



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

## GRADO EN MEDICINA

### TRABAJO FIN DE GRADO

**Neuroblastoma: de las terapias convencionales a la  
nanomedicina**

Neuroblastoma: from conventional therapies to  
nanomedicine

**Autor: Fernando Labrador Carrillo**

**Directores:**

**Mónica López Fanarraga**

**Ana Márquez López**

**Santander, Junio 2021**

## Índice

<b>1.-INTRODUCCIÓN. TUMORES PEDIÁTRICOS.....</b>	<b>5</b>
<b>2. NEUROBLASTOMA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Definición y origen del Neuroblastoma .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Clasificación del NB .....</b>	<b>6</b>
2.2.1. Clasificación genética del NB .....	6
2.2.2. Clasificación clínica del NB .....	8
<b>2.3. Manifestaciones clínicas en NB .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4. Enfermedad metastásica .....</b>	<b>10</b>
2.4.1. Importancia de la genética en la metástasis en NB .....	11
2.4.2. ¿Cómo invaden las células del NB la circulación?.....	11
2.4.3. ¿Cómo llegan las células del NB a la médula ósea y al hueso? .....	12
<b>2.5. Diagnóstico del NB .....</b>	<b>13</b>
2.5.1. Pruebas de laboratorio.....	13
2.5.2. Imágenes radiográficas .....	14
2.5.3. Evaluación histológica del tumor: grado de diferenciación del tumor .....	15
<b>3. TRATAMIENTOS ACTUALES EN NEUROBLASTOMA .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Tratamiento según los grupos de riesgo de la INRGSS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Pacientes de muy bajo y bajo riesgo .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Pacientes de riesgo intermedio .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Pacientes de alto riesgo.....</b>	<b>16</b>
3.4.1. Tratamientos basados en Inmunoterapia .....	17
<b>3.5. Tratamiento en las recaídas y en el NB refractario .....</b>	<b>18</b>
3.5.1. Inmunoterapia celular.....	19
3.5.2. Quimioterapia .....	19
3.5.3. Radioterapia con <sup>131</sup> I-MIBG.....	19
3.5.4. Terapias dirigidas molecularmente.....	19
<b>4. NANOMEDICINA .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. ¿Qué es la Nanomedicina? .....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Propiedades y ventajas de los nanomateriales.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3. Tipos de nanopartículas y sus aplicaciones.....</b>	<b>21</b>
4.3.1. Nanopartículas basadas en lípidos.....	22
4.3.2. Nanopartículas poliméricas .....	24
4.3.3. Nanopartículas inorgánicas .....	26
<b>5. ESTUDIOS DE NANOMEDICINA EN NEUROBLASTOMA .....</b>	<b>28</b>
<b>5.1. Terapias no dirigidas. ....</b>	<b>28</b>
<b>5.2. Terapias dirigidas. ....</b>	<b>29</b>
5.2.1. Terapias dirigidas basadas en anticuerpos monoclonales .....	29
5.2.2. Terapias dirigidas basadas en la funcionalización con péptidos .....	30
5.2.3. Terapias dirigidas basadas en el uso de miRNA encapsulado en NP .....	30
5.2.4. Teragnosis del NB utilizando la Nanomedicina .....	31
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>34</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>35</b>

## Resumen

El Neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia y supone un 15% de las muertes por cáncer pediátrico en pacientes menores de 15 años a nivel mundial. Se trata de una enfermedad muy heterogénea tanto a nivel clínico como biológico, lo cual dificulta enormemente su diagnóstico y tratamiento. Además, en un 50% de los casos, la enfermedad cursa de manera muy agresiva y con metástasis, con tumores que se vuelven resistentes a los tratamientos convencionales como son la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia. Por todo ello, es fundamental la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra este tipo de tumor.

Algunas de estas nuevas terapias son la inmunoterapia, las pequeñas moléculas inhibitorias y la nanomedicina. De todas, la nanomedicina ha supuesto la alternativa más novedosa y prometedora gracias a la vehiculización de agentes antitumorales en nanopartículas que van dirigidas con especificidad hacia las células tumorales, mejorando la eficiencia y disminuyendo la toxicidad de los fármacos convencionales.

Gracias a estas nuevas terapias, se ha conseguido un tratamiento más personalizado para los pacientes y se ha logrado un mayor efecto antitumoral, aumentando así la supervivencia de estos pacientes.

Palabras clave: Neuroblastoma, heterogénea, quimioterapia, nanomedicina, nanopartículas, especificidad.

## **Abstract**

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor in childhood and accounts for 15% of deaths from pediatric cancer in patients under 15 years of age worldwide. It is a very heterogeneous disease both at a clinical and biological level, which makes its diagnosis and treatment extremely difficult. In addition, in 50% of cases, the disease occurs very aggressively and with metastasis, with tumors that become resistant to conventional treatments such as surgery, radiotherapy or chemotherapy. Therefore, the search for new therapeutic targets and the development of new therapies directed against this type of tumor is essential.

Some of these new therapies are immunotherapy, small inhibitory molecules, and nanomedicine. Of all of them, nanomedicine has been the most innovative and promising alternative thanks to the vehicle of antitumor agents in nanoparticles that are specifically directed towards tumor cells, improving the efficiency and reducing the toxicity of conventional drugs.

Thanks to these new therapies, a more personalized treatment for patients has been achieved and a greater antitumor effect has been achieved, thus increasing the survival of these patients.

**Key words:** Neuroblastoma, heterogeneous, chemotherapy, nanomedicine, nanoparticles, specificity.

# 1.-INTRODUCCIÓN. TUMORES PEDIÁTRICOS

El cáncer es una enfermedad poco frecuente en la infancia estimándose una incidencia anual de 12 a 14 casos por cada 100.00 habitantes en pacientes menores de 15 años. Sin embargo, los tumores pediátricos siguen siendo una de las principales causas de mortalidad infantil en todo el mundo debido a la gran heterogeneidad que presenta así como a la dificultad de llevar a cabo un diagnóstico temprano. Además, los tratamientos actuales como la cirugía, la radio y la quimioterapia no han mejorado sustancialmente la supervivencia de estos pacientes en los últimos años. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevas terapias dirigidas, más específicas y personalizadas para un tratamiento óptimo de esta enfermedad.

Dentro de los tumores pediátricos, aproximadamente un 40% se corresponden con el diagnóstico de leucemia o linfoma. El 60% restante se corresponde a tumores sólidos, dentro de los cuales encontramos tumores muy agresivos, con gran capacidad de desarrollar metástasis y muy heterogéneos genéticamente. Algunos ejemplos son el osteosarcoma, el Tumor de Wilms, tumores hepáticos y el Neuroblastoma (NB), en el cual nos centraremos en este trabajo por constituir uno de los grupos más abundantes de tumores sólidos pediátricos a nivel mundial.

## 2. NEUROBLASTOMA

### 2.1. Definición y origen del Neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia. Representa aproximadamente entre un 7 y un 10% de los cánceres pediátricos y supone un 15% de las muertes por cáncer pediátrico en pacientes menores de 15 años a nivel mundial. Se trata de una enfermedad extremadamente heterogénea tanto biológica como clínicamente, desde casos donde los tumores sufren regresión espontánea, hasta casos donde la enfermedad cursa de manera muy agresiva y con metástasis y el tumor se vuelve resistente a los tratamientos convencionales debido a la presencia de células madre cancerosas (CMC). Este es el principal motivo por el cual el tratamiento del NB sigue siendo un gran desafío en la actualidad (1).

El NB se considera un tumor de origen embrionario ya que deriva de las células precursoras del linaje simpatoadrenal (células cromafines y de ganglios simpáticos) que migran desde la cresta neural durante el desarrollo embrionario. La cresta neural es una población celular transitoria presente solo durante la embriogénesis que se forma en la región dorsal del tubo neural bajo el ectodermo. Mediante un proceso de migración desde la cresta neural, se forman diversos tipos de progenitores celulares multipotentes que dan lugar a neuronas periféricas, neuronas entéricas, melanocitos, células de Schwann, células del esqueleto craneofacial y médula suprarrenal. Este proceso está estrictamente regulado a nivel molecular y fallos en las vías de señalización implicadas en el mismo, conllevan a la aparición de enfermedades como el NB.

En el caso concreto del NB, células de la región dorsal de la cresta neural sufren un proceso de transición epitelio mesenquimal (EMT), se separan de la cresta neural y migran ventralmente hacia la aorta, donde comienzan a llamarse progenitores simpatoadrenales. Desde la región aórtica, las células migran hacia la glándula adrenal en desarrollo para convertirse en células cromafines o para diferenciarse a células que forman los ganglios simpáticos (Figura 1) (1).

Por su origen, la mayoría de los NB surgen en la médula suprarrenal o en los ganglios simpáticos lumbares (65%). Entre el resto, la proporción de los tumores primarios de tórax/cuello/pelvis (4/1/1) se asemeja a la de la distribución normal de los ganglios simpáticos en las regiones torácica/cervical/sacra (12/3/4).

Amplificación del oncogen *MYCN*, mutaciones en los genes *ALK* o *PHOX2B*, así como la desregulación de algunos ARNs no codificantes, están implicados en la progresión de la maduración aberrante de estas células, favoreciendo el desarrollo del NB de forma muy heterogénea (Figura 1) (2).

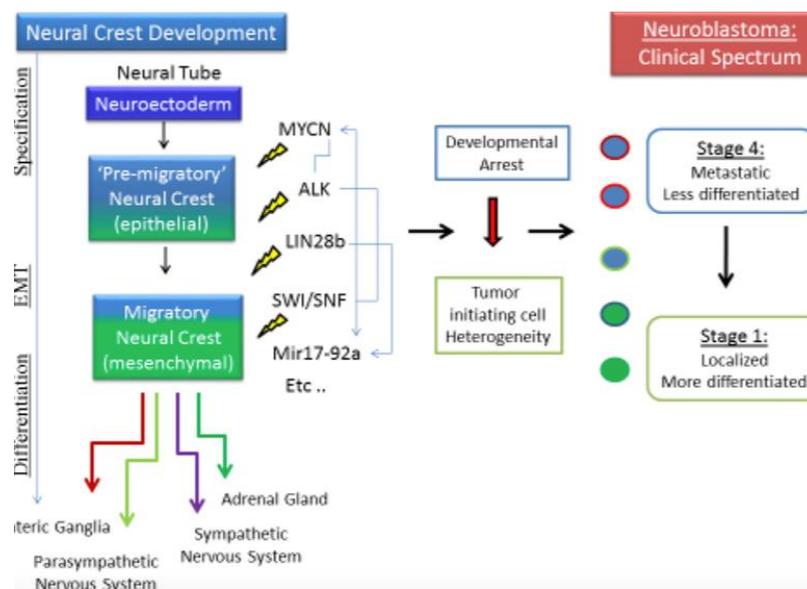


Figura 1. Origen del NB. Esquema representativo del proceso de diferenciación de los precursores simpatoadrenales y los factores involucrados en la desregulación del proceso (2).

## 2.2. Clasificación del Neuroblastoma

El NB puede clasificarse atendiendo tanto a su origen genético como a sus manifestaciones clínicas.

### 2.2.1. Clasificación genética del NB

#### A.- Neuroblastoma familiar

El NB familiar es poco frecuente (<2% de todos los NB). La primera predisposición genética identificada en el NB familiar fueron mutaciones en la

línea germinal del gen *PHOX2B* (paired-like homeobox 2B) que codifica un factor de transcripción esencial en el ciclo celular, la diferenciación neuronal y el desarrollo de la cresta neural, ya que se expresa en el desarrollo temprano de los progenitores simpatoadrenales. Los pacientes de NB con mutaciones en el gen *PHOX2B* también presentan otras enfermedades comunes de la cresta neural como la enfermedad de Hirschsprung (HSCR) o el síndrome de hipoventilación central congénita (CCHS) (1,3).

Otra de las mutaciones más comunes asociadas con el NB familiar se encuentra en gen del receptor de tirosina quinasa (*ALK*) del linfoma anaplásico. Este gen se expresa en el linaje simpatoadrenal en desarrollo de la cresta neural, donde regula el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular a través de múltiples vías celulares.

Codifica una proteína transmembrana cuyo dominio intracelular contiene un dominio RTK (receptor tyrosine kinase). Los puntos de mutación identificados hasta la fecha (F1174, F1245 o R1275) se encuentran en esa región (Figura 2). Existe una mutación activadora en el gen *ALK*, F1174L, que contribuye a la aparición de NB en ratones, pero aún no se ha encontrado en el NB familiar y parece comportarse como un superactivador que no es tolerado en la línea germinal (1,3).

Existe un inhibidor de *ALK* (Crizotinib) que se encuentra en ensayos clínicos. Además, se están desarrollando otros inhibidores de *ALK* de segunda generación.

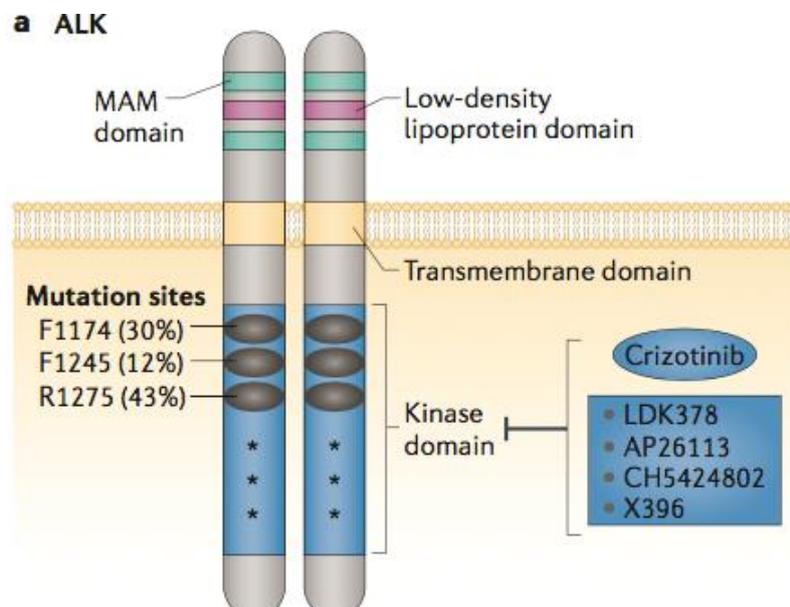


Figura 2. Estructura de la proteína del receptor tirosina quinasa (*ALK*) y las mutaciones asociadas al NB. (3).

Se han encontrado evidencias que sugieren que *PHOX2B* puede activar a *ALK*, proporcionando una conexión entre estas dos vías que están mutadas en el NB familiar (3).

## B.- Neuroblastoma esporádico

Alrededor del 10% de los NB esporádicos se originan por mutaciones en el gen *ALK*. La presencia de este gen mutado tanto en los NB familiares como en los esporádicos, sugiere se trata de un impulsor oncogénico implicado en el desarrollo del NB. Además, la activación de mutaciones o amplificaciones de este gen junto con la presencia de amplificación del oncogen *MYCN*, se asocia con enfermedad letal. Por todo ello, *ALK* es un objetivo prometedor para la terapia molecular en estudios preclínicos y ensayos clínicos para el tratamiento del NB (3).

Sin embargo, la lesión genética más frecuente en los NB esporádicos (22%) es la amplificación del oncogen *MYCN*. Este gen interviene en la proliferación, crecimiento y diferenciación de las células del sistema nervioso central (SNC). En los tumores de NB, *MYCN* se encuentra amplificado de 50 a 100 veces (1,3). Aunque se sabe que *MYCN* es un impulsor oncogénico implicado en el NB y que ha sido estudiado durante casi tres décadas, actualmente no hay ensayos clínicos dirigidos directamente a la proteína MYCN en el NB dado las dificultades inherentes al desarrollo de factores de transcripción. No obstante, hay estudios centrados en las vías implicadas en la desregulación de *MYCN* como son la Aurora Quinasa A y la proteína BET (3).

Otra de las lesiones que se encuentran con más frecuencia en el NB esporádico corresponden al gen *ATRX* (alfa-talasemia/sd de retraso mental asociado al cromosoma X, XLMR) (3). Este gen codifica una helicasa ATP dependiente remodeladora de cromatina tipo SWI/SNF y está relacionado con el retraso mental asociado al cromosoma X (XLMR). Sin embargo, se sabe poco sobre cómo contribuye al desarrollo o diferenciación de la línea simpatoadrenal durante el desarrollo embrionario. Los niños con XLMR no tienen una incidencia mayor de NB, por lo que las mutaciones en *ATRX* por sí mismas no son suficientes para promover la tumorigénesis. Además, *ATRX* se ha asociado con el alargamiento alternativo de los telómeros (ALT) en las células del NB y se asocia con una mayor supervivencia de las mismas (3).

### 2.2.2. Clasificación clínica del NB

El NB se clasifica clínicamente en cinco estadios diferentes (1-4 y 4S) según el Sistema Internacional de Estadificación del Neuroblastoma (de sus siglas en inglés INSS).

Los estadios iniciales del NB (estadios 1 y 2) no metastatizan al hueso o a la médula ósea y se pueden tratar con quimioterapia o radioterapia. Sin embargo, los tumores en estadio avanzado (estadios 3 y 4) son altamente metastásicos y, aunque inicialmente pueden responder bien tanto a la quimioterapia como a la radioterapia, con el tiempo se vuelven resistentes a dichos tratamientos. Existe un quinto estadio (estadio 4S), que se caracteriza por sufrir una regresión espontánea con tratamiento mínimo o incluso sin intervención médica (1).

Existe otra clasificación clínica del NB según la INRGSS (International Neuroblastoma Risk Group Staging System), que clasifica a los pacientes en cuatro estadios diferentes (L1, L2, M y MS) según recoge la Tabla 1.

Estadio	Definición
L1	Tumor localizado que no involucra estructuras vitales según lo definido por la lista de factores de riesgo definidos por imágenes (IDRF) y confinado a un compartimiento corporal.
L2	Tumor locorregional con presencia de uno o más factores de riesgo definidos por imagen.
M	Metástasis a distancia (excepto estadio MS).
MS	Metástasis en niños <18 meses con metástasis limitadas a piel, hígado y/o médula ósea.

*Tabla 1. Estadios de NB según la clasificación INRGSS. (2).*

Esta clasificación establece cuatro grupos de riesgo (muy bajo riesgo, bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo) según 13 factores pronósticos entre los que se incluyen (Figura 3) (6):

- Edad del paciente en el momento del diagnóstico. El pronóstico empeora gradualmente conforme se incrementa la edad de los pacientes.
- Histología y grado de diferenciación. Cuanto más diferenciado se encuentra el tumor, mejor pronóstico.
- Amplificación del gen *MYCN*. Su presencia supone un peor pronóstico. El estado de amplificación *MYCN* se determina con frecuencia mediante hibridación in situ. La amplificación de *MYCN* se define como un aumento de más de cuatro veces en el número señal de *MYCN* en comparación con la sonda de referencia.
- El estado del 11q. Su delección supone un peor pronóstico.
- Ploidía de ADN. La hiperdiploidía supone un mejor pronóstico que diploidía, evaluada mediante citometría de flujo. Los puntos de corte para la definición de diploidía versus triploidía o hiperploidía siguen siendo controvertidos.
- Estadiaje INSS, tal y como se comentó anteriormente.

Según esta clasificación, se elige el tratamiento más adecuado para cada paciente, dependiendo del grupo de riesgo al que pertenezcan y a las características biológicas del tumor.

### 2.3. Manifestaciones clínicas en NB

Las manifestaciones clínicas del NB están directamente relacionadas con la localización del tumor primario y la metástasis. Como se ha comentado anteriormente, los tumores primarios pueden formarse en cualquier parte del sistema nervioso simpático, siendo más frecuente en la médula de las glándulas suprarrenales (>50%). Esta localización de los tumores primarios se asocia con una menor tasa de supervivencia que cuando se originan en otras regiones.

Mientras que la enfermedad localizada a menudo se presenta como un hallazgo incidental, los grandes tumores abdominales pueden causar hipertensión, distensión abdominal y dolor. Por otro lado, los tumores primarios que se originan en el cuello pueden causar daño a nivel del ganglio cervical, causando síndrome de Horner, cuyos síntomas incluyen ptosis, miosis, enoftalmos y anhidrosis. Los tumores que surgen en los ganglios simpáticos paravertebrales pueden crecer a lo largo de los nervios espinales y expandirse hacia la médula espinal provocando su compresión (5).

La enfermedad metastásica se detecta en aproximadamente el 50% de los pacientes en el momento del diagnóstico. Los sitios más frecuentes de metástasis en el NB son los ganglios linfáticos regionales, la médula ósea y los huesos. Las metástasis hepáticas y cutáneas son más frecuentes en menores de 18 meses. Los sitios metastásicos pueden causar síntomas constitucionales como dolor de huesos, fiebre o pérdida de peso, así como anemia o trombocitopenia. Además, puede producirse dificultad respiratoria, trastornos de la coagulación o insuficiencia renal debido a la infiltración masiva de células tumorales en el hígado, especialmente en lactantes antes de los 3 meses de edad (5).

Algunos pacientes con NB desarrollan síndrome de opsoclonio-mioclono (OMS), un trastorno neurológico raro caracterizado por opsoclonos (movimientos oculares rápidos e involuntarios), mioclonías (contracciones musculares breves e involuntarias), irritabilidad y ataxia cerebelosa, probablemente causada por un proceso autoinmune que involucra al cerebelo. Se ha demostrado que la OMS afecta al 2-3% de los niños con NB, pero se ha visto que el NB afecta al 50-80% de los niños con OMS (5).

### 2.4. Enfermedad metastásica

Como se comentó anteriormente, la enfermedad metastásica se detecta en aproximadamente un 50% de los pacientes en el momento del diagnóstico. La metástasis es un proceso complejo y organizado que consta de múltiples pasos, interrelacionados entre sí, durante los cuales las células tumorales abandonan el tumor primario, obtienen acceso al sistema circulatorio, son transportadas a un sitio distante, salen de la circulación y crecen en un microambiente diferente (6).

#### *2.4.1. Importancia de la genética en la metástasis en NB*

La amplificación del gen *MYCN* favorece el fenotipo metastásico en el NB. Esta amplificación favorece la pérdida de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) y la pérdida de la actividad del complejo proteico NFκB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), lo que permite a las células del tumor escapar del control del Sistema Inmunitario(SI). Además, la expresión aumentada del gen *MYCN* se asocia con una regulación positiva del factor de transcripción Twist, que se expresa predominantemente en las células de la cresta neural. Mientras que la amplificación *MYCN* induce la proliferación de las células de NB, el factor de transcripción Twist las protege de la apoptosis. Por todo ello, la sobreexpresión del factor de transcripción Twist en el NB, proporciona a las células tumorales una ventaja de supervivencia en un microambiente que promueve la apoptosis como la hipoxia o la exposición a fármacos proapoptóticos (6).

La sobreexpresión de la neurotrofina TrkB y de su ligando BDNF proporcionan a las células del NB una mayor capacidad de metastatizar ya que provoca un aumento en la producción de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPS).

Por lo tanto, la sobreexpresión de *MYCN* como de TrkB, favorecen el fenotipo metastásico en las células del NB, pues controlan la expresión de múltiples proteínas que promueven la migración, invasión, proliferación y supervivencia de estas células en sitios alejados del tumor primario(6).

#### *2.4.2. ¿Cómo invaden las células del NB la circulación?*

Para la llegada de las células del NB a la circulación desde la masa tumoral y así metastatizar, es necesarios que se den las siguientes circunstancias:

- Cambios epigenéticos: la vía pRb/p16<sup>INK4a</sup>/ciclina D1 juega un papel crítico en la progresión del ciclo celular. La alteración de cualquier componente de esta vía ya sea por cambios genéticos (delección o mutación) o epigenéticos (hipermetilación en el inhibidor de p16<sup>INK4a</sup>) da como resultado la progresión del tumor al promover la transición de G1 a fase S, y se observa con mucha frecuencia en varios cánceres humanos. En el NB, se observan niveles bajos de p16<sup>INK4a</sup>, lo que sugiere que la proteína no está funcionando correctamente para regular la vía (6).
- Cambios en la expresión de integrinas: las células de NB expresan una menor cantidad de integrina α5β1 (integrina que disminuye la movilidad y favorece la adhesión a fibronectina y colágeno IV) y una mayor cantidad de integrina αvβ3 (integrina que aumenta la movilidad y la adhesión a vitronectina) para poder favorecer la migración de las células del NB hacia la circulación (6).
- Expresión de moléculas de adhesión: en el NB, al contrario que en otros tumores, la expresión de CD44 supone una limitación en la capacidad

de metastatizar de estas células, pues CD44 inhibe la expresión del gen *MYCN* (6).

- Expresión de proteasas: las proteasas favorecen la proteólisis de la membrana extracelular y por tanto promueven la invasión de células tumorales del NB a través de la membrana basal y de la matriz del tejido conectivo. Dentro de estas proteasas destacan las MMPs (metaloproteinasas de la matriz extracelular), en concreto la MMP2, y el sistema plasminógeno-plasmina, en concreto uPA y su receptor uPAR, que favorecen la activación de plasminógeno en plasmina (6).

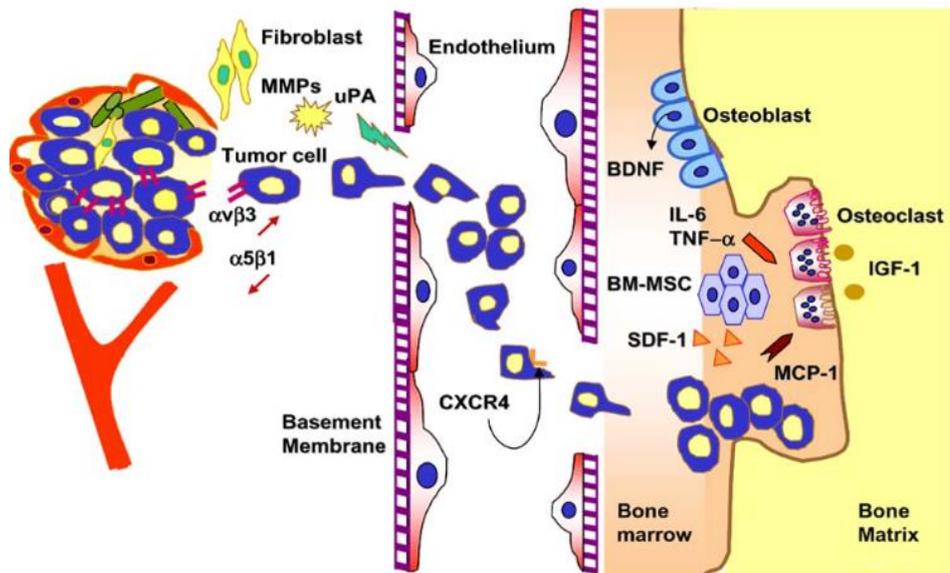
#### *2.4.3. ¿Cómo llegan las células del NB a la médula ósea y al hueso?*

Una vez se encuentran en el sistema circulatorio, las células tumorales son capaces de colonizar diferentes tejidos. En el caso del NB, suele ser común la metástasis a médula ósea y a hueso.

En el caso de la metástasis a médula ósea, es necesaria la activación de distintos ejes moleculares, como es el caso del eje CXCR4/SDF1, que favorece el alojamiento de las células del NB en hacia la médula ósea ,o del eje CCR2/MCP-1 (6).

En el caso de la metástasis al hueso, en el NB predominan las metástasis óseas con componente osteolítico (Figura 4). La activación del eje RANK/RANKL es esencial, ya que las células del NB producen un aumento en la producción de RANKL, estimulando directamente a los osteoclastos (6). También es fundamental el papel de la Interleuquina 6 (IL-6). Las células del NB secretan un factor soluble que estimula la producción de IL-6 en las células mesenquimales de la médula ósea. La IL-6, al igual que RANKL, actúa como un potente activador de los osteoclastos, favoreciéndose así la osteolisis del hueso (6). Finalmente, cabe destacar el papel del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) , producido por las células del estroma de la médula ósea y los osteoblastos, mejora la producción de péptido hormona-relacionado paratiroideo (PTHrP) por las células del NB, lo que resulta en un aumento, una vez más, en la activación de los osteoclastos. Así mismo, las células inflamatorias y los macrófagos asociados a tumores que se infiltran en la médula ósea contribuyen a la osteoclastogénesis, a través de la producción de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 e IL-8 (6).

## Multistep Process of Bone Metastasis in Neuroblastoma



Primary tumor → Migration → Intravasation → Extravasation → Metastatic bone tumor

Figura 4. Proceso de metástasis del NB a hueso. Dentro del tumor primario, algunas células del NB experimentan cambios genéticos y epigenéticos adquiriendo así un fenotipo metastásico. Para migrar, las células del NB disminuyen la expresión de  $\alpha 5\beta 1$  y aumentan la expresión de  $\alpha 5\beta 3$ , perdiendo así la adhesión célula-célula. Secretan MMP y uPA para penetrar en la membrana basal. Acceden a la circulación y mediante la acción de SDF-1, estas células son atraídas a la médula ósea. Una vez que las células del NB se encuentran en la médula ósea, estas interactúan con factores como BDNF, IGF-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  consiguiendo así escapar de la apoptosis e inducir la maduración de los osteoclastos. La degradación del hueso por estas células libera más factores de crecimiento que alimentan aún más el proceso invasivo (6).

## 2.5. Diagnóstico del NB

Para confirmar la existencia de NB, hace falta realizar tres tipos de pruebas: pruebas de laboratorio, imágenes radiográficas y evaluación histológica del tumor. El estadio y las características histológicas del tumor se determinan en el momento del diagnóstico, tras lo cual se estratifica a los pacientes para el tratamiento según los diferentes grupos de riesgo explicados anteriormente (5).

### 2.5.1. Pruebas de laboratorio

Niveles elevados de catecolaminas o metabolitos de catecolaminas, incluyendo dopamina, HVA (ácido homovanílico) y VMA (ácido vanilmandélico) se encuentran elevados en la orina del 90% de pacientes que presentan NB. En muchas ocasiones, resulta difícil conseguir la orina en pacientes tan pequeños, por lo que niveles plasmáticos libres y totales de normetadrenalina, metadrenalina y metoxitiramina representan una alternativa conveniente a los marcadores urinarios. Estos niveles elevados de catecolaminas, junto con una tinción de tejido del tumor primario o médula ósea con hematoxilina-eosina, donde se observan las típicas células pequeñas y de aspecto redondeado, se considera diagnóstico de NB en ausencia de histología e inmunohistoquímica estándar (5).

### 2.5.2. Imágenes radiográficas

En estas pruebas se incluyen la evaluación radiológica del tumor primario y de las metástasis osteomedulares y /o de tejidos blandos. La estadificación completa requiere aspirados bilaterales (extracción de células) y biopsia (extracción de tejido) de médula ósea, obtenidas de ambas crestas ilíacas, y un examen histológico e inmunohistoquímica para aportar un enfoque cuantitativo y así detectar la enfermedad metastásica.

Aunque la primera técnica de imagen que se emplea para el diagnóstico del NB es la ecografía (ya que se trata de una técnica con amplia disponibilidad y no es invasiva), una evaluación local adicional requiere imágenes por Tomografía Axial Computarizada (TAC) o Resonancia Magnética (RM). Se suele dar preferencia a la RM ya que, a pesar del mayor tiempo de adquisición y la necesidad sedación en niños más pequeños que requiere esta técnica, se consiguen imágenes con mayor resolución. Además, los niños no son sometidos a radiaciones ionizantes con la RM a diferencia que ocurre con el TAC (5).

La extensión de la enfermedad metastásica se evalúa mediante gammagrafía con metalyodobenzilguanidina (MIBG), una molécula similar a la noradrenalina. Para el marcaje radiactivo de MIBG, se prefiere el I-123 al I-131 ya que este requiere una dosis de radiación más baja, presenta una vida media más corta, se obtienen imágenes con mejor calidad y tiene una toxicidad tiroidea menor que el I-131. Se caracteriza porque muestra una elevada afinidad por el transportador de noradrenalina (NET) que se encuentra sobre expresado en el 95% de las células del NB. La exploración con MIBG tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad del 99% por lo que permite evaluar la enfermedad local y metastásica del tejido blando y de la médula ósea. No obstante, la extensión de la enfermedad en aquellos pacientes con NB en los que el MIBG no es captado, se pueden evaluar con técnicas diferentes, como son la gammagrafía ósea con Tc-99 o, preferiblemente, la Tomografía por emisión de positrones PET-TC con 18F- fluorodesoxiglucosa (FDG) (5).

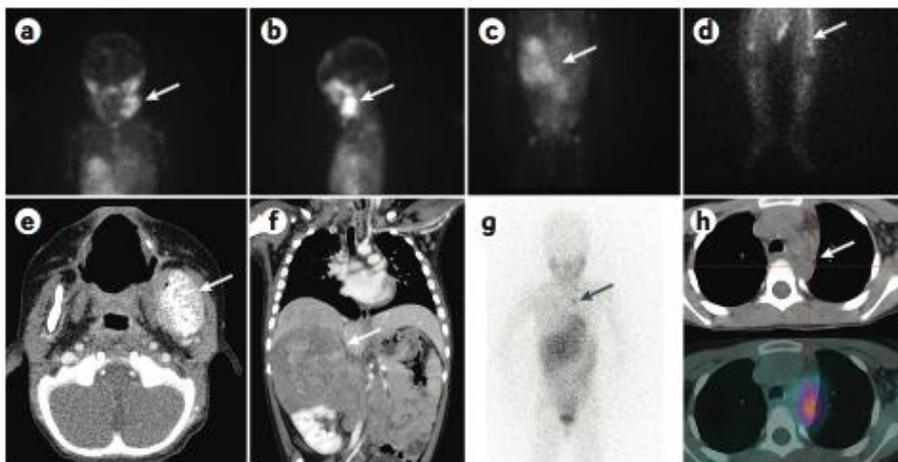


Figura 5. Imágenes de gammagrafía con MIBG (a-d y g) y TAC (e, f y h) para el diagnóstico de neuroblastoma (5).

### 2.5.3. Evaluación histológica del tumor: grado de diferenciación del tumor

Al analizar histológicamente los tumores, se pueden distinguir tres grupos diferentes (5):

- **Neuroblastoma.** Compuesto principalmente por células tumorales pequeñas, redondeadas e inmaduras.
- **Ganglioneuroblastoma.** Compuesto por células inmaduras y células tumorales con diferenciación terminal a células ganglionares.
- **Ganglioneuroma.** Compuesto por células tumorales maduras con diferenciación neural terminal a células ganglionares.

## 3. TRATAMIENTOS ACTUALES EN NEUROBLASTOMA

### 3.1. Tratamiento según los grupos de riesgo de la INRGSS

La elección de un tipo de tratamiento u otro depende del grupo de riesgo en el que se encuentre el paciente, según la clasificación INRGSS(International Neuroblastoma Risk Group Staging System), que clasifica a los pacientes en cuatro estadios diferentes (L1, L2, M y MS),(tabla 1). El tratamiento del NB puede incluir varias opciones, desde la observación únicamente, pasando por cirugía (extirpación del tumor), quimioterapia (tratamiento sistémico), radioterapia, AHSCT (trasplante autólogo de células madre), terapia molecular (sustancias dirigidas a moléculas específicas que participan en el crecimiento y diseminación de las células cancerosas) e inmunoterapia (fármacos que poseen la capacidad de modular y/o disminuir diferentes componentes de la respuesta inmunológica)(5).

### 3.2. Pacientes de muy bajo y bajo riesgo

Alrededor de un 50% de los pacientes diagnosticados de NB presentan una enfermedad de muy bajo o bajo riesgo. Dentro de este grupo se encuentran los pacientes en estadios L1, L2 y MS, según la clasificación INRGSS, con características genómicas favorables.

En los pacientes de muy bajo riesgo, se da un pronóstico excelente y el tumor suele remitir espontáneamente. En general, se recomienda la conducta expectante, sobre todo en pacientes menores de 1 año y con un tamaño de la masa tumoral menor de 5 cm. Si el tumor crece de tamaño o no desaparece al tiempo de observación, se opta por la cirugía.

En los pacientes de bajo riesgo, la cirugía juega un papel fundamental en el estadio **L1** ya que existe poco riesgo de complicaciones derivadas de dicha intervención. En los pacientes de bajo riesgo que se encuentran en los estadios L2 o MS, suele preferirse la administración de quimioterapia que muchas veces irá acompañada de resección quirúrgica (5,7). En estos pacientes, la quimioterapia va a estar indicada en las siguientes situaciones:

- Crecimiento rápido del tumor que puede producir complicaciones graves e incluso comprometer la vida del paciente. En estos casos, la quimioterapia se utiliza para contener este crecimiento y conseguir una citorreducción del tumor (5,7).
- En pacientes con presencia de IDRF (factores de riesgo definidos por imagen). En este caso, se emplea la quimioterapia neoadyuvante para facilitar la posterior resección completa y disminuir la morbilidad de la cirugía (5,7).
- Cuando el tumor presenta características genéticas desfavorables que predicen un comportamiento agresivo la cirugía puede no ser suficiente. Para evitar recaídas en estas situaciones, se administra quimioterapia adyuvante (5,7).

La radioterapia solo estará indicada en estos dos grupos de pacientes cuando el tumor comprometa algún órgano vital y no haya respondido previamente a la quimioterapia. Es muy poco común que se de esta situación en la práctica clínica (5,7).

### 3.3. Pacientes de riesgo intermedio

En este grupo incluimos pacientes en estadio L2 o M sin amplificación del gen *MYCN* pero con otros factores de riesgo sí presentes, como la delección del brazo largo de cromosoma 11 (11q) o un cariotipo diploide.

En este grupo el tratamiento suele ser la quimioterapia neo o adyuvante seguida de la cirugía. En ocasiones, debido al tamaño del tumor y las estructuras adyacentes a las que infiltra, la cirugía de resección completa no es factible, por lo que se opta por una citorreducción tanto del tamaño del tumor primitivo como de las metástasis para posteriormente abordar la resección completa en una segunda intervención (5,7).

La radioterapia únicamente está indicada en el subgrupo de pacientes con L2 sin amplificación del gen *MYCN* con NB pobremente diferenciado o que no haya respondido ni a cirugía ni a quimioterapia(5,7).

### 3.4. Pacientes de alto riesgo

En este grupo se encuentran todos los pacientes mayores de 18 meses con enfermedad metastásica, todos los pacientes que presentan amplificación del gen *MYCN* independientemente de la edad, y algunos pacientes menores de 18 meses con estadio MS, sin amplificación del gen *MYCN*, pero con otras alteraciones de mal pronóstico como la delección del 11q.

En este grupo de pacientes, se opta por un tratamiento más intensivo que incluye poliquimioterapia de inducción, resección quirúrgica y consolidación de la respuesta obtenida por quimioterapia a altas dosis con autotrasplante de médula ósea y radioterapia local (Figura 7).

Los fármacos de quimioterapia más utilizados en el NB de alto riesgo en la fase de inducción incluyen la combinación de algunos de estos seis fármacos: carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y topotecán (8).

La principal limitación de la quimioterapia es la toxicidad medular que provoca en estos pacientes jóvenes. En los pacientes de riesgo bajo/intermedio, es fundamental reducir el riesgo de toxicidad, tanto a corto como a largo plazo. En los pacientes de alto riesgo, en cambio, se asume una mayor toxicidad para intentar aumentar la supervivencia. Para solucionar esta limitación de la quimioterapia se utiliza el **autotrasplante de progenitores hematopoyéticos (ATPH)**, que consiste en técnicas de aféresis y criopreservación de progenitores hematopoyéticos para su posterior reinfusión, permitiendo así superar la toxicidad medular provocada por la quimioterapia. El ATPH solo está indicado en pacientes de alto riesgo y únicamente se lleva a cabo cuando no hay evidencia de enfermedad observable con los tratamientos que se hayan realizado previamente (quimioterapia y cirugía). Los fármacos más empleados para el acondicionamiento de la médula son BuMel (Busulfán y Melfalán) a nivel Europeo y CEM (Carboplatino, Etopósido y Melfalán) en EEUU(5). Tras el acondicionamiento y la reinfusión de progenitores, se produce un cuadro de aplasia prolongada que puede provocar fiebre y mucositis que pueden causar complicaciones (7).

En estos pacientes, el momento idóneo para realizar la cirugía es después de la quimioterapia de inducción y antes del trasplante autólogo de la médula ósea(5,7).

#### *3.4.1. Tratamientos basados en Inmunoterapia*

Para tratar la “enfermedad mínima residual” que pueda quedar tras estos tratamientos, se administra ácido 13-cisretinoico y anticuerpo monoclonal anti-GD2.

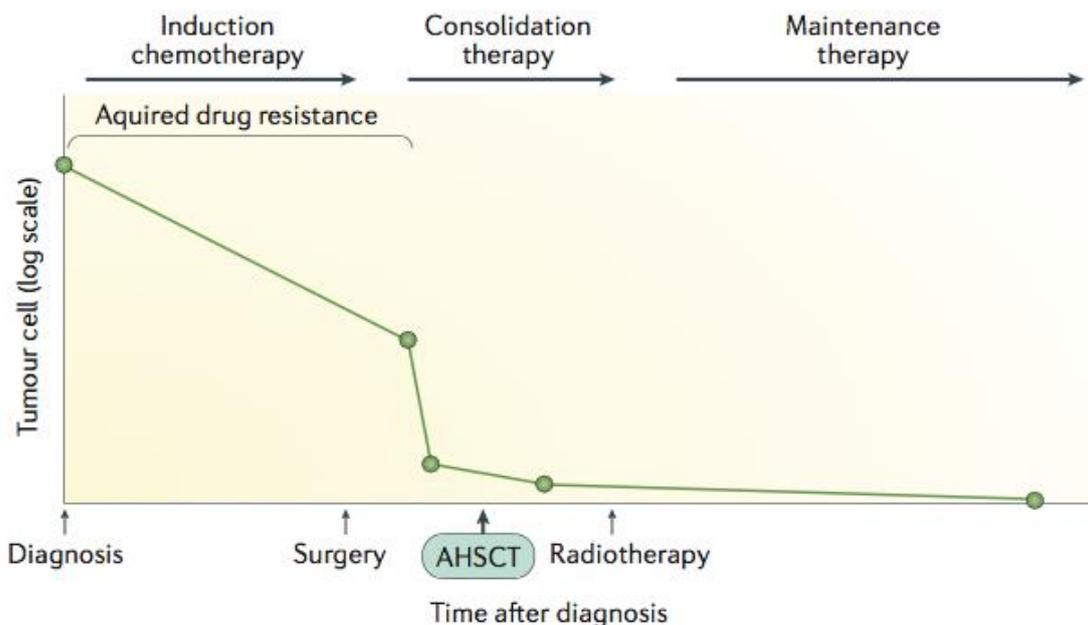
Los gangliósidos GD2 son complejos ácidos-glicolípidos que se encuentran en la parte externa de la membrana celular. Las células de NB expresan grandes cantidades de GD2, facilitando la invasión y adherencia de las células, además de tener un efecto inmunosupresor sobre las células del sistema inmune. No es inmunogénico y su expresión persiste después de los tratamientos. Por todo ello, es una diana atractiva para la inmunoterapia contra el NB (9).

El mecanismo de acción de los anticuerpos monoclonales es dependiente del sistema inmune, bien mediante citotoxicidad celular activada por anticuerpos (ADCC), o mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), consiguiendo que se establezca una respuesta inmune efectiva del paciente contra el tumor (9).

Existen anticuerpo anti-GD2 murinos (3F8 y 14G2A), cuyos resultados no han resultado eficaces en clínica, y anticuerpos anti-GD2 quiméricos (Dinituximab beta y Naxitamab). De todos ellos, el Dinituximab beta es el que mejores resultados ha proporcionado en pacientes con NB. Sin embargo, es un fármaco que presenta numerosos efectos adversos entre los que destacan (7,9):

- Reacciones alérgicas. Su administración puede producir reacciones anafilácticas.
- Dolor. Se deben administrar analgésicos, incluidos opiodes intravenosos, antes de cada administración de Dinituximab beta y continuar su administración hasta dos horas después de la finalización del tratamiento.
- Fiebre. La asociación de la administración de anti GD-2 con la expresión de IL-2, hace más frecuente la incidencia de fiebre durante el tratamiento.
- Toxicidad sobre células hematopoyéticas. Si se produce, es necesario realizar una transfusión para mantener niveles adecuados de hemoglobina y plaquetas.
- Hipotensión. Es necesario detener el tratamiento si se produce este efecto adverso.
- Disnea y saturación de oxígeno por debajo del 90%. Se administrará oxigenación suplementaria para mantener saturación de oxígeno >90%.

Además, cuando se administra Dinituximab beta, la administración de corticoides, inmunoglobulinas y radioterapia están contraindicados (7).



**Figura 7.** Enfoque de tratamiento general para el NB de alto riesgo. Este tratamiento consiste en la administración de quimioterapia de inducción, resección quirúrgica y consolidación de la respuesta obtenida mediante quimioterapia a altas dosis con trasplante autólogo de células madre (AHSC) y radioterapia local (5).

### 3.5. Tratamiento en las recaídas y en el NB refractario

Para el tratamiento de recaídas y NB refractario, están indicados la inmunoterapia celular, la quimioterapia, la radioterapia con  $^{131}\text{I}$ -MIBG y las terapias dirigidas molecularmente. Nos referimos a recaídas cuando se

*produce* la reaparición de la enfermedad tras haber logrado una respuesta completa (7). Por otro lado, se habla de enfermedad refractaria cuando existe una falta de respuesta o respuesta insuficiente al tratamiento administrado (7).

### *3.5.1. Inmunoterapia celular*

Este tipo de tratamiento se basa en favorecer la respuesta que el sistema inmunitario es capaz de poner en marcha frente al tumor, potenciarla y mantenerla en el tiempo para conseguir la eliminación de la neoplasia. Dentro de la inmunoterapia celular en NB destacan:

- **Terapia de células CAR T (Chimeric Antigen Receptor-Modified T-cells).** Consiste en la utilización de linfocitos T modificados para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) dirigido contra GD2. Hay varios ensayos en marcha con CAR-T contra GD2 como contra otros antígenos de superficie de NB como el CD171 (8).
- **Células Natural Killer (NK).** También se ha explorado la inmunoterapia basada en células NK en combinación con el anticuerpo anti GD2 en niños con NB recidivante (8).
- **Vacunas.** Existe una vacuna que ya ha demostrado su seguridad en un ensayo en fase clínica I que se está evaluando en ensayos en fase II en la actualidad. Esta vacuna está formada por antígenos asociados al NB (GD2) en combinación con beta-glucano (8).

### *3.5.2. Quimioterapia*

En los pacientes con NB recidivante, la supervivencia en pacientes mayores de 1-3 años sin recaídas o sin muerte, rara vez es posible. No obstante, las combinaciones de agentes quimioterápicos más reciente han tenido éxito. Estas combinaciones se basan en la administración de topotecán con ciclofosfamida, irinotecán con temozolomida o topotecán con temozolomida (5).

### *3.5.3. Radioterapia con <sup>131</sup>I-MIBG*

La terapia con <sup>131</sup>I-MIBG también se puede utilizar como tratamiento de rescate en enfermedad metastásica en recaída. Aunque la mayoría de recaídas metastásicas de NB son en médula ósea y/o hueso y la mayoría capta MIBG, solo los pacientes con enfermedad MIBG positiva son candidatos a este tipo de tratamiento. Se ha observado una tasa de respuesta del 30% al 40% tanto en la enfermedad refractaria como en la recidivante (8).

### *3.5.4. Terapias dirigidas molecularmente*

Los NB, como otros tumores embrionarios, no suelen presentar mutaciones en genes terapéuticamente relevantes en el momento del diagnóstico, pero en situaciones de recaída, el perfil molecular puede variar y se han descrito una serie de mutaciones que pueden ser dianas terapéuticas. Entre ellas destacan (8,10):

- **Inhibidores de ALK.** ALK es la principal diana para la que existen inhibidores, aunque las alteraciones más frecuentes descritas pueden ser resistentes a estos tratamientos. En un ensayo clínico en fase I, se inscribieron 79 niños y se trataron con **Crizotinib**, el primer fármaco inhibidor de ALK. Los resultados fueron prometedores, aunque se vio que probablemente éstos mejorarían en sí el Crizotinib se asociara con otras terapias para un beneficio máximo.

**Inhibidores de Aurora Quinasa A.** La sobreexpresión de la Aurora Quinasa A implica la resistencia de las células tumorales a la apoptosis y la inestabilidad genómica. En NB, su sobreexpresión conlleva estadio tumoral avanzado. En ensayos clínicos en fase I, se demostró que los inhibidores de la Aurora Quinasa A (**Alisertib**) solos o en combinación con quimioterapia, suponían una mejora clínica en estos pacientes.

**Inhibidores de Ornitin Descarboxilasa (ODC).** El inhibidor Difluorometilornitina (DFMO), ha demostrado eficacia en modelos preclínicos, aunque en un ensayo clínico en fase I donde fue utilizado como fármaco único, no demostró efecto en pacientes en recaída. Sin embargo, sí ha demostrado que el mantenimiento en niños en segunda remisión resultaba en una supervivencia libre de enfermedad del 54% y en una supervivencia global a los dos años del 81%. Esto sugiere que los inhibidores ODC pueden ser una buena estrategia para prolongar la supervivencia de los pacientes con NB.

- **Modificadores epigenéticos.** Se trata de fármacos cuyas dianas son las DNA metiltransferasas o las histonas deacetilasas (HDAC). En un estudio en fase I, se probó la combinación de ácido 13-cis-retinoico con un inhibidor de HDAC, **el Vorinostat**, y, aunque no se observaron respuestas objetivas, 11 de 29 pacientes presentaron enfermedad estable prolongada.

## 4. NANOMEDICINA

A pesar de disponer de un gran número de tratamientos diferentes contra el NB, al tratarse de una enfermedad tan heterogénea tanto clínica como biológicamente, es necesaria la búsqueda de nuevas terapias que empiecen a resultar útiles en la actualidad y en el futuro. Por ello, se ha comenzado a utilizar la Nanomedicina en el tratamiento contra el NB. Actualmente, es considerada una de las estrategias más novedosas para la administración de fármacos contra estos tumores. A continuación, nos disponemos a hablar de qué es la Nanomedicina y qué aplicaciones puede tener en el tratamiento contra el NB.

### 4.1. ¿Qué es la Nanomedicina?

La nanotecnología se define como el “diseño, producción, caracterización y aplicación intencionales de materias, estructuras, dispositivos y sistemas

controlando su tamaño y forma a nanoescala (1 a 100 nm)". Como los nanomateriales son similares a los sistemas y moléculas biológicas en cuanto al tamaño, la nanotecnología puede utilizarse potencialmente para llevar a cabo aplicaciones médicas. De aquí surge el concepto de Nanomedicina, que tiene como objetivo aprovechar las propiedades y características físicas de los nanomateriales para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades a nivel molecular.

A día de hoy, se están diseñando nanomateriales que se usan en el campo de la Nanomedicina para llevar a cabo el transporte de agentes diagnósticos o terapéuticos a través de las barreras biológicas, acceder a las moléculas, mediar interacciones moleculares y detectar cambios moleculares con un alto rendimiento y una elevada sensibilidad (11).

#### 4.2. Propiedades y ventajas de los nanomateriales

Los nanomateriales consisten comúnmente en átomos metálicos, no metálicos o una mezcla de ambos, denominados, respectivamente, como partículas metálicas, orgánicas o semiconductoras. La superficie de estos nanomateriales suele estar recubierta de polímeros o moléculas de reconocimiento para mejorar la biocompatibilidad y la selectividad. Una característica común de los nanomateriales es su gran relación área de superficie con respecto al volumen, que puede ser órdenes de magnitud mayor que la de los materiales macroscópicos. Esto supone una gran ventaja, pues al usar los nanomateriales como portadores, su superficie puede recubrirse con una gran cantidad de moléculas (11).

Al comparar la administración de fármacos de forma convencional con la administración mediante el uso de nanomateriales, ésta última presenta una serie de ventajas como son (12):

- Mayor tiempo de circulación, debido a una reducción en la excreción renal y en la degradación a nivel hepático, lo cual aumenta la seguridad y la eficiencia del tratamiento (12,13).
- Mayor capacidad de interacción y acumulación en tejidos y células objeto del blanco terapéutico (12).
- Mayor biodisponibilidad y biocompatibilidad (12).
- Menor toxicidad (12).
- Disminución de la dosis requerida para obtener los efectos deseados (12).
- Mejora de la estabilidad y la solubilidad de los fármacos encapsulados (13).
- Se promueve el transporte a través de la membrana plasmática celular (13).

#### 4.3. Tipos de nanopartículas y sus aplicaciones

Se han desarrollado multitud de nanomateriales y se han estudiado para ser empleados en el diagnóstico y la administración de diferentes agentes citotóxicos.

Entre los nanomateriales más utilizados, se encuentran las nanopartículas (NPs). Se pueden distinguir tres tipos de NPs que pueden vehicular diferentes agentes diagnósticos y terapéuticos: NPs basadas en lípidos, NPs poliméricas y NPs inorgánicas.

#### *4.3.1. Nanopartículas basadas en lípidos*

La estructura más típica de estas NPs consiste en una plataforma esférica que comprende al menos una bicapa lipídica que rodea al menos un compartimento acuoso. Como sistema de administración, las NPs basadas en lípidos ofrecen numerosas ventajas como son: la simplicidad de formulación, el autoensamblaje, la biocompatibilidad, la alta biodisponibilidad, la capacidad de transportar grandes cargas útiles y una gran variedad de propiedades fisicoquímicas que se pueden controlar para modular sus características biológicas (13).

Existen dos tipos de NPs basadas en lípidos (Figura 8) (13):

- **Liposomas.** Estas NPs están formadas por fosfolípidos que pueden formar estructuras vesiculares unilaminares y multilaminares. Esto supone una gran ventaja pues permite al liposoma transportar y liberar fármacos hidrófobos, hidrófilos y lipófilos en el mismo sistema mejorando así su uso. Como inconveniente de los liposomas, cabe destacar que son rápidamente absorbidos por el sistema reticuloendotelial, por lo que a menudo se incluyen modificaciones superficiales en estas NPs para extender su circulación y mejorar así su administración, permitiendo por tanto, su uso en la clínica.
- **Nanopartículas lipídicas (LNPs).** Son estructuras similares a los liposomas, pero se diferencian de estos porque forman estructuras micelares dentro del núcleo de las partículas, morfología que puede alterarse en función de los parámetros de formulación y síntesis. Las LNPs se componen de cuatro componentes principales que son:
  - a) **Lípidos catiónicos o ionizables**, que ayudan al escape del sistema reticuloendotelial y forman complejos con material genético cargado negativamente.
  - b) **Fosfolípidos**, como componentes estructurales.
  - c) **Colesterol**, para dar estabilidad a la estructura.
  - d) **PEGilados**, para mejorar la estabilidad y la circulación de estas NPs.

Las LNPs son una terapia ideal para la administración de fármacos o ácidos nucleicos. Sin embargo, a pesar de todas las ventajas que presentan estas NPs, los sistemas de LNPs pueden estar limitados por una baja carga de fármaco y una biodistribución que resulta en una alta captación en hígado y bazo (13).

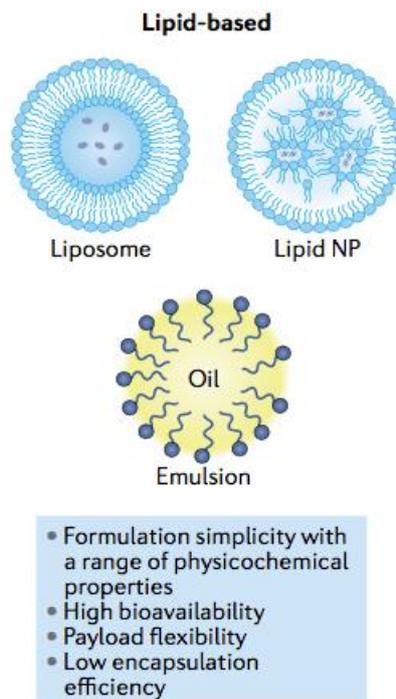


Figura 8. Esquema representativo de los tipos de NPs basadas en lípidos (13).

Entre las aplicaciones de las NPs basadas en lípidos, cabe destacar la aplicación de los liposomas en la clínica. Fueron las primeras NPs utilizadas en los ensayos clínicos de la FDA. Desde la década de 1990 con la aprobación de formulaciones liposomales de doxorrubicina y anfotericina B, han aparecido un número creciente de ensayos y aprobaciones que utilizan la administración liposomal, entre los que encontramos (14):

**1) Onivyde®.** Irinotecan liposomal, un inhibidor de la topoisomerasa I aprobado como tratamiento de segunda línea para el cáncer de páncreas metastásico. Se vio que los pacientes que recibían Onivyde® junto a flurouracilo y ácido fólico, tenían una mediana de supervivencia de 6 meses frente a los 4,2 meses de los pacientes que no recibían dicho tratamiento (14).

**2) Doxil®.** Doxorrubicina liposomal PEGilada (para disminuir el aclaramiento por parte del sistema reticuloendotelial). Ha sido aprobada para el sarcoma de Kaposi, el cáncer de ovario, el mieloma múltiple y el cáncer de mama metastásico. En comparación con la doxorrubicina libre, el liposoma PEGilado produjo un aumento de concentración de 4 a 16 veces mayor de los niveles de este fármaco en estas neoplasias malignas. Además, estas nanopartículas liposomales demostraron una reducción de los efectos secundarios cardiotoxicos producidos por el tratamiento de la doxorrubicina libre (14).

**3) Ambisome®.** Consiste en Anfotericina B liposomal para tratar infecciones fúngicas (14).

Además de estos sistemas liposomales aprobados, existe otro más complejo que se encuentran en fase de ensayo clínico. Es el caso del **Thermodox®**, una doxorubicina unida a liposomas que se diferencia de Doxil® en que está compuesta por lípidos térmicamente sensibles que degradan la bicapa cuando se exponen a altas temperaturas. El acoplamiento de la doxorubicina con la ablación térmica por radiofrecuencia de las células tumorales permite la liberación del fármaco en el sitio específico del tumor (14).

#### *4.3.2. Nanopartículas poliméricas*

Las NPs poliméricas pueden sintetizarse a partir de materiales naturales o sintéticos, así como de monómeros o polímeros preformados, lo que permite una amplia variedad de posibles estructuras y características. Son buenos vehículos de administración al ser biocompatibles, biodegradables, solubles en agua y estables durante el almacenamiento. Además, tienen parámetros de formulación simples. Los agentes terapéuticos, a través de las NPs poliméricas pueden (13):

- Encapsularse dentro del núcleo de la NPs.
- Atraparse en la matriz del polímero.
- Conjugarse químicamente al polímero.
- Unirse a la superficie de la NPs.

Esto permite la entrega de diversas cargas útiles, incluidos compuestos hidrófobos, hidrófilos y cargas con diferentes pesos moleculares como micromoléculas, macromoléculas biológicas, proteínas y vacunas (13).

Según la forma, las NPs poliméricas pueden dividirse en (Figura 9) (13):

- **Polimerosomas.** Son vesículas artificiales, con membranas fabricadas con copolímeros de bloque anfifílico. Algunos polímeros que normalmente se copolimereizan para estas aplicaciones incluyen PEG (polietilenglicol) y PDMS (polidimetisiloxano). Son similares a los liposomas, pero con mayor estabilidad y eficiencia de retención de carga, lo que les convierte en vehículos efectivos para la administración de productos terapéuticos al citosol (13).
- **Micelas poliméricas.** También suelen ser copolímeros. Se autoensamblan para formar nanoesferas con un núcleo hidrófobo y un recubrimiento hidrófilo. Se han empleado para la administración de terapias contra el cáncer en ensayos clínicos (13).
- **Dendrímeros.** Se trata de polímeros hiperramificados de arquitectura tridimensional donde tanto el tamaño, como la forma y la química de la superficie, pueden controlarse en gran medida. Los grupos funcionales activos presentes en el exterior de los dendrímeros permiten la conjugación de biomoléculas o agentes de contraste a la superficie, mientras que los fármacos se pueden cargar en el interior. Muchos productos basados en dendrímeros se encuentran actualmente en ensayos clínicos como agentes teragnósticos, geles tópicos y agentes de contraste (13).

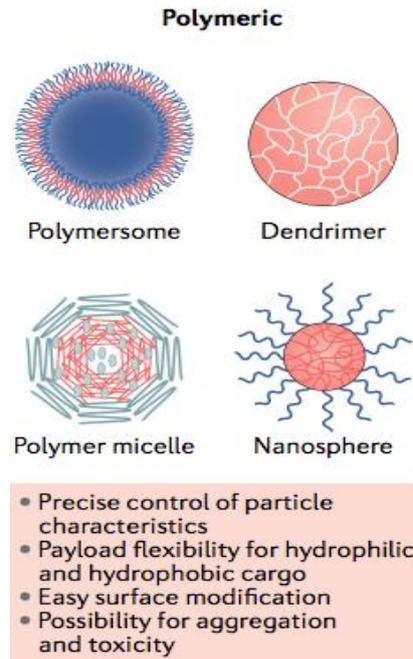


Figura 9. Esquema representativo de los tipos de NPs poliméricas (13).

Entre las aplicaciones de las NPs poliméricas, podemos encontrar:

- Cadenas de un solo polímero. La forma más básica de nanomedicina polimérica es la utilización de cadenas de un solo polímero, ya sea directamente como agente terapéutico, como agente modificador de un fármaco o agente de diagnóstico. El mejor ejemplo de **agente directo** es el **Copaxone®**. Apareció en 1996 y supuso una revolución en el tratamiento de la esclerosis múltiple al actuar como inmunomodulador (14).
- NPs estabilizadas con PEG. Para mejorar la solubilidad o la circulación, las NPs poliméricas se estabilizan con **PEG**. Dentro de estas NPs encontramos diversos fármacos aprobados por la FDA como son (14):

**1)Neulasta®.** Factor estimulante de colonias de granulocitos PEGliados. Aprobado por la FDA desde 2002 para el tratamiento de la neutropenia inducida por quimioterapia (14).

**2)Plegridy®.** Aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple recidivante. La adición de PEG a la proteína terapéutica supuso una mejora de la vida media biológica y de la exposición en comparación con la proteína sola, lo que permite que este tratamiento se administre cada 2-4 semanas en vez de a diario como ocurre con otros tratamientos basados en IFN para la esclerosis múltiple (14).

**3)Adynovate®.** Factor VIII antihemofílico PEGilado fue aprobado para el tratamiento de la hemofilia A. La adición de PEG a la proteína terapéutica supone una menor administración de esta y por tanto un menor riesgo de

generar anticuerpos anti-factor VIII que puede afectar hasta al 30% de los pacientes provocando, por tanto, una reducción de la eficacia del fármaco (14).

- a) **4)NKTR-102.** Es un fármaco etirinotecán pegilado que se encuentra en ensayos clínicos en fase III. Este ensayo demostró que la exposición prolongada de las células tumorales a este inhibidor de la topoisomerasa I generalmente mostraba una respuesta terapéutica mejorada debido a la circulación más prolongada de los nanomateriales pegilados (14).

Polímeros hidrófilos. Aunque los polímeros PEGilados se hayan utilizado más ampliamente en nanomedicina, otros ejemplos de hidrófilos pueden ser igualmente exitosos para mejorar los resultados terapéuticos. Un ejemplo sería el fármaco **Eligard®**, ideal para los síntomas de cáncer de próstata. Se basa en la incorporación de leuprolida (inhibidor de la testosterona) en una NP de poliláctido-co-ácido-glicólico (PLGA). El PLGA es un polímero degradable bien establecido que se descompone lentamente en las unidades monoméricas constituyentes en ciclos de tiempo controlados (14).

- Micelas poliméricas:

- 1)Estrasorb TM.** Es la única micela aprobada por la FDA, indicada como tratamiento tópico para los síntomas vasomotores de la menopausia (14).

- 2)BIND-014.** En ensayo clínico. Sistema micelar administrado de forma intravenosa. Potencial como terapéutico para el cáncer de próstata. Está compuesto por un núcleo hidrofóbico que contiene docetaxel y una capa de PEG hidrófila. Estas micelas se dirigen al antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), que es un marcador proteico bien definido en la superficie de muchas células de cáncer de próstata y liberan el antimitótico docetaxel produciendo así el efecto deseado (14).

#### *4.3.3. Nanopartículas inorgánicas*

Las NPs inorgánicas están formuladas con precisión y pueden diseñarse para tener una amplia variedad de tamaños, estructuras y geometrías. Se han utilizado materiales inorgánicos como oro, hierro y sílice. Además, las NPs inorgánicas tienen propiedades físicas, eléctricas, magnéticas y ópticas únicas debido a las propiedades del propio material base.

Dentro de las NPs inorgánicas, las NPs de oro son las más estudiadas y se utilizan en diversas formas como nanoesferas, nanobarreras y nanocapas. El óxido de hierro es otro material comúnmente investigado para la síntesis de NPs inorgánicas y éstas, constituyen la mayoría de las nanomedicinas inorgánicas aprobadas por la FDA. Otras nanopartículas habituales son las NPs de sílice mesoporosa, que se han utilizado con éxito para la administración de genes y fármacos como se comentará cuando hablemos de la aplicación de la nanomedicina en el tratamiento del NB. Los puntos cuánticos (del inglés, *quantum dots*), hechos de materiales semiconductores como el silicio, son NPs que se utilizan principalmente en aplicaciones de imagen *in vitro*, pero se está

observando que son prometedoras para el diagnóstico *in vivo*. Por tanto, las NPs inorgánicas están especialmente calificadas para diagnóstico por imagen y terapias fototérmicas. Sin embargo, su aplicación clínica se ve limitada por la baja solubilidad y por la toxicidad que presentan, especialmente en formulaciones que utilizan metales pesados (13).

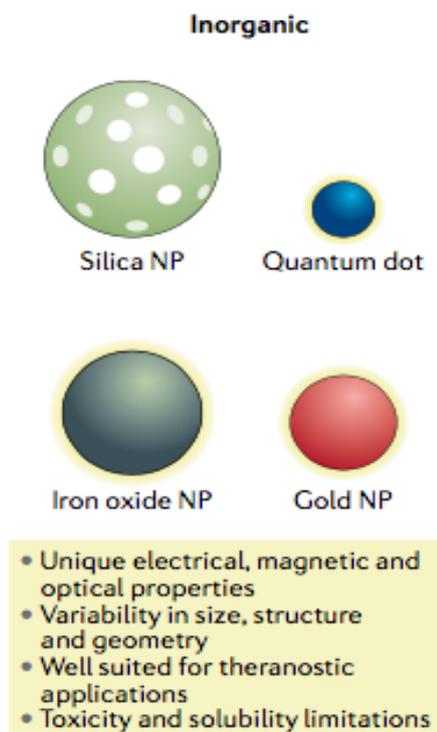


Figura 10. Esquema representativo de los tipos de NPs inorgánicas(13).

### Aplicaciones de las NP inorgánicas

Las NPs de óxido de hierro se están investigando como reactivos de mejora de contraste para imágenes por resonancia magnética. No obstante, la mayoría de los materiales aprobados por la FDA están indicados como terapias de reemplazo de hierro. De hecho, existen varios compuestos aprobados que se utilizan para tratar la anemia causada por enfermedad renal crónica. Cada uno de estos compuestos, está formado por un núcleo de óxido de hierro recubierto de polímeros hidrófilos (dextrano, sacarosa), que proporciona una disolución lenta del hierro después de la inyección intravenosa, lo que permite la administración de grandes cantidades de hierro sin que este se acumule en la sangre ocasionando toxicidad. Así mismo, la FDA aprobó varias partículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPION), entre las que destaca una fabricada por la empresa Nanotherm<sup>TM</sup>. Estas NPs de SPION están recubiertas de aminosilano y se utilizan para la terapia del glioblastoma utilizando hipertermia tisular local (14).

Por otro lado, el oro se ha utilizado en la nanomedicina en ensayos clínicos debido a su combinación única de propiedades ópticas, térmicas, tamaño,

forma y química de superficie ajustable. No obstante, aún no se han desarrollado NPs basadas en oro que hayan sido aprobados por la FDA (14).

**NBTXR3** es fármaco que consiste en un potenciador de radio que utiliza una NP de óxido metálico de alta densidad electrónica (óxido de hafnio) para aumentar la eficacia de la radioterapia sin aumentar la dosis de tejido circulante. La incorporación de este material de alta densidad de electrones maximiza las interacciones de rayos X produciendo una mayor cantidad de electrones excitados, y a su vez, formando especies de radicales más reactivas. Este NBTXR3 se encuentra en fase II-III para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos y en fase I para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello(14).

Por último, los puntos de Cornell (puntos C) son NPs de sílice inorgánica diseñadas para aplicaciones de imágenes de fluorescencia. En 2014 se encontraban en fase I de ensayo clínico (14).

## 5. ESTUDIOS DE NANOMEDICINA EN NEUROBLASTOMA

A día de hoy se están llevando a cabo ensayos clínicos que involucran diferentes clases de NPs en el tratamiento del NB, especialmente en pacientes con NB de alto riesgo o en recaída donde los tratamientos habituales siguen siendo ineficaces. A continuación, vamos a hablar de las posibilidades que existen actualmente contra este tumor en el ámbito de la Nanomedicina.

### 5.1. Terapias no dirigidas

Son aquellas terapias que no van a actuar contra un marcador concreto presente en las células del NB.

- **Nanopartículas de paclitaxel unidas a albúmina (nab-PTX).** La formulación de NPs de paclitaxel estabilizadas con albúmina es una forma de medicamento contra el NB y puede producir menos efectos secundarios que la administración del fármaco libre. Este medicamento impide el crecimiento y la multiplicación de células cancerosas del NB y puede destruirlas. Estas NPs han alcanzado la fase I en ensayos clínicos para NB refractarios y otros tumores sólidos pediátricos. La razón del éxito de nab-PTX se debe a una mejora en el transporte celular, en la penetración del tumor y en una menor eliminación de PTX en comparación con la administración de PTX no encapsulado (15).
- **NPs de nanografeno oxidado recubiertas con gelatina.** Para disminuir la toxicidad ocasionada por los agentes quimioterápicos utilizados contra el NB se han desarrollado estas NPs que ayudan al transporte de **carboplatino y doxorubicina**. Aunque se disminuyó la toxicidad utilizando estas NPs en estudios *in vitro*, se requieren más

experimentos *in vivo* para confirmar la viabilidad de este tipo de nanoportadores, pues el grafeno no es estrictamente biodegradable (15).

- **NPs de caseína reticuladas por transglutaminasa.** Estas NPs se emplearon para encapsular **cisplatino**. Los experimentos *in vivo* determinaron una mejora significativa en la eficacia y la toxicidad del cisplatino encapsulado (15).
- El **SN-38**, metabolito activo del irinotecán, es más potente que este pero no puede llegar al mercado debido a su escasa solubilidad y alta toxicidad. Para ello, se han desarrollado NPs biodegradables basadas en poli(lactida)-PEG que transportan el profármaco formado por la unión de SN-38 y succinato de tocoferol. Estas NPs han sido probadas en modelos de ratón con NB. Se comparó su eficacia con el tratamiento con irinotecán libre como control y se vio que el régimen de NPs de SN-38 era más eficaz al restringir el crecimiento del tumor y la recurrencia de éste (15).
- Para aumentar la vida media del topotecán (30 minutos), se preparó una formulación de topotecán liposomal para proteger al fármaco de la hidrólisis que sufre inducida por pH. Los estudios farmacocinéticos mostraron que estas NPs aumentaban en diez veces los valores de la vida media en plasma en comparación con dosis equivalentes de topotecán libre. No obstante, el topotecán liposomal no aumentó la vida útil de los ratones con NB, por lo que aún son necesarios más estudios *in vivo* para demostrar el beneficio de estas NPs sobre los tratamientos convencionales (15).

## 5.2. Terapias dirigidas

Como hemos comentado anteriormente, el NB presenta una gran heterogeneidad, lo que da lugar a un amplio número de fenotipos celulares diferentes. En estos fenotipos se van a expresar diversos marcadores celulares que se encuentran sobreexpresados y que contribuyen al proceso cancerígeno. De ahí la importancia de la identificación de estos marcadores, pues su bloqueo puede ser una alternativa muy útil en el tratamiento de esta enfermedad, permitiendo así una terapia farmacológica más personalizada, más efectiva y con menos efectos tóxicos secundarios.

### 5.2.1. Terapias dirigidas basadas en anticuerpos monoclonales

- **Terapia Anti-GD2 mAb.** Como comentábamos en el apartado de la inmunoterapia en NB, el anticuerpo anti-GD2 Dinituximab beta es ampliamente utilizado, principalmente en el tratamiento de mantenimiento de NB de alto riesgo. También se comentó que produce bastantes efectos adversos y que su administración resulta compleja. Para hacer frente a estos problemas, se han desarrollado

NPs inorgánicas, principalmente de hierro u oro que transportan dinituximab, observándose un aumento significativo de la eficacia de esta terapia (15).

- **VEGF como diana terapéutica.** El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) juega un papel fundamental en la angiogénesis tumoral. Afortunadamente, existe un anticuerpo monoclonal anti-VEGF, el bevacizumab. Para mejorar la eficacia y seguridad de este anticuerpo, se han desarrollado unas NPs de sílice mesoporosa cargadas con bevacizumab y DOX, con las que se obtiene al mismo tiempo la inhibición de VEGF y una reducción de la toxicidad causada por la DOX (15).
- **Terapias inhibitorias del proteosoma.** El bortezomib (BTZ) es un inhibidor del proteosoma. La administración libre de este fármaco se ve limitada por su escasa disponibilidad, difícil administración, resistencia adquirida y toxicidad neuronal, hepática y cardíaca. Para conseguir un uso más eficaz de este fármaco, se ha desarrollado una nanoformulación basada en la encapsulación de BTZ en un liposoma funcionalizado con el péptido NGR (asparagina-glicina-arginina). Este péptido se sitúa en la superficie del liposoma para dirigir a este nanomaterial a las células endoteliales aminopeptidasa N positivo (APN-positivo), presente en los vasos tumorales, mejorando así la capacidad de bortezomib para disminuir el crecimiento celular del NB y minimizar los efectos secundarios” *in vivo*”(16).

### *5.2.2.Terapias dirigidas basadas en la funcionalización con péptidos*

Se ha identificado un péptido como ligando presente en las células del NB de alto riesgo, el péptido HSYWLRS. La conjugación de este péptido con NPs liposomales cargadas de DOX, aumentó la permeabilidad vascular del tumor y la perfusión *in vivo*, aumentando la penetración de la DOX en las células tumorales y la eficacia terapéutica (15).

### *5.2.3.Terapias dirigidas basadas en el uso de miRNA encapsulado en NP*

Los micro-RNAs son pequeñas moléculas de ARN no codificantes capaces de regular múltiples genes a nivel post-transcripcional. Los miRNA tienen una baja biodisponibilidad, por lo que para mejorarla se están probando ensayos clínicos en los que se encapsula el miRNA en NPs de sílice mesoporosa o en liposomas, mejorando así su biodistribución (17).

El miR-34a es un importante supresor del NB. Se llevaron a cabo varios estudios donde se conjugó el anticuerpo anti-GD2 (Dinituximab beta), sobre la superficie de NPs de sílice mesoporosa cargadas con el miR-34a. Se observó una reducción en la vascularización y en el tamaño del tumor. Por lo tanto, el

anti-GD2-NPS-miR-34a podría aumentar de forma significativa la eficacia del tratamiento frente al NB (17).

#### *5.2.4. Teragnosis del NB utilizando la Nanomedicina*

Tanto los agentes terapéuticos como las técnicas de diagnóstico por imagen en el tratamiento del NB, se caracterizan por su elevada toxicidad. Por ello, para disminuir el peligro que conlleva en pacientes de tan corta edad, se han desarrollado terapias con agentes capaces de realizar estas dos acciones al mismo tiempo, diagnóstico y tratamiento (teragnosis), de forma dirigida y localizada, permitiendo así una terapia y un seguimiento más seguro y eficaz.

- **Nanopartículas cargadas con análogos de MIBG**

La meta-iodobencil guanidina (MIBG) marcada con un isótopo radiactivo es una molécula muy utilizada en el diagnóstico por imagen del NB, como se comentó anteriormente. La eficacia de MIBG como vehículo dirigido al tumor también se ha aplicado en el tratamiento terapéutico mediante radiación dirigida con yodo radiactivo (I-131). Se caracteriza porque muestra una elevada afinidad por el transportador de noradrenalina (NET) que se encuentra sobre expresado en el 95% de las células del NB (18). La conjugación de MIBG con fármacos antitumorales no solo mejora su selectividad contra las células tumorales, sino que también mejora su capacidad citotóxica a través del efecto sinérgico causado por la acidificación selectiva del tumor mediante el aumento del flujo glucolítico. Esta sinergia, puede convertir a los análogos de MIBG no radiactivos en importantes agentes de dirección dentro del campo de la nanomedicina. Por ello, se sintetizó un análogo de MIBG (Figura 10), la meta-aminobencil-guanidina (MABG), que gracias a su grupo amino, funciona como punto de unión a distintos materiales como las nanopartículas de sílice mesoporosa, las cuales pueden llevar atrapadas en su interior multitud de agentes quimioterapéuticos. Se probó la eficacia *in vivo* de estos vehículos utilizando modelos de NB murino (Figura 10). Los resultados indican que la funcionalización de la superficie con estos agentes de provoca una acumulación y retención de tejido tumoral significativamente mayor en comparación con las partículas no funcionalizadas (18).

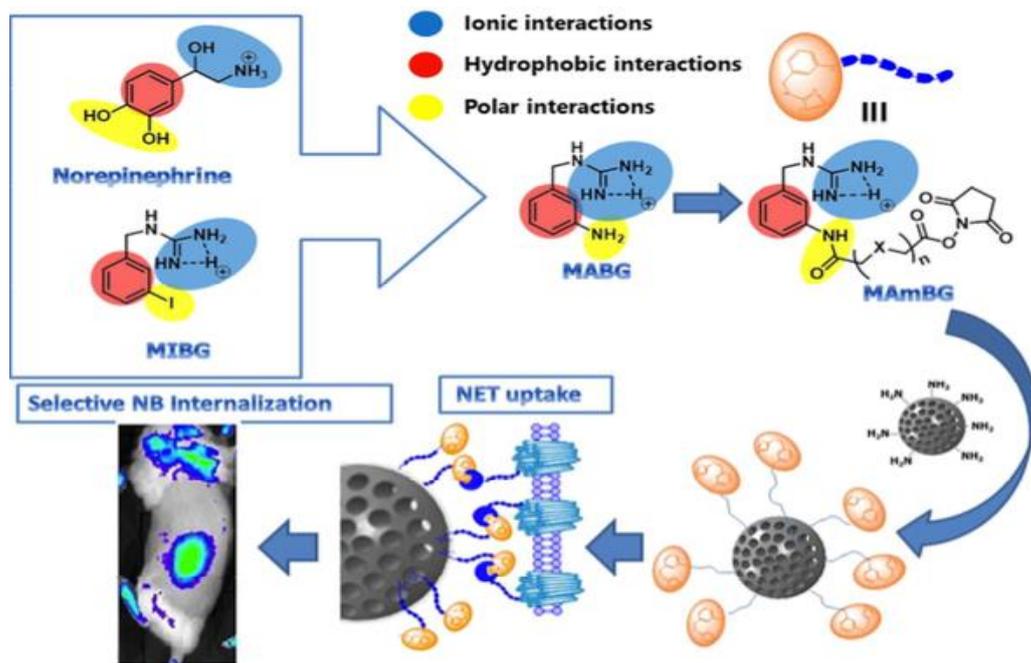


Figura 10. Equivalencia estructural entre análogos de noradrenalina, MIBG y MABG. Nanopartículas de sílice mesoporosa unidas a MABG, que llevan agentes quimioterapéuticos dirigidos contra células de NB de ratón (18).

- **Nanopartículas poliméricas basadas en virus**

- **Nanopartículas de gas (GNPs)**

Se han descrito NPs poliméricas generadas de gas (GNPs) modificadas con glicoproteínas del virus de la rabia (RVG), que pueden dirigirse al receptor nicotínico de la acetilcolina de las células del NB. Estas NPs se cargaron con carbonato cálcico y se administraron vía intravenosa a ratones portadores de NB. Una vez que estas NPs alcanzaron el tumor, el carbonato cálcico se convirtió en microburbujas de  $\text{CO}_2$ , provocado por el ambiente ácido del tumor. Los resultados *in vivo* determinaron que el  $\text{CO}_2$  generado a partir de estas NP era un agente de contraste seguro y específico del tumor para la obtención de imágenes. Además, el  $\text{CO}_2$  generado a partir de RVG-GNP, redujo eficazmente el tamaño del tumor (Figura 11) (19). Así mismo, se añadió a esta nanoformulación DOX, y se administró a ratones portadores de NB. El  $\text{CO}_2$  generado en el microambiente del tumor aceleró la liberación de DOX, logrando una eficacia terapéutica mejorada *in vivo* en comparación con la administración de DOX libre (15,19).

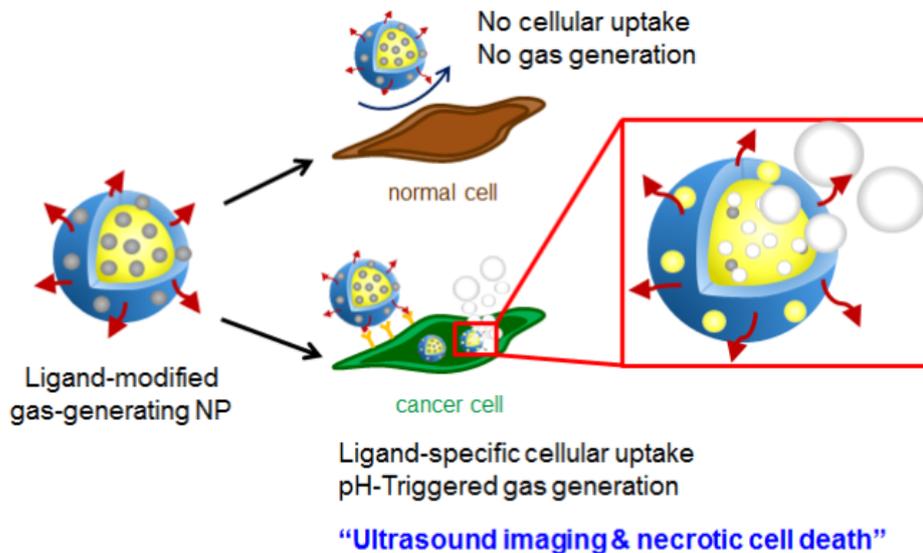


Figura 11. GNPs como agente diagnóstico y de tratamiento seguro en modelos de NB (19).

### ➤ Teragnóstico basado en terapia genética

Como vimos anteriormente, no es extraño el empleo de miRNAs en el tratamiento del NB. Por esta razón, diversos científicos han desarrollado una nueva formulación intravenosa que combina nanopartículas poliméricas de PLG modificadas con glicoproteínas del virus de la rabia (RVG) que llevan en su interior un agente de imagen óptica y genes anticancerígenos (Figura 12). Dichos científicos demostraron que, mediante el marcaje de estas RVG-PNPs con partículas fluorescentes, se conseguía una herramienta muy potente para el diagnóstico molecular por imagen. La eficacia terapéutica de los RVG-PNP se demostró utilizando un modelo murino de NB. Se logró una supresión significativa del crecimiento tumoral sin mostrar citotoxicidad significativa en las células sanas, cuando los ratones fueron tratados con RVG-PNP que contenían un cóctel de miARN cuyos genes diana eran *Mycn*, *Bcl-2* y *Vegf* (20).

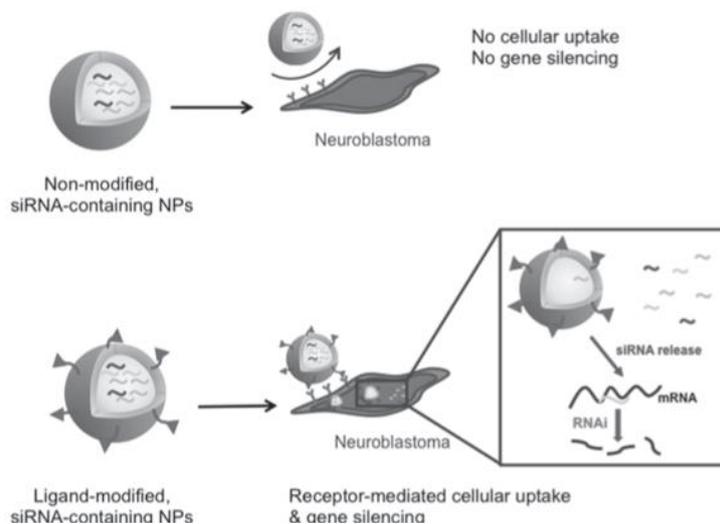


Figura 12. Mecanismo de acción de RVG-PNPs cargadas con siRNAs en células del NB (20).

## CONCLUSIONES

- El neuroblastoma (NB) es una enfermedad de origen embrionario extremadamente heterogénea tanto biológica como clínicamente, lo que dificulta su diagnóstico y tratamiento.
- En los últimos años se han descubierto nuevas proteínas y rutas metabólicas involucradas en el crecimiento y progresión de este tumor.
- Se ha avanzado enormemente en el conocimiento del NB. Sin embargo, actualmente, son pocas las dianas terapéuticas encontradas contra el NB, lo que dificulta el desarrollo de terapias molecularmente dirigidas para pacientes con NB de alto riesgo.
- El uso de terapias convencionales para el tratamiento del NB como la quimioterapia, tienen toxicidad en tejidos sanos, lo que, unido a la falta de dianas terapéuticas contra este tumor, obliga a buscar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas.
- La nanomedicina ha supuesto una potente herramienta contra el NB, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento.
- Gracias a la nanomedicina y a NPs que llevan el agente antitumoral de forma dirigida contra las células del NB, se ha conseguido un tratamiento más personalizado y un aumento de la supervivencia de los pacientes con este tipo de tumor

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jiang, M., Stanke, J., & Lahti, J. M. (2011). The connections between neural crest development and neuroblastoma. *Current topics in developmental biology*, 94, 77-127..
2. Louis, C. U., & Shohet, J. M. (2015). Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annual review of medicine*, 66, 49-63.
3. Cheung, N. K. V., & Dyer, M. A. (2013). Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(6), 397-411.
4. Garner, E. F., & Beierle, E. A. (2016). Cancer stem cells and their interaction with the tumor microenvironment in neuroblastoma. *Cancers*, 8(1), 5.
5. Matthay, K. K., Maris, J. M., Schleiermacher, G., Nakagawara, A., Mackall, C. L., Diller, L., & Weiss, W. A. (2016). Neuroblastoma. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16078. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.78>
6. Ara, T., & DeClerck, Y. A. (2006). Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(4), 645-657.
7. Cortés, M. B. (2018). original: ACTUALIZACIÓN EN NEUROBLASTOMA PARA MEDICINA. *Cell and Tissue Research*, 372, 287-307.
8. Zage, P. E. (2018). Novel therapies for relapsed and refractory neuroblastoma. *Children*, 5(11), 148.
9. Jabbari, P., Hanaei, S., & Rezaei, N. (2019). State of the art in immunotherapy of neuroblastoma. *Immunotherapy*, 11(9), 831-850.
10. Moreno, L., Barone, G., DuBois, S. G., Molenaar, J., Fischer, M., Schulte, J., ... & Pearson, A. D. (2020). Accelerating drug development for neuroblastoma: summary of the second neuroblastoma drug development Strategy forum from innovative therapies for children with cancer and international society of paediatric oncology Europe neuroblastoma. *European Journal of Cancer*, 136, 52-68.
11. Kim, B. Y., Rutka, J. T., & Chan, W. C. (2010). Nanomedicine. *New England Journal of Medicine*, 363(25), 2434-2443.
12. Gómez López, A. (2017). Nanomedicina y su impacto en la práctica médica. *Repert. med. cir*, 129-130.
13. Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2020). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1-24.
14. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical research*, 33(10), 2373-2387.
15. Rodríguez-Nogales, C., Noguera, R., Couvreur, P., & Blanco-Prieto, M. J. (2019). Therapeutic opportunities in neuroblastoma using nanotechnology. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(3), 625-635.

16. Zuccari, G., Milelli, A., Pastorino, F., Loi, M., Petretto, A., Parise, A., ... & Ponzoni, M. (2015). Tumor vascular targeted liposomal-bortezomib minimizes side effects and increases therapeutic activity in human neuroblastoma. *Journal of Controlled Release*, 211, 44-52.
17. Tivnan, A., Orr, W. S., Gubala, V., Nooney, R., Williams, D. E., McDonagh, C., ... & Stallings, R. L. (2012). Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD 2 coated nanoparticles. *PloS one*, 7(5), e38129.
18. Villaverde, G., Baeza, A., Melen, G. J., Alfranca, A., Ramirez, M., & Vallet-Regí, M. (2015). A new targeting agent for the selective drug delivery of nanocarriers for treating neuroblastoma. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(24), 4831-4842.
19. Lee, J., Min, H. S., You, D. G., Kim, K., Kwon, I. C., Rhim, T., & Lee, K. Y. (2016). Theranostic gas-generating nanoparticles for targeted ultrasound imaging and treatment of neuroblastoma. *Journal of Controlled Release*, 223, 197-206.
20. Lee, J., Jeong, E. J., Lee, Y. K., Kim, K., Kwon, I. C., & Lee, K. Y. (2016). Optical imaging and gene therapy with Neuroblastoma- Targeting polymeric nanoparticles for potential theranostic applications. *Small*, 12(9), 1201-1211.