariencia epitelioide con expresión de antígenos vasculares y endoteliales por inmunohistoquímica, incluido el factor- VIII, CD31 (PECAM1), CD34 y VEGF [4]. Por lo tanto, el examen histológico es relevante y se requiere confirmación por inmunohistoquímica [1].

La cirugía radical seguida de radioterapia adyuvante es la modalidad de tratamiento óptima actual, mientras que la quimioterapia se utiliza con frecuencia para tratar casos localmente

avanzados y metastásicos. Sin embargo, la duración de la respuesta suele ser limitada y la mayoría de los pacientes finalmente sucumben y desarrollan enfermedad metastásica [5]. Teniendo en cuenta el diagnóstico tardío, el mal pronóstico y las opciones de tratamiento limitadas, existe una necesidad urgente de nuevos estudios para mejorar el tratamiento y la supervivencia de dichos pacientes. Visto el origen vascular y endotelial de estos tumores, es de gran interés el papel de la angiogénesis y de los factores angiogénicos. Los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR) y sus ligandos pueden sobreexpresarse en el Angiosarcoma. Se ha descrito que VEGF-A esta sobreexpresado en Angiosarcoma [6], y su expresión se correlaciona con VEGFR-1; VEGFR-2 se correlaciona con pronóstico, ya que la pérdida de expresión se asocia significativamente con un pronóstico desfavorable; La expresión de VEGFR-1 y VEGFR-3 no se asocia significativamente con el pronóstico [7]. De todos modos, el aumento de la expresión de citoquinas angiogénicas como el VEGF y sus receptores, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el sistema de angiopoyetina no son exclusivos del Angiosarcoma y se han reportado en otros cánceres, incluido el SPB [8]. Se han utilizado, por tanto, terapias antiangiogénicas para el Angiosarcoma, y los datos de los ensayos clínicos muestran una actividad prometedora del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-VEGF-A bevacizumab y de inhibidores de tirosina quinasa de amplio espectro contra los receptores de VEGF [9]. De todos modos, no ha habido ensayos clínicos fase 3 y los ensayos fase 2 son escasos para confirmar la actividad de estas terapias en Angiosarcomas. Por lo tanto, las terapias biológicas, en particular las terapias antiangiogénicas, ofrecen esperanzas para el tratamiento del Angiosarcoma, pero se necesitan más estudios para dilucidar las estrategias de tratamiento [9].

Además, algunas evidencias subrayan el valor de la inmunoterapia como un tratamiento prometedor para el Angiosarcoma [10] ya que algunas publicaciones han demostrado la actividad de inhibidores de anti-PD-1 en Angiosarcoma cutáneo y visceral [10]. La actividad de estas terapias se basa en el hecho de que las células tumorales pueden utilizar los puntos de control inmunológico (por ejemplo, PD-1) para evadir el sistema inmunitario antitumoral y de este modo facilitar el crecimiento tumoral. En línea con esto, se están desarrollando varias terapias de control inmunológico que actúan bloqueando o estimulando estas vías para mejorar la actividad inmunológica contra los tumores. Por otra parte, la relevancia de la inmunosupresión en el Angiosarcoma está fuertemente apoyada por el hecho de que la

sobreexpresión de la vía del VEGF desencadena la inmunosupresión [11,12]. En consecuencia, el tratamiento antiangiogénico puede ser una modalidad eficaz para potenciar la inmunoterapia [13], hecho que viene siendo testado en algunos estudios clínicos actualmente en desarrollo (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03277924). Sin embargo, el microambiente inmunológico tumoral de los sarcomas no se comprende en su totalidad, y el papel del sistema inmunológico en la patogenia del Angiosarcoma sigue sin describirse, lo que apoya el desarrollo de nuevos estudios con el objetivo final de mejorar la caracterización del microambiente inmunológico en Angiosarcoma. Estudios de este género pueden ayudar a describir los efectos en el microambiente inmunológico de las opciones terapéuticas actualmente disponibles, al tiempo que se generan nuevas modalidades de tratamiento. En realidad, son fundamentales y necesarios nuevos conocimientos para revelar nuevas hipótesis que aborden la repolarización del entorno tumoral inmunosupresor hacia un fenotipo antitumoral. Los tumores inducen cambios en la proliferación, diferenciación y función de las células inmunitarias a través de la secreción de moléculas, como citoquinas y quimioquinas. Estos factores solubles influyen en las interacciones célula-célula y célula-matriz, la neovascularización y también el resultado terapéutico de diversos tratamientos contra el cáncer [14, 15].

Además, se sabe poco sobre la patogenia del Angiosarcoma. Se han descrito mutaciones genéticas en genes como *MYC*, *FLT4*, *KDR*, *PLCG1* y *PTPRB* [16, 17], y la evidencia sugiere también la implicación de los miARN en la patogénesis del Angiosarcoma [18]. Sin embargo, la comprensión incompleta de los mecanismos patogénicos ha bloqueado el desarrollo de nuevos tratamientos en sarcomas. Para superar este problema, se estableció recientemente una plataforma, Angiosarcoma Project (<https://ascproject.org>), en los Estados Unidos y Canadá, para la adquisición de registros médicos y muestras biológicas (tumor, saliva y sangre), para la realización de un análisis de exoma completo en tumores y en línea germinal. Este proyecto ha permitido además que los datos clínicos y genómicos anonimizados se compartieran en bases de datos públicas. Todos estos procedimientos se han realizado con el consentimiento informado de los pacientes y permitió identificar varias mutaciones que podrían ser relevantes en la progresión de la enfermedad y desarrollar nuevos tratamientos. Los datos de este proyecto se pueden encontrar en la página web de cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>). Sin embargo, este proyecto está restringido a

Estados Unidos de América y Canadá, y no es posible la participación de pacientes españoles con Angiosarcoma.

En general, para investigación, no hay disponibles datos exhaustivos sobre mutaciones de expresión génica o de perfiles de factores solubles en pacientes con Angiosarcoma. De este modo, son necesarios estudios con series largas de muestras tumorales para determinar las alteraciones genómicas que pueden ser dianas terapéuticas, así como biomarcadores pronósticos y/o predictivos en Angiosarcoma. Además, describir los perfiles de expresión génica en los pacientes con Angiosarcoma permitirá una mejor caracterización de los componentes celulares y acelulares del microambiente tumoral de Angiosarcoma, así como las interacciones homotípicas y heterotípicas entre estos componentes. Perfilar los niveles de expresión de citoquinas y quimioquinas ayudará a comprender la comunicación entre las células tumorales y los otros componentes celulares y acelulares del microambiente, y cómo estas interacciones pueden afectar la respuesta inmune antitumoral. La idea de este proyecto es juntar un grupo de investigación con gran experiencia y conocimientos en la investigación del sarcoma, con pacientes y asociaciones de pacientes (Asociación Vyda) para desarrollar un proyecto traslacional con el objetivo de recolectar, con el consentimiento informado de los pacientes, muestras de tumor y de sangre con el objetivo final de mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con Angiosarcoma.

Objetivos

La hipótesis de nuestro estudio es que una descripción completa del transcriptoma y de los perfiles mutacionales, y especialmente la caracterización de las intercomunicaciones homotípicas / heterotípicas entre los componentes celulares y acelulares de la TME mejorará la comprensión de las vías de señalización implicadas en la sarcomatogénesis de la biología del Angiosarcoma. Además, esta caracterización ayudará a definir nuevas dianas terapéuticas en una enfermedad rara para la cual se necesitan urgentemente de nuevos ensayos clínicos, al tiempo que se definen nuevos biomarcadores predictivos de respuesta a estos nuevos tratamientos.

Por tanto, los principales objetivos son:

1. Construir un biobanco de muestras de Angiosarcoma (es decir, bloques de parafina).
2. Fomentar la interacción entre los grupos de investigación académica del sarcoma y los grupos de pacientes / asociaciones de pacientes.
3. Evaluar la expresión génica y el perfil mutacional de pacientes con Angiosarcoma en bloques de parafina de tumor recolectados al diagnóstico.
4. Describir biomarcadores pronósticos y/o predictivos en Angiosarcoma, correlacionando la expresión génica y/o los perfiles mutacionales con los resultados clínicos y de supervivencia.
5. Desvelar nuevos mecanismos de sarcomatogénesis en Angiosarcoma.
6. Caracterizar las interacciones homotípicas y heterotípicas entre las células tumorales y los demás componentes celulares y acelulares de la TME.
7. Evaluar la expresión de los niveles de proteína de factores solubles en muestras de plasma y correlacionarla con los datos de supervivencia y otros parámetros clínicos.
8. Presentar fundamentos robustos para el desarrollo de ensayos clínicos en Angiosarcoma, mediante la descripción de nuevas dianas terapéuticas en este subtipo poco común de SPB.

Metodología

Biobanco:

Las muestras tumorales (bloques de parafina y sangre periférica) serán enviadas al laboratorio central donde serán registradas en una base de datos y almacenadas en óptimas condiciones de temperatura y humedad.

Se utilizarán tubos de EDTA (16 ml) para la extracción de ADN/ARN y para el análisis de mutaciones en línea germinal.

El plasma y las PBMC se separarán de la sangre periférica (8 ml de sangre periférica en un tubo con EDTA), siguiendo un protocolo Ficoll-Paque y se almacenarán a -80°C.

La biocolección del biobanco se inscribirá en el registro nacional del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Todas las muestras se recolectarán con un consentimiento informado firmado por los pacientes donantes.

Las muestras se utilizarán para el propósito del proyecto y el tejido/material restante se guardará en el biobanco.

Las muestras pueden destruirse o devolverse al paciente si así lo solicita.

Se creará un registro online, siguiendo las leyes nacionales, para recopilar datos clínicos y muestras de pacientes.

Laboratorio central:

David da Silva Moura

Proyecto 6

CITIUS III - Edificio Manuel Losada Villasante

Universidad de Sevilla

C/ Doctor Rafael Martínez Domínguez s/n

41013 - Sevilla

Perfiles de expresión genética:

El perfil de expresión génica se determinará mediante el ensayo HTG Molecular Whole Transcriptome Panel (WTP) (HTG Molecular; Tucson, AZ, EE. UU.), usando bloques de parafina. Este nuevo panel contiene más de 20.000 transcritos, que cubren todos los genes asociados con la biología tumoral y todas las vías de señalización celular tumorigénicas conocidas. Los bloques tumorales serán representativos del momento del diagnóstico inicial. Los datos clínicos también serán recopilados, ya sea por investigadores asociados al proyecto o por los pacientes en el registro online.

Todas las muestras tumorales serán revisadas por un patólogo experto en Angiosarcoma antes de ser utilizadas para transcriptómica, con el fin de confirmar el diagnóstico.

Para el ensayo de WTP, se utilizará una sección de 1,5 μm del bloque tumoral colocada en un portaobjetos. Los datos obtenidos de la secuenciación de próxima generación (NGS) se analizarán utilizando el software HTG EdgeSeq y los resultados se representarán en términos de Log2 del número de copias de los transcritos. El análisis bioinformático se realizará correlacionando la expresión génica con los resultados clínicos, como la supervivencia global (SG), la supervivencia libre de progresión (SLP) a las líneas de tratamiento, la tasa respuesta a los tratamientos (ORR) y el intervalo libre de metástasis (MFI), para describir biomarcadores pronósticos y/o predictivos. El análisis se actualizará continuamente en lotes de 24 muestras. Se propondrá una firma pronóstica o predictiva basada en el perfil de expresión génica. Las vías de señalización celular diferencialmente alteradas se determinarán utilizando datos de expresión génica diferencial, calculando sus valores de activación con la herramienta de análisis de inferencia de vías de alto rendimiento (hiPathia). Finalmente, los conjuntos de datos de expresión se compartirán libremente en el repositorio de cBioPortal.

Perfil de alteraciones génicas:

El panel *Oncomine Comprehensive Assay Plus* (ThermoFisher) proporciona una cobertura completa que cubre más de 500 genes asociados a diferentes enfermedades y se utilizará para detectar posibles mutaciones puntuales, deleciones, SNP o variaciones en el número de copias, o genes de fusión, que pueden estar relacionados con el desarrollo del Angiosarcoma o con su pronóstico. Además, permitirá el análisis de biomarcadores multigénicos complejos para firmas mutacionales, incluida la carga mutacional tumoral (TMB) y la inestabilidad de microsatélites (MSI).

Los perfiles mutacionales y de expresión génica se incluirán en los mismos modelos pronósticos o predictivos testados en el análisis bioinformático.

Las muestras de tumores, así como las muestras de sangre periférica (análisis de la línea germinal) se utilizarán con el propósito de analizar este perfil mutacional.

El análisis se actualizará continuamente en lotes de 24 muestras.

Finalmente, los conjuntos de datos de expresión de datos se compartirán libremente en el repositorio de cBioPortal.

Perfil de factores solubles: ProcartaPlex Immunoassay:

La expresión de factores solubles será evaluada en muestras de plasma con el Immune Monitoring 65-Plex Human Panel ProcartaPlex Immunoassay (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo del fabricante. Este panel permite la medición simultánea de hasta 65 proteínas solubles. El ensayo ProcartaPlex utiliza la tecnología Luminex xMAP (perfil multianálisis) para la detección y cuantificación simultáneas de proteínas solubles en 20 µL de plasma.

La expresión de factores solubles se correlacionará con los perfiles genéticos y mutacionales y los datos clínicos. Se diseñará un modelo integral que utilice los 3 conjuntos de datos para los resultados de supervivencia (transcriptoma, exoma y expresión de factores solubles).

El análisis se actualizará continuamente en lotes de 24 muestras.

Modelos matemáticos de predicción:

Por otra parte, con el fin de reforzar las evidencias de correlación en Angiosarcoma, entre la expresión del VEGF y la del ligando de muerte programada PD-L1, se desarrollará un modelo matemático (basado en un paradigma computacional bioinspirado)[19,20] de rutas señalizadoras en las que intervengan las proteínas antes indicadas.

Para ello, se combinará el conocimiento existente sobre rutas generalistas involucrando el receptor EGFR, ligandos asociados y otros posibles elementos involucrados con la información resultante de los perfiles mutacionales y de expresión antes mencionados, con el objetivo de crear un modelo basado en sistemas de membranas (P systems) multicompartimentales, en su variante estocástica, que permita contrastar las hipótesis formuladas acerca de la dinámica de la concentración de las diversas componentes celulares ante escenarios de interés, como puede ser la ausencia de tratamiento o al actuar sobre ciertas posibles dianas terapéuticas identificadas durante el proyecto.

Para trabajar con los modelos de sistemas P diseñados, se necesitará contar con la información sobre las constantes cinéticas asociadas a las reacciones entre los componentes celulares involucrados, que se dispondrán en el modelo dentro de una estructura de compartimentos adecuada para modelizar las principales interacciones entre los receptores, ligandos y otros elementos de interés. Además, para el planteamiento de experimentos concretos a partir del modelo, se requerirá la provisión de concentraciones iniciales para los elementos involucrados, y se estudiará la evolución del sistema en su conjunto a partir de esa situación de partida, ante distintos posibles estímulos (por ejemplo, ante la ausencia de tratamiento, o ante la aplicación de un cierto tratamiento que actúe sobre un elemento del sistema, como un ligando o receptor, entre otros, alterando su comportamiento). Para la experimentación con estos modelos bioinspirados se hará uso de simuladores que hagan uso del algoritmo multicompartimental de Gillespie.

Por otro lado, para la construcción de los modelos predictivos en los tres niveles comentados en los apartados anteriores se explorará el empleo de distintas técnicas matemático-computacionales y de Inteligencia Artificial, enmarcadas dentro del campo de la Ciencia del Dato. Estas técnicas empleadas se organizarán en un flujo de trabajo que involucre

desde la importación, organización, limpieza y tratamiento de datos hasta el diseño y evaluación de los modelos (conllevando a su vez ingeniería de características, técnicas de remuestreo, ajuste de hiperparámetros o selección de métricas adecuadas, entre otros mecanismos). Para el desarrollo de estas técnicas se empleará el lenguaje estadístico R y, esencialmente, los ecosistemas proporcionados por los paquetes tidyverse y tidymodels.

En particular, tras importar los datos disponibles de diversas fuentes en R, se llevará a cabo una fase exhaustiva de tratamiento y análisis y visualización de datos (haciendo uso fundamentalmente de paquetes del ecosistema tidyverse como dplyr, tidyr o ggplot2, entre otros). A continuación, se estudiará la idoneidad del empleo de modelos de *Deep learning* que permitan comprender la relación entre las potenciales variables de salida (SG, SLP, ORR o MFI) en función de los datos clínicos de los pacientes, datos de perfiles génico, mutacional y de factores solubles y toda información relacionada que pueda aportar valor como entrada del sistema. Una vez se disponga de los datos resultantes de los procesos descritos anteriormente (obtención del biobanco, de los distintos perfiles y, en menor medida, del estudio de las rutas señaladoras), se plantearán alternativas de modelos basados en técnicas como redes neuronales artificiales de distintos tipos, o como las técnicas de *bagging* y *boosting* (random forest o XGBoost, respectivamente), entre otras. Además, dada la naturaleza heterogénea de los tipos de datos a manejar como entrada de los modelos, se explorará la aplicación de modelos híbridos que puedan combinar de manera efectiva la información inherente a los datos, de forma que se pueda extraer el mayor conocimiento posible y dé así lugar a modelos con mayor capacidad tanto explicativa como predictiva.

Dentro de este proceso de modelización se empleará fundamentalmente el ecosistema tidymodels, facilitando diversos pasos de ingeniería de características mediante su paquete recipes, la especificación de modelos a través de parsnip, la aplicación de diversas técnicas de muestreo y remuestreo usando rsample. Todo ello se integrará mediante el paquete workflows en un flujo que aplique de forma efectiva todos los pasos necesarios de entrenamiento para la construcción del modelo y predicción a partir de datos de prueba. Además, para llevar a cabo la evaluación de los modelos se emplearán técnicas de validación cruzada y tuning de hiperparámetros, empleando además de los anteriores paquetes como

tune, dials o yardstick (este último para establecer qué métricas obtener durante el proceso de evaluación).

El objetivo último de los modelos anteriores será el de tratar de predecir las posibles salidas ya mencionadas como supervivencia global (SG), libre de progresión, respuesta a tratamientos o intervalo libre de metástasis, a partir de una entrada de un paciente con una muestra, una cierta situación clínica, unos datos de perfiles obtenidos de la muestra y, potencialmente, un tratamiento propuesto.

Plan estadístico:

Para las variables que siguen distribuciones binomiales y variables categóricas, se calcularán las frecuencias y los porcentajes. La SG y la SLP se medirán desde la fecha del diagnóstico (SG) o desde la fecha del tratamiento inicial hasta el evento final, y se estimarán de acuerdo con el método de Kaplan-Meier. Las asociaciones entre las variables de interés (es decir, expresión génica, mutaciones o expresión de factores solubles y resultados clínicos) se realizarán mediante la prueba de Log-Rank. El análisis multivariado utilizará variables que sean significativas en el análisis univariante y se realizará de acuerdo con el modelo de regresión de Cox. Todos los p-valores informados serán de dos caras y la significación estadística se definirá en $p < 0,05$. El paquete de software utilizado para el análisis estadístico será el SPSS Statistics (versión 26).

References

1. Cao, J., et al., *Angiosarcoma: a review of diagnosis and current treatment*. Am J Cancer Res, 2019. **9**(11): p. 2303-2313.
2. Khan, J.A., R.G. Maki, and V. Ravi, *Pathologic Angiogenesis of Malignant Vascular Sarcomas: Implications for Treatment*. J Clin Oncol, 2018. **36**(2): p. 194-201.
3. Buehler, D., et al., *Angiosarcoma outcomes and prognostic factors: a 25-year single institution experience*. Am J Clin Oncol, 2014. **37**(5): p. 473-9.
4. Gaballah, A.H., et al., *Angiosarcoma: clinical and imaging features from head to toe*. Br J Radiol, 2017. **90**(1075): p. 20170039.
5. Florou, V. and B.A. Wilky, *Current and Future Directions for Angiosarcoma Therapy*. Curr Treat Options Oncol, 2018. **19**(3): p. 14.
6. Dim, D., et al., *The actin-bundling motility protein fascin and vascular endothelial growth factor (VEGF) are universally over-expressed in human Angiosarcoma*. 2007. **25**(18_suppl): p. 10068-10068.
7. Itakura, E., et al., *Detection and characterization of vascular endothelial growth factors and their receptors in a series of Angiosarcomas*. J Surg Oncol, 2008. **97**(1): p. 74-81.
8. DuBois, S. and G. Demetri, *Markers of angiogenesis and clinical features in patients with sarcoma*. Cancer, 2007. **109**(5): p. 813-9.
9. Young, R.J., et al., *Angiosarcoma*. Lancet Oncol, 2010. **11**(10): p. 983-91.
10. Florou, V., et al., *Angiosarcoma patients treated with immune checkpoint inhibitors: a case series of seven patients from a single institution*. J Immunother Cancer, 2019. **7**(1): p. 213.
11. Huang, Y., et al., *Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy*. Cancer Res, 2013. **73**(10): p. 2943-8.
12. Bagaria, S.P., et al., *Association Between Programmed Death-Ligand 1 Expression and the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Angiosarcoma*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 71.
13. Broto, J.M., et al., *IMMUNOSARC: A collaborative Spanish (GEIS) and Italian (ISG) Sarcoma Groups phase I/II trial of sunitinib plus nivolumab in selected bone and soft tissue sarcoma subtypes—Results of the phase I part*. 2018. **36**(15_suppl): p. 11515-11515.

14. Mukaida, N. and T. Baba, *Chemokines in tumor development and progression*. Exp Cell Res, 2012. **318**(2): p. 95-102.
15. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
16. Murali, R., et al., *Targeted massively parallel sequencing of Angiosarcomas reveals frequent activation of the mitogen activated protein kinase pathway*. Oncotarget, 2015. **6**(34): p. 36041-52.
17. Behjati, S., et al., *Recurrent PTPRB and PLCG1 mutations in Angiosarcoma*. Nat Genet, 2014. **46**(4): p. 376-379.
18. Fujiwara, T., et al., *MicroRNAs in soft tissue sarcomas: overview of the accumulating evidence and importance as novel biomarkers*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 592868.
19. Pérez-Jiménez, M.J. and F.J. Romero-Campero. A Study of the Robustness of the EGFR Signalling Cascade Using Continuous Membrane Systems. In IWINAC 2005. LNCS, 2005. **3561**(1): p. 268-278.
20. Cheruku, S., et al., *Simulating FAS-induced apoptosis by using P systems*. Progress in Natural Science, 2007. **17**(4): p. 424-431.