



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
“NANOPARTÍCULAS PARA EL
TRATAMIENTO DEL NEUROBLASTOMA”

Autor: Ana Cubillo Álvarez

Fecha: 19/07/2019

Tutor: Isabel Izquierdo Barba

RESUMEN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más común en el primer año de vida y el tumor más letal durante la infancia. Se caracteriza por tener un comportamiento clínico agresivo y altamente heterogéneo especialmente visible en los casos de regresión o recaída espontánea. Los síntomas clínicos asociados al tumor van a variar en función del origen del tumor, la edad del niño, el estadio tumoral y la presencia o no presencia de metástasis dando a su vez un pronóstico más o menos favorable.

Aunque la quimioterapia combinada intensiva ha mejorado significativamente la tasa de supervivencia de pacientes con diferentes tipos de tumores malignos no tiene tal efecto en bebés y niños con neuroblastoma avanzado o de alto riesgo (IV estadio), donde el tumor es irreseccable y la tasa de respuesta a estas terapias suele ser muy baja, siendo solo el 40% de pacientes los que responden completamente a la quimioterapia.

Por ello, es esencial la introducción de nuevos agentes antitumorales, así como el desarrollo de nuevas terapias dirigidas, entre las que encontramos: la vehiculización de agentes antitumorales en nanopartículas, la inmunoterapia o las moléculas pequeñas inhibitorias, con el objetivo de aumentar la eficacia del tratamiento antitumoral, disminuir los efectos tóxicos que provoca la quimioterapia convencional y personalizar el tratamiento.

 **Palabras clave:** Neuroblastoma, Nanopartículas, Terapias dirigidas, Cáncer, Quimioterapia, Inmunoterapia, Biomateriales, Nuevas estrategias terapéuticas.

ABSTRACT

Neuroblastoma is the most challenging extracranial solid childhood tumor and it is associated with the greatest rate of death in paediatric oncology. It is characterized by aggressiveness and highly heterogeneous clinical behavior which is especially visible in spontaneous regression or relapsed cases. Clinical symptoms associated with the tumor are going to vary depending on the localization of the primary tumor, the child's age, the tumor stage and the presence or absence of metastasis which will conclude in better or poorly outcomes.

Although intensive multiagent chemotherapy has significantly improved the survival rate of patients with different types of tumors, it has no such effect in high-risk neuroblastoma patients (IV stage), where tumor is irresectable and the response rate to these therapies is usually very low. Only 40% of patients show a complete response to chemotherapy.

For this reason is completely essential the introduction of novel anticancer agents, in addition to the development of new targeted therapies such as: nanocarriers vehicles, immunotherapy or inhibitory small molecules, which have the purpose of enhancing the effectiveness, reducing residual toxicity produced by conventional chemotherapy and having tailored treatments.

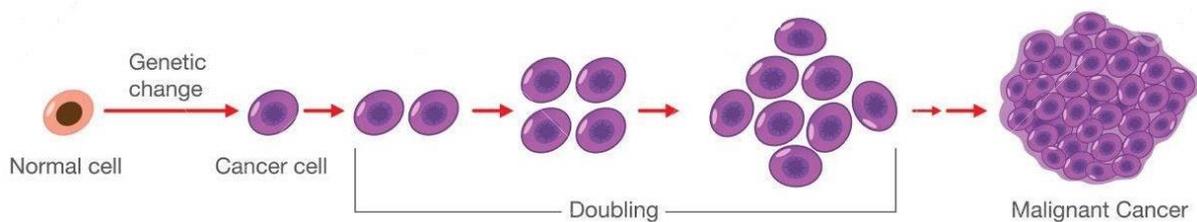
- **Keywords:** *Neuroblastoma, Nanocarriers, Targeted therapies, Cancer, Chemotherapy, Immunotherapy, Biomaterials, Novel therapeutic strategies.*

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El neuroblastoma (NB) es un tipo de cáncer embrional, representa el 7% del total de cánceres en la población pediátrica y es el responsable del 15% de muertes por cáncer infantil ⁽¹⁾.

Se suele diagnosticar durante el primer año de vida, aproximadamente el 40% de los pacientes son menores de un año mientras que menos de un 5% de los pacientes superan los diez años de edad ⁽²⁾.

Los procesos cancerosos están principalmente originados por mutación de proto-oncogenes que codifican para ciertas proteínas implicadas en el control del ciclo celular y de genes supresores de tumores que codifican para proteínas encargadas de inducir la apoptosis celular. El resultado de estas alteraciones va a suponer un exceso en los procesos de proliferación y diferenciación celular que darán lugar a la formación de un tumor ⁽³⁾.



La evolución de células sanas hacia el desarrollo de una masa tumoral maligna se produce tras la acumulación de múltiples mutaciones durante el proceso de mitosis. Estas mutaciones van a producir un descontrol en el ciclo celular haciendo que las células se multipliquen sin control.

Mientras que para los cánceres no metastásicos localizados, como el neuroblastoma de bajo riesgo (estadios I y II), la extirpación quirúrgica sería la base del tratamiento.

Para los cánceres metastásicos, entre los que se encuentra el neuroblastoma de alto riesgo (estadios IV y IVS), el uso de quimioterapia neoadyuvante, adyuvante y de mantenimiento es imprescindible ya que la mayoría de estos tumores son irresecables.

La quimioterapia está basada en la inhibición de células de rápido crecimiento, característica de las células cancerosas. Sin embargo, no es una terapia selectiva por lo que también afectará a células sanas que tengan un ciclo rápido de proliferación. La destrucción indiscriminada de células sanas provocada por la quimioterapia convencional va a dar lugar a serios problemas toxicidad, junto con el desarrollo de resistencia a múltiples fármacos remarca la necesidad de encontrar nuevas terapias dirigidas que sean efectivas basadas en los cambios de la biología molecular del tumor ^(3,4).

En los últimos años se han realizado grandes avances en la comprensión de la biología molecular del neuroblastoma. La siguiente fase y el actual objetivo, es la integración todos los nuevos conocimientos adquiridos a cerca de la genética y la biología de la enfermedad para mejorar la predicción del pronóstico del neuroblastoma y favorecer el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más precisas y menos tóxicas, permitiendo que existan terapias personalizadas para los niños con esta enfermedad. Dirigiendo las terapias intensas a niños que verdaderamente las necesiten evitando así, el tratamiento innecesario y minimizando la morbilidad en aquellos pacientes que no sea necesario ^(5, 6).

Es por ello, que la **nanomedicina** está gradualmente ganando relevancia en el área de la oncología.

Esta incluye diferentes tipos de sistemas coloidales a escala nanométrica que permiten la encapsulación de múltiples agentes antitumorales, mejorando la permeabilidad y retención del fármaco en la célula cancerosa. Además, las nanopartículas se pueden funcionalizar mediante la conjugación a su superficie de pequeños péptidos o anticuerpos monoclonales con el fin de administrar selectivamente los fármacos vehiculizados a los tejidos tumorales.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio bibliográfico es analizar el desarrollo de:

- Nuevas estrategias terapéuticas con el fin de dirigir directa o indirectamente la terapia antitumoral a los tejidos cancerosos, aumentando la eficacia terapéutica y disminuyendo los efectos tóxicos adversos.
- Nuevos biomarcadores que puedan ser útiles en para la terapia dirigida frente al neuroblastoma.
- Terapias personalizadas que incrementen la supervivencia para los pacientes diagnosticados con neuroblastoma de alto riesgo y disminuyan la toxicidad asociada al tratamiento en pacientes con neuroblastoma de intermedio y bajo riesgo.

Se profundizará principalmente en el posible futuro uso de la nanomedicina como alternativa a la quimioterapia convencional.

Finalmente se analizará la utilidad de las nanopartículas en el diagnóstico de la enfermedad.

METODOLOGÍA

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos, se ha realizado una búsqueda bibliográfica mediante la utilización de diferentes bibliotecas y bases de datos entre las que encontramos: Pubmed (NCBI), Google Scholar, Up To Date, Medline, Elsevier y ClinicalKey entre otras.

La búsqueda se realizó en inglés, utilizando palabras clave como "*Neuroblastoma*", "*Nanocarriers*", "*Nanoparticles*", "*Cancer*", "*Chemotherapy*", "*Inmunotherapy*", "*Biomaterials*", "*Targeted therapies*" y "*Novel therapeutic strategies*".

Posteriormente, se seleccionaron y estudiaron los artículos de interés.

En cuanto a la selección, se restringió la búsqueda a aquellas publicaciones disponibles en lengua inglesa o castellano publicados en los últimos 20 años.

Por otro lado, el estudio de las publicaciones de interés se realizó prestando especial atención al *abstract* y a las conclusiones de cada artículo.

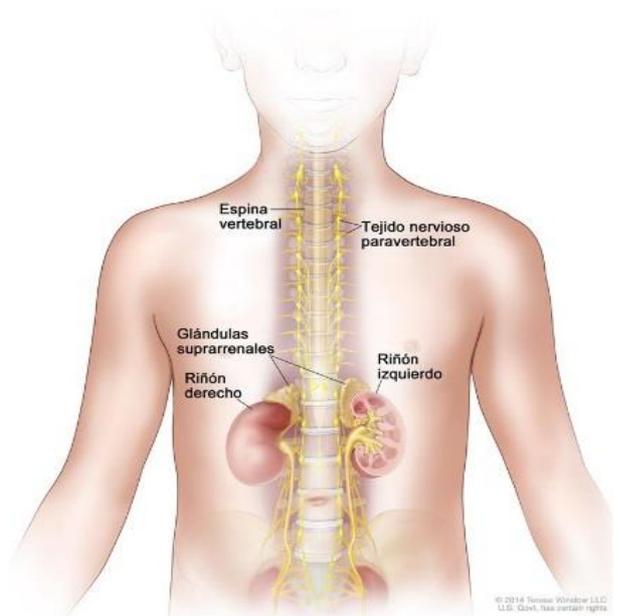
De las publicaciones seleccionadas y estudiadas se incluyeron además otras referencias provenientes de fuentes primarias, revistas académicas y instituciones oficiales que desarrollan su labor en el campo de la oncología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Etiopatogenia y Clasificación del Neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es el tumor extracráneo sólido más común en la infancia. Es un cáncer de origen embrional que afecta a las células precursoras del sistema nervioso simpático, normalmente originado en las glándulas suprarrenales o en el tejido nervioso paravertebral desde el cuello a la pelvis. El tumor se puede desarrollar en cualquier zona a lo largo del sistema nervioso simpático, sin embargo la localización del tumor primario más frecuente tiende a ser el abdomen ⁽⁵⁻⁷⁾.

Se caracteriza por ser una enfermedad altamente heterogénea; en la que el tumor puede disminuir o desaparecer espontáneamente, incluso sin tratamiento, o bien puede exhibir un fenotipo maligno muy agresivo con una muy baja tasa de respuesta a la terapia intensiva multimodal.



El comportamiento clínico de la enfermedad va a estar influenciado por una serie de factores claves: el estadio tumoral (1, 2, 3, 4 y 4S), la edad en el diagnóstico, la histopatología y la genética molecular del tumor ⁽⁸⁾.

Marcadores biológicos moleculares

- **Amplificación del proto-oncogen MYCN:** marcador genético de la agresividad del tumor. Está asociado a baja efectividad terapéutica y resultados clínicos desfavorables, independientemente de la edad, localización y las características clínicas del tumor.
- **Ploidía:** los tumores primarios triploides o hiperdiploides han mostrado pronósticos más favorables a comparación de aquellos diploides.
- **Mutación del gen ALK:** Mutación germinal oncoiniadora del neuroblastoma junto con el gen MYCN. Se correlaciona con una supervivencia más precaria en pacientes con neuroblastoma de riesgo intermedio y alto.
- **Anomalías cromosómicas segmentarias (delección de los CRM 1p y 11q):** están relacionadas con la amplificación de MYCN, mostrando un peor pronóstico.
- **Sobreexpresión del gen TERT:** Alteración genómica que favorece el alargamiento de los telómeros, está altamente relacionada con la edad de diagnóstico y se asocia a mayores tasas de mortalidad.
- **Otros marcadores:** ligandos de receptores tirosin-kinasa (Trk-A y Trk-B), mutación del gen PHOX2B y de ATRX.

Basándonos en las variables clínicas y biológicas los lactantes y niños diagnosticados con neuroblastoma se pueden clasificar en 3 grupos de riesgo: bajo, intermedio y elevado riesgo de recidiva ⁽⁴⁻⁹⁾.

Esta clasificación es usada para definir las diferentes estrategias terapéuticas.

- **Neuroblastoma de bajo riesgo** → Resección total del tumor y únicamente si tras la cirugía se detecta amplificación del gen MYCN se suplementaría con quimioterapia y radioterapia de mantenimiento.
- **Neuroblastoma de riesgo intermedio** → El tratamiento habitual incluiría cuatro ciclos de quimioterapia neoadyuvante, con el objetivo de disminuir el tamaño del tumor, previos a la intervención quirúrgica. En este caso, deberíamos administrar radioterapia de mantenimiento a pacientes sintomáticos que no han respondido adecuadamente a la quimioterapia inicial.
- **Neuroblastoma de alto riesgo** → El tratamiento base estaría compuesto por:
 - Tratamiento de inducción: administración de quimioterapia intensiva neoadyuvante seguida de la intervención quirúrgica.
 - Tratamiento de consolidación: se administra quimioterapia adyuvante, con el fin de eliminar los posibles restos cancerígenos, combinada con un trasplante autólogo de células madre y radioterapia local.
 - Tratamiento de mantenimiento: incluye ácido retinóico con el fin de diferenciar las células malignas restantes y el uso de isotretinoína en combinación con anticuerpos antiGD₂.

Aproximadamente la mitad de los pacientes diagnosticados con neuroblastomas son clasificados como de alto riesgo, quienes presentan una media de supervivencia del 50% a pesar de la duración, intensidad y toxicidad del tratamiento ⁽⁴⁻⁹⁾.

2. Integración de la nanomedicina en el tratamiento del neuroblastoma

Actualmente, la nanotecnología es considerada una de las estrategias más novedosas para la administración de fármacos frente a tumores cancerígenos.

Los productos basados en nanotecnología se están utilizando ampliamente, tanto en la clínica y la administración y distribución de fármacos, como en el diagnóstico de la enfermedad.

Los “**nanocarriers**” o “nanotransportadores” son sistemas coloidales caracterizados por tener un tamaño de partícula submicrónica, normalmente menor de 400 nm, en los cuales el fármaco está atrapado dentro de la matriz coloidal de la nanopartícula o recubierto en la superficie de la partícula a través de conjunción o adsorción.

Estos se caracterizan por tener la capacidad de alterar diversas propiedades básicas y la bioactividad de los fármacos citotóxicos, mejorando notablemente las propiedades farmacocinéticas y la biodistribución de los mismos. Como resultado se observará un aumento en la eficacia terapéutica con la aparición de efectos adversos mínimos. Además, mejoran la solubilidad y estabilidad protegiendo el fármaco de una degradación prematura, reducen el aclaramiento renal incrementando el tiempo de vida media del fármaco en el torrente sanguíneo y permiten una liberación controlada del fármaco en el lugar específico de acción ya sea de forma pasiva o activa ^(10, 11).

2.1 Clasificación de las nanopartículas (NPs)

Diversos nanomateriales han sido desarrollados y estudiados para el diagnóstico y la administración de diferentes agentes citotóxicos.

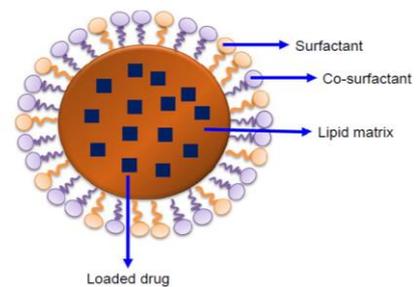
Encontramos tres tipos de nanopartículas que pueden vehicular diferentes agentes terapéuticos: Orgánicos, inorgánicos e híbridos.

o Nanopartículas Orgánicas

Las nanopartículas orgánicas están basadas en moléculas orgánicas naturales o sintéticas. Una de sus características más importantes es que ofrecen rutas relativamente simples para la encapsulación de materiales. Esto, junto con el hecho de que las moléculas utilizadas para su fabricación pueden ser biodegradables, hace de las NPs orgánicas uno de los sistemas más atractivos para el suministro de medicamentos y aplicaciones biomédicas ⁽¹²⁾. Entre todas ellas, vamos a destacar:

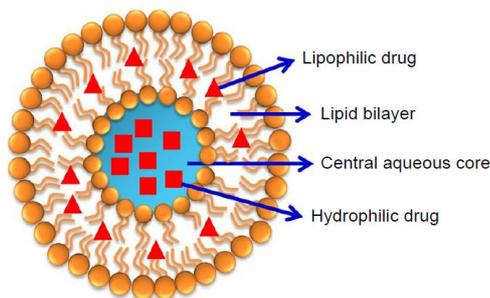
- **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLNs):**

transportadores coloidales de tamaño nanométrico. Por su naturaleza, permiten incorporar fármacos lipófilos e insolubles en agua; aunque recientes avances en la investigación de SLNs han hecho posible la incorporación de fármacos hidrófilos e iónicos. Estas ofrecen numerosas ventajas entre las que destacamos: mayor estabilidad, liberación del fármaco controlada, buena tolerancia (ausencia de toxicidad), elevada capacidad de carga, aumento de la biodisponibilidad de fármacos poco solubles y producción a gran escala fácil y económica ^(11,12).

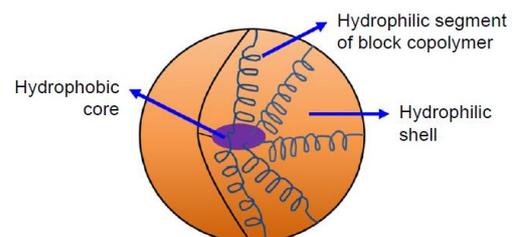


Esquema de un SLN

- #### - **Liposomas, vesículas y micelas poliméricas:** nanopartículas coloidales esféricas cuyo núcleo hidrófilo está rodeado por una o varias bicapas lipídicas compuestas por fosfolípidos anfifílicos. Este hecho, les permite encapsular fármacos hidrófilos e hidrófobos. Pueden ser unilaminares (UVs) o multilaminares (MLVs), lo que les permite encapsular más de un agente terapéutico. Además, son altamente versátiles pudiendo controlar su tamaño, carga de superficie y uso. Por otro lado, permiten funcionalizar su superficie con ligandos dirigidos al tumor utilizados en diversas terapias dirigidas ^(3,11,12).



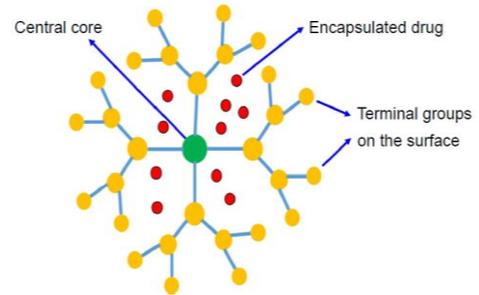
Estructura de un liposoma



Estructura de una micela polimérica

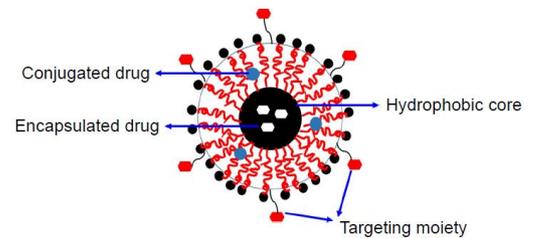
- **Dendrimeros:** moléculas poliméricas tridimensionales altamente ramificadas de tamaño nanoscópico. El diseño de esta nanopartícula ofrece un control extraordinario sobre la forma, el tamaño, la longitud de las ramificaciones y la funcionalización de la superficie que permite la conjugación de múltiples moléculas.

Los fármacos pueden ser encapsulados de forma no covalente en el núcleo del dendrímico o bien, pueden conjugarse covalentemente a su superficie permitiendo personalizar los perfiles de liberación del fármaco mediante procesos de despolimerización controlados ^(3,11).



- **Nanopartículas poliméricas (PNPs):** sistemas esféricos coloidales biodegradables de tamaño nanométrico, entre los que diferenciamos:

- Nanoesferas: el fármaco se dispersa en la matriz polimérica.
- Nanocápsulas: el fármaco es disuelto en el núcleo líquido (hidrófilo o lipófilo) y encapsulado por una membrana sólida polimérica.



Esquema de Nanopartícula Polimérica (PNPs)

Estos nanocarriers son el vehículo más efectivo para terapias dirigidas de larga duración frente al cáncer ^(3,11).

- o Nanopartículas inorgánicas

Las nanopartículas inorgánicas están emergiendo como un nuevo sistema de administración de fármacos debido a las propiedades físicas tan especiales que tienen, entre las que se incluyen: propiedades ópticas, magnéticas, electrónicas y catalíticas dependientes del tamaño. Estas nanopartículas poseen elevada estabilidad, gran área de superficie, abundantes y diferentes funciones fisicoquímicas y diversos comportamientos biológicos específicos ⁽¹³⁾.

Entre ellas encontramos algunas como los nanotubos de carbono (CNTs), las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs) y las nanopartículas magnéticas (MNP).

- **Nanotubos de carbono (CNTs):** redes hidrófobas tubulares de carbono atómico. Son nanopartículas formadas por una o varias láminas de grafeno enrolladas entre sí formando una estructura en forma de tubo, dando lugar a CNTs de pared simple (SWCNTs) y de pared múltiple (MWCNTs) ⁽¹¹⁾.

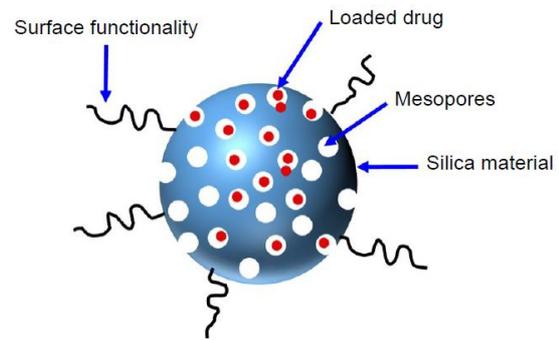
Su mayor inconveniente es que es totalmente insoluble dando lugar a problemas de toxicidad. Sin embargo, la funcionalización de su superficie permite superar estos obstáculos haciendo de estos nanotransportadores un vehículo biocompatible, no biodegradable y poco inmunogénico. Su alta e inherente elasticidad permite la posibilidad de administrar intracelularmente los fármacos mostrando efectos tóxicos mínimos ⁽¹³⁾.

- **Nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs):**

Nanomateriales caracterizados por ser capaces de albergar grandes cantidades de fármacos gracias a su arquitectura tipo panal que incluye cientos de poros de diámetro nanoscópico.

Las MSN están siendo muy utilizadas en el campo de la nanomedicina por sus excelentes propiedades como alta versatilidad sintética, elevada capacidad de carga terapéutica y bajo coste de elaboración.

Además, su superficie puede ser fácilmente funcionalizada, con una o varias dianas terapéuticas, mejorando la citotoxicidad y selectividad, y aumentando la concentración de antineoplásico dentro de las células malignas mediante la interacción ligando-receptor ⁽¹¹⁾.



Esquema de una Nanopartícula de sílice mesoporosa (MSNs)

- **Nanopartículas Magnéticas (MNPs):** Preparadas a partir de suspensiones coloidales estables de MNPs en medios líquidos, compuestos normalmente de óxidos de hierro. Tienen la capacidad de actuar específicamente en las células malignas disminuyendo así la exposición sistémica de los componentes citotóxicos. La focalización de las MNPs al tumor lo consiguen gracias a su comportamiento magnético, que hará que un campo magnético externo les haga de guía. Además, estos nanomateriales permiten la funcionalización de su superficie que disminuye el riesgo de formación de aglomerados y elimina la magnetización remanente; aumentando la bioestabilidad y biodegradabilidad y disminuyendo los efectos adversos tóxicos. Su mayor limitación es su gran dependencia al tamaño, esto es debido a que MNPs mayores de 200 nm son captadas por el bazo y menores de 10 nm se eliminan fácilmente vía renal ⁽¹⁰⁾.

Además, estos nanomateriales permiten la funcionalización de su superficie que disminuye el riesgo de formación de aglomerados y elimina la magnetización remanente; aumentando la bioestabilidad y biodegradabilidad y disminuyendo los efectos adversos tóxicos.

Su mayor limitación es su gran dependencia al tamaño, esto es debido a que MNPs mayores de 200 nm son captadas por el bazo y menores de 10 nm se eliminan fácilmente vía renal ⁽¹⁰⁾.

Su mayor limitación es su gran dependencia al tamaño, esto es debido a que MNPs mayores de 200 nm son captadas por el bazo y menores de 10 nm se eliminan fácilmente vía renal ⁽¹⁰⁾.

2.2 Mecanismos de focalización y funcionalización de la superficie de nanopartículas

Los nanomateriales están diseñados para ser administrados vía intravenosa. Van a realizar una acción sistémica con la capacidad de localizar el tejido tumoral permitiendo la acumulación y el alcance de mayores concentraciones terapéuticas del fármaco dentro de la masa tumoral.

Los *nanocarriers* son capaces de localizar los tumores sólidos mediante difusión pasiva gracias al microentorno característico y diferente adyacente a las células tumorales, terapias dirigidas activas a la masa tumoral mediante la funcionalización de la superficie de la nanopartícula con una fracción química que tenga afinidad por un marcador específico que se encuentre sobreexpresado en tejido tumoral, o bien, mediante el desencadenamiento de la liberación de la carga útil de un nanotransportador sensible al entorno, mediante un estímulo local como el pH o la temperatura ⁽¹⁴⁾.

Mecanismo Pasivo

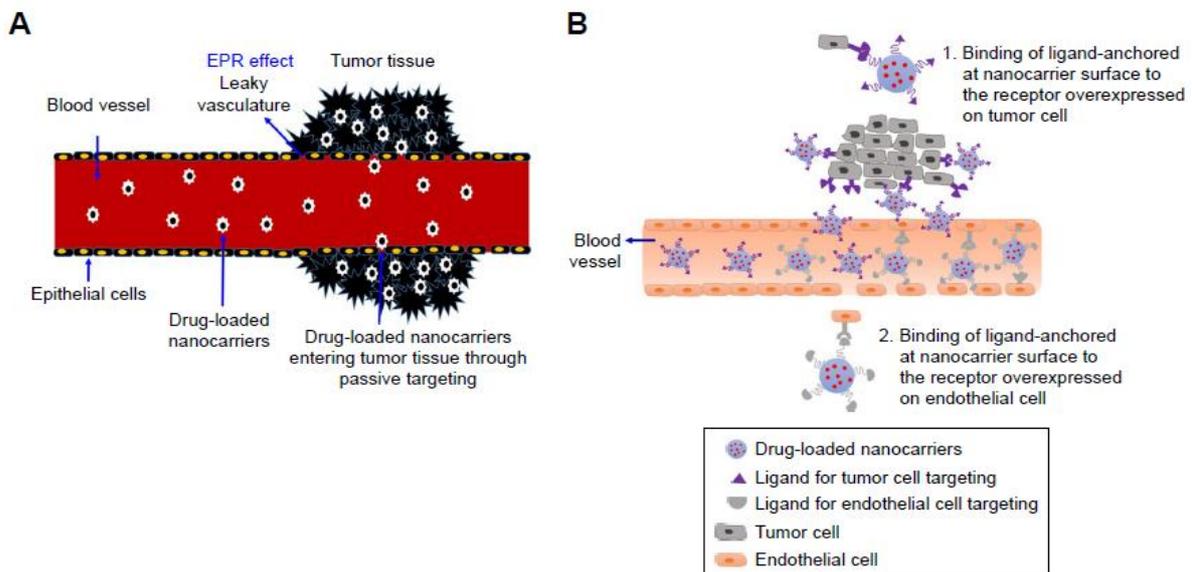
Los nanomateriales como liposomas, nanopartículas poliméricas o micelas, se van a acumular en los tejidos tumorales generalmente por el incremento de la permeabilidad y el efecto de retención (*EPR effect*), causado durante el proceso angiogénico en el cual, con el objetivo de aumentar el drenaje linfático, se produce la formación de nuevos vasos sanguíneos altamente permeables que conducen a los nanomateriales a la ubicación del tumor, liberando los fármacos citotóxicos en un lugar más próximo a las células tumorales.

Sin embargo, las diferencias entre el modelo animal y los pacientes reales, así como la menor penetración de los nanomateriales en el tejido tumoral seleccionado, son las mayores desventajas de la focalización pasiva que no pueden ser ignoradas.

- **Nanopartículas de PLGA cargadas con cisplatino**

El cisplatino es un agente quimioterápico altamente utilizado. Sin embargo, su efecto terapéutico está limitado por la dosis debido a que en elevada dosis produce malestar gastrointestinal y nefrotoxicidad.

Gracias al desarrollo de nanopartículas biodegradables de PLGA cargadas con este agente terapéutico, se ha conseguido un aumento de la concentración de fármaco en las proximidades de la masa tumoral potenciado por el efecto EPR, mejorando notablemente la eficacia terapéutica. Además, estas nanopartículas permiten una liberación controlada del fármaco lo que se traduce en una disminución significativa de la toxicidad y el aumento de la seguridad del medicamento ⁽¹⁵⁾.



(A) **Mecanismo pasivo:** las NPs son capaces de llegar al tejido tumoral gracias al incremento de permeabilidad.

(B) **Mecanismo activo:** la funcionalización de la superficie de NPs con moléculas que se encuentran sobreexpresados en el microambiente tumoral permite la liberación de los fármacos en la ubicación de la masa tumoral debido al reconocimiento ligando-receptor.

Mecanismo Activo

En los tumores tanto las células epiteliales como las estromales van a expresar marcadores de superficie accesibles desde la circulación, que son indetectables o se encuentran inaccesibles en los tejidos sanos. Estos marcadores pueden ser utilizados como dianas terapéuticas para dirigir selectivamente al agente anticancerígeno a la localización del tumor ⁽¹⁶⁾.

Para utilizar este enfoque, es necesario controlar la química involucrada en la funcionalización de la superficie de las nanopartículas con ligandos “dirigidos” altamente específicos, como anticuerpos monoclonales, péptidos, carbohidratos y vitaminas, que puedan usarse como puntos de unión al ser reconocidos por los diferentes receptores o antígenos sobreexpresados en las células cancerígenas ⁽¹⁷⁾.

El resultado de este mecanismo va a ser el aumento de la eficacia terapéutica evitando la multirresistencia de fármacos (MDR).

Esto se debe a que además de permitir la liberación del contenido citotóxico cerca del tumor, la nanopartícula será capaz de unirse a la membrana de las células tumorales y, en algunos casos, podrá ser internalizada en las células donde se liberaría su contenido.

3. Nanoterapias dirigidas para el neuroblastoma

Actualmente se están llevando a cabo diversos estudios clínicos que involucran diferentes clases de nanopartículas en el tratamiento del neuroblastoma infantil.

Más concretamente, nos centraremos en la búsqueda de nuevas terapias dirigidas y alternativas terapéuticas, como los reservorios de seda, que aumentan la afinidad de la NP al tejido tumoral permitiendo la captación específica del fármaco.

○ Terapias dirigidas basadas en Anticuerpos monoclonales (Ac mc)

La gran heterogeneidad del NB va a dar lugar a un amplio rango de fenotipos celulares diferentes. En estos, se van a observar diversos tipos de marcadores celulares que se encuentran sobreexpresados y que pueden contribuir en el proceso cancerígeno.

Por eso la identificación y el bloqueo de estos marcadores puede ser una alternativa muy útil en el tratamiento de la enfermedad. Por un lado, una vez se haya identificado el fenotipo conseguiríamos una terapia farmacológica más personalizada; por otro lado, estos marcadores servirían de guía para el desarrollo de una terapia dirigida más efectiva y con menos efectos tóxicos secundarios.

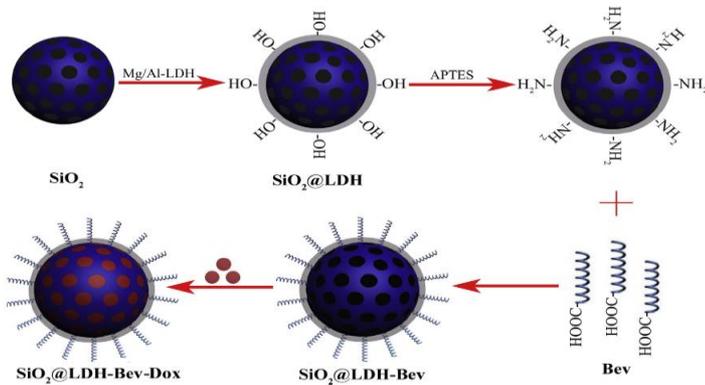
➤ Terapia Anti-GD2 mAb

La mayoría de los fenotipos de NB tienen elevados niveles de disialogangliósido (GD₂), por ello se han desarrollado múltiples anticuerpos frente al GD₂ como el **dinutuximab**. Este agente terapéutico es muy usado en la quimioterapia de mantenimiento, sin embargo, dosis prolongadas de este agente dan lugar a toxicidad neuropática. Con el objetivo de mejorar los datos de supervivencia general, reducir la toxicidad y aumentar la seguridad en la administración, se ha desarrollado un nuevo método basado en la funcionalización de la superficie de NP metálicas, principalmente de hierro u oro, con el anticuerpo anti-GD₂, dinutuximab, observando un aumento significativo de la eficacia evitando el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos (MRD) ^(1,18-20).

➤ **VEGF como diana terapéutica**

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) juega un papel esencial en el proceso de angiogénesis tumoral y está altamente expresado en el NB de alto riesgo. El anticuerpo monoclonal, **bevacizumab**, se une selectivamente a esta proteína inhibiendo el proceso de angiogénesis que resultará en la muerte celular.

Por ello se ha diseñado un nuevo nanocompuesto donde el bevacizumab se encuentra conjugado a nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas de doxorrubicina (DOX).



Formación de Nanopartículas de SiO₂@LDH conjugadas con Bevacizumab (Bev) cargadas con doxorrubicina (DOX)

Este nanomaterial proporciona una nueva alternativa para el uso seguro y eficaz del bevacizumab y la doxorrubicina. Va a contribuir la inhibición del VEGF, mejorando la eficacia angiogénica. Además de evitar los efectos adversos de la DOX, disminuyendo principalmente la toxicidad cardíaca y la hepatotoxicidad ⁽²¹⁾.

➤ **Terapias inhibitorias del proteasoma**

El **bortezomib (BTZ)** es un inhibidor de primera clase del proteasoma cuya libre administración se ve limitada por la aparición de efectos tóxicos y fármaco-resistencia. La inhibición del proteasoma causa la acumulación de diversas proteínas que limitarán la supervivencia celular.

Para obtener un uso más efectivo y eficaz, se ha desarrollado una nueva nanoformulación basada en la encapsulación de BTZ en un liposoma funcionalizado con el péptido NGR. Este se acopla en la superficie del liposoma para dirigirlo a las células endoteliales APN-positivo presente en los vasos sanguíneos angiogénicos ⁽²²⁾.

○ Terapias dirigidas basadas en la funcionalización con péptidos

Con el fin de mejorar el índice terapéutico disminuyendo la toxicidad de los tratamientos, se ha identificado y desarrollado un nuevo péptido, llamado **HSYWLRS**, que actúa como ligando específico de las células del NB de alto riesgo ⁽¹⁶⁾.

La eficacia de este péptido como ligando para el desarrollo de un sistema de liberación dirigido se estudió mediante su conjugación a nanopartículas liposomales cargadas de DOX. Este nanomaterial es capaz de desencadenar el efecto EPR, aumentando la penetración de DOX en las células tumorales y la eficacia terapéutica.

Este aumento de eficacia terapéutica se va a conllevar una inhibición significativa del crecimiento del tumor y una supervivencia mejorada en modelos preclínicos de NB ^(16,23).

- Terapias dirigidas basadas en el uso de miRNA encapsulados en nanopartículas

Debido a los diversos mecanismos que pueden provocar la resistencia a múltiples fármacos en el neuroblastoma, es posible que el enfoque de las terapias a una única diana terapéutica no sea suficiente para tratar la enfermedad con éxito.

Las **terapias epigenéticas** tienen como objetivo revertir las alteraciones existentes en el patrón epigenético de las células tumorales y son capaces de actuar a nivel de distintos procesos celulares. Dentro de estas encontramos el uso de *micro-RNAs* (miRNA).

Los **miRNAs** son pequeñas moléculas de ARN no codificantes capaces de regular la expresión de múltiples genes a nivel post-transcripcional ⁽²⁴⁾.

Están diseñados para su administración IV o subcutánea. Sin embargo, la administración de micro-RNAs en forma libre da como resultado una biodisponibilidad bastante baja debido a que se van a concentrar mayoritariamente en el hígado donde se metabolizan y eliminan rápidamente ^(24,25). Por ello, se están utilizando estrategias, entre las que destaca la encapsulación en nanomateriales como liposomas y nanopartículas de sílice mesoporosa (MSNs), que permitan mejorar la biodistribución de los miRNAs.

Actualmente, se han descubierto y desarrollado numerosos miRNAs que actúan o regulan algunas de las propiedades oncogénicas que influyen en el neuroblastoma, con el objetivo de limitar la capacidad metastásica de las células de NB.

❖ **miR-34a**

Este microRNA se ha identificado como un importante supresor del NB.

Va a inducir la activación de una vía apoptótica mediada por caspasas cuando se sobreexpresa en las líneas celulares de neuroblastoma, reduciendo así, la proliferación celular. Sin embargo, se encuentra en una región cromosómica comúnmente delecionada en esta enfermedad, haciendo de su administración una terapia idílica para combatir el NB ^(24,25).

Además, está directamente relacionado con la actividad del gen MYCN. La sobreexpresión de miR-34a inhibe a MYCN bloqueando el factor de crecimiento endotelial y vascular, disminuyendo la angiogénesis.

Por tanto, el objetivo principal es conseguir desarrollar una terapia de miRNAs dirigida a la localización tumoral. Para ello, se llevaron a cabo varias estrategias como la encapsulación de miR-34a en liposomas. Sin embargo, los resultados de este modelo podían ser mejorables, por ello se conjugó el anticuerpo GD₂, dinituximab (ch14.18), sobre la superficie de nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas de miR-34a.

Esta novedosa formulación, permite una mayor acumulación de nanopartículas en la localización del tumor gracias a la elevada especificidad de las anti-GD₂-NPs. Además, debido a las propiedades de las MSNs se consigue una mayor capacidad de carga de la droga, así como la liberación de esta de manera constante, lo que va a resultar en un aumento de las señales apoptóticas y, por tanto, un aumento de la muerte celular.

Como resultado de la combinación de las acciones antiangiogénica y antiproliferativa con la sobreexpresión de miR-34a, se puede observar una gran reducción en la vascularización del tumor y en el crecimiento y tamaño de la masa tumoral. Por lo tanto, el uso de anti-GD₂-NPs-miR-34a podría aumentar de forma significativa la eficacia del tratamiento frente al neuroblastoma ⁽²⁵⁾.

❖ ALK-siRNAs

La mayoría de los diferentes fenotipos de NB se caracterizan por tener los genes MYCN y ALK mutados. Ambos genes se encuentran muy cercanos uno del otro en el cromosoma, siendo normal que la amplificación del locus de MYCN implique la amplificación de el del gen ALK. Por ello, la administración localizada de pequeños RNA dirigidos específicamente a combatir la mutación de ALK puede mejorar considerablemente el pronóstico de la enfermedad.

El crizotinib es el único inhibidor de ALK aprobado por la FDA. Sin embargo, su limitada actividad en el NB provocada por la adquisición de resistencia al fármaco ha promovido el desarrollo de X-396, un nuevo inhibidor de tirosina-kinasa bien tolerado, con elevada actividad antitumoral y menor toxicidad sistémica gracias a que su mayor selectividad. La combinación de la actividad antitumoral del X-396 con liposomas cargados de ALK-siRNA, aumenta favorablemente la eficacia de la terapia dirigida frente al NB, en comparación con la administración de crizotinib ⁽²⁶⁾.

Como resultado de los estudios realizados, se observa una potente caída en el gen ALK que da lugar a la inhibición del crecimiento celular y a un aumento de la supervivencia.

○ Reservorios de seda

Uno de los objetivos más importantes en el tratamiento del NB es el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos dirigidos con el fin de mejorar el índice terapéutico, la eficacia y la calidad de vida de los pacientes.

Diversos sistemas, entre los que se incluyen las micro y nanopartículas, han sido estudiados para mejorar el transporte sistémico de diferentes agentes quimioterápicos. Sin embargo, los efectos tóxicos de algunos fármacos persisten ⁽²⁷⁾. Para estos fármacos se necesitaría otra alternativa terapéutica, como los reservorios de seda.

La seda es un excelente candidato para transportar fármacos debido a su estructura química que le permite interactuar con moléculas hidrofóbicas, hidrofílicas y cargadas. Además, es biocompatible, biodegradable, altamente versátil, permite una liberación controlada de medicamentos y provoca baja respuesta inmunogénica ^(27,28).

Actualmente se están realizando diferentes estudios en los cuales se evalúa la eficacia de este material en el tratamiento del NB. En ellos, se han empleado altas dosis de fármacos tóxicos de difícil manejo como: doxorubicina (DOX), cisplatino y vincristina.

Una vez formados los reservorios de seda, estos se implantarán durante la cirugía directamente en el centro del tumor donde los fármacos se irán liberando poco a poco, evitando efectos tóxicos secundarios que provoca la quimioterapia sistémica convencional.

La implantación de estos sistemas permite la administración local de quimioterapia, aumentando la eficacia, seguridad y comodidad del tratamiento y disminuyendo los efectos tóxicos relativos a los fármacos, lo que va a mejorar la adherencia general al tratamiento completo, que suele ser muy baja en la mayoría de los casos de NB de alto riesgo ^(27, 28).

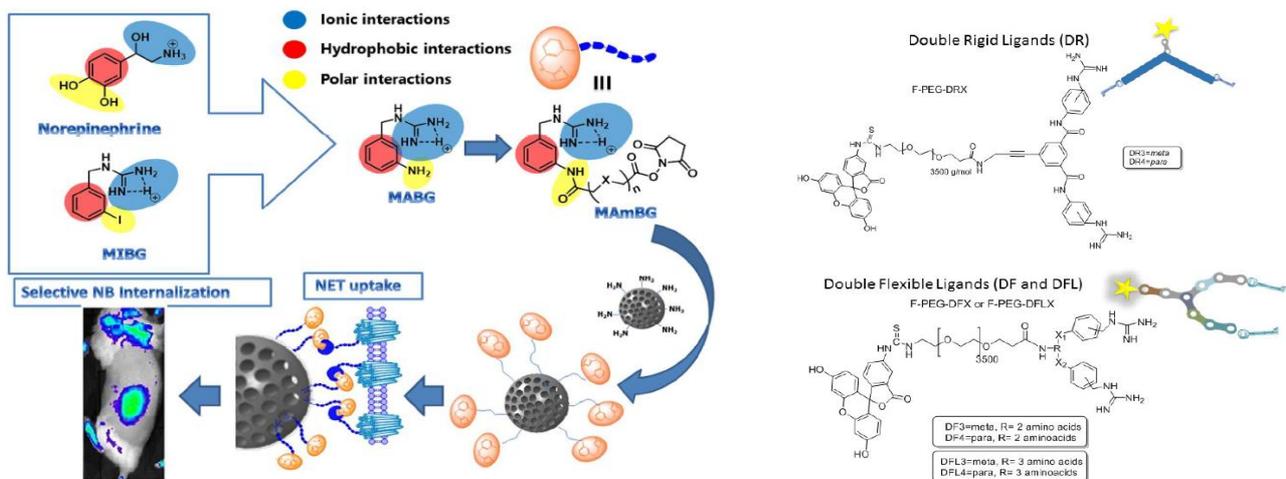
4. Alternativas terapéuticas para el teragnóstico del neuroblastoma

Los agentes terapéuticos y las diferentes técnicas de diagnóstico por imagen para el tratamiento del cáncer se caracterizan por su toxicidad potencial. Debido a la elevada peligrosidad de estos agentes en niños menores de dos años, actualmente se han desarrollado terapias con agentes que son capaces de realizar esta doble acción, diagnóstico y tratamiento (*teragnóstico*), de forma dirigida y localizada permitiendo una terapia más segura y eficaz, así como, su seguimiento.

Nanopartículas cargadas con análogos de MIBG

La *meta-iodobencil guanidina* (MIBG) marcada con un isótopo radioactivo es una molécula muy utilizada en el diagnóstico por imagen del NB. Se caracteriza porque muestra una elevada afinidad por el transportador de noradrenalina (NET) que se encuentra sobreexpresado en el 95% de las células del NB (29, 30).

La conjugación de MIBG con agentes antitumorales no solo mejora la selectividad terapéutica, sino que además incrementa el poder citotóxico de estos. Por ello, se sintetizó *meta-aminobencil guanidina* (MABG) un análogo de MIBG que gracias a su grupo amino, funciona como punto de unión a distintos nanomateriales como MSNs, los cuales pueden llevar atrapados en su interior multitud de agentes quimioterápicos (29).



Recientemente, se ha desarrollado una familia de nuevas moléculas en forma de “Y” (“Y-shaped scaffolds”) cuyo esqueleto de longitud y composición variable, contiene análogos de MIBG. Estas tienen la capacidad de conjugarse con diferentes nanopartículas y ser internalizadas por las células, acumulándose en el tejido tumoral.

Estas moléculas van a actuar como agentes dobles. Gracias a su estructura tan especial, estas moléculas serán capaces de unirse a los marcadores de superficie mediante dos puntos de unión, pudiendo actuar como sistemas de transporte y liberación de fármacos dirigidos o bien como agentes de imagen para el diagnóstico (30).

✚ Nanopartículas poliméricas basadas en virus (VNPs)

Con el objetivo de disminuir la agresividad y toxicidad de las técnicas de imagen, así como de diseñar un tratamiento personalizado del neuroblastoma de alto riesgo se han desarrollado varias novedosas terapias basadas en el uso de nanopartículas de PLG modificadas en su superficie con *glicoproteínas del virus de conejo (RVG)*.

Se ha descubierto que las RVG actúan como un ligando selectivo del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) de las células neuronales, el cual es altamente abundante en NB.

Por tanto, la unión específica de las glicoproteínas del virus a su receptor va a permitir dirigir la terapia únicamente a las células cancerígenas, aumentando considerablemente la selectividad de los agentes terapéuticos y de imagen ^(31, 32).

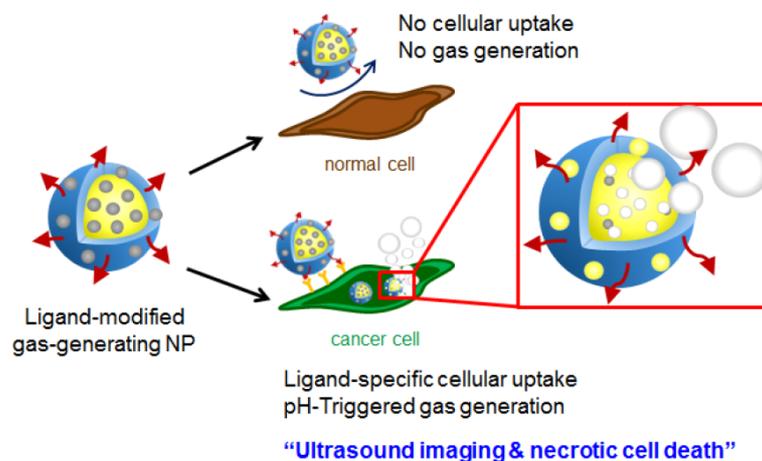
- **Nanopartículas de gas (GNPs)**

Una de las aplicaciones más interesantes del dióxido de carbono (CO₂) es su uso como agente de contraste, ya que es de los pocos agentes que se pueden denominar como “seguros”. Sin embargo, las *microburbujas* suelen ser inestables en el torrente sanguíneo la mayoría de las veces no consiguen llegar a su diana terapéutica.

Para superar estas limitaciones se han desarrollado nanopartículas conjugadas con RVG que llevan minerales de carbonato de calcio encerrado en su interior.

El carbonato cálcico es insoluble a pH neutro, este pH es el que se encuentra en las células sanas. Sin embargo, en condiciones ácidas (pH 5.0) se descompone rápidamente produciendo dióxido de carbono gaseoso. Una de las características de todas las células tumorales es el aumento exagerado del metabolismo celular, este aumento va a provocar la acidificación del medio. Por lo tanto, la liberación de CO₂ desencadenada por el cambio de pH permite diferenciar de forma efectiva y segura el tejido tumoral de los tejidos sanos mediante el uso de la técnica de imagen por ultrasonido.

Además de su aplicación como agente de contraste para el diagnóstico de la enfermedad, las GNPs van a mostrar actividad anticancerígena. Estas causan la muerte de las células tumorales mediante la inducción de necrosis celular en la localización del tumor debido a la formación de especies de oxígeno reactivas y las condiciones isquémicas del ambiente tumoral ⁽³¹⁾.



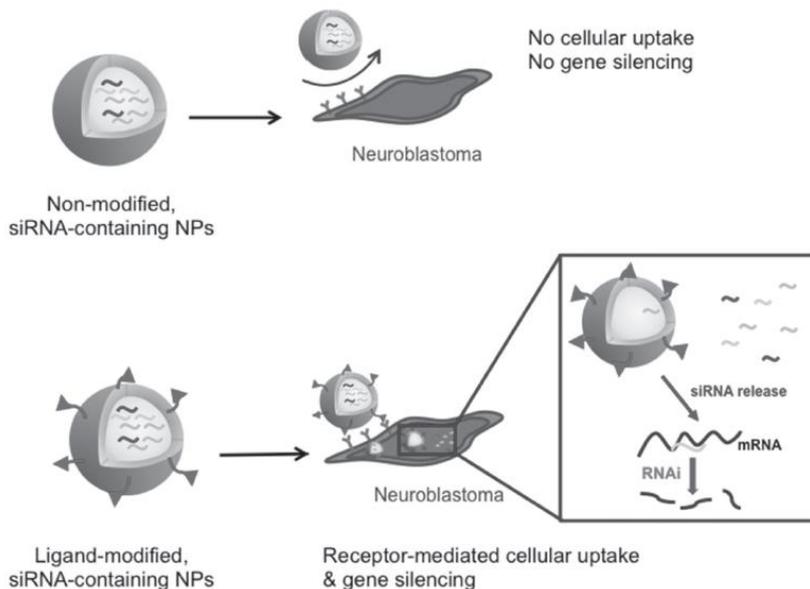
GNP como agente doble. Permite la detección de la masa tumoral de forma segura y eficaz mediante imagen US, así como la disminución del tamaño tumoral mediante la activación de necrosis celular.

- Teragénico basado en terapia génica

Como ya hemos visto, no es extraño el empleo de miRNAs en el tratamiento del NB. Por esta razón, se ha desarrollado y estudiado una nueva formulación intravenosa basada en nanopartículas poliméricas de PLG modificadas con glicoproteínas de virus (RVG) que llevan encapsuladas en su interior un agente de imagen óptica y genes anticancerígenos. Lo que permite que actúen como agentes terapéuticos y de diagnóstico simultáneamente haciendo posible la monitorización a tiempo real del tratamiento, así como la progresión de la enfermedad.

En los estudios realizados se ha empleado un "cocktail de miRNAs" cuyos genes dianas eran entre otros: BCL-2, VEGF y MYC. Los resultados del estudio mostraron la elevada eficacia en el silenciamiento de genes *in vitro* e *in vivo*, lo que daba lugar a la muerte del tejido tumoral y su correspondiente disminución de tamaño sin mostrar citotoxicidad significativa en las células sanas ⁽³²⁾.

Además, mediante el marcaje de estas RVG-PNPs con partículas fluorescentes, conseguimos una herramienta muy potente para el diagnóstico molecular por imagen. Gracias a la composición de las nanopartículas, se van a acumular en el interior de la masa tumoral dando lugar a fuertes señales fluorescentes.



Mecanismo de acción de RVG-PNPs cargadas con siRNAs en células del NB

CONCLUSIÓN

Aunque se ha avanzado enormemente en el conocimiento global de la enfermedad, el principal obstáculo continúa siendo la compleja biología de la enfermedad. El tumor puede variar de localización, apariencia histopatológica y características biológicas, lo que le hace altamente heterogéneo dificultando el tratamiento y el pronóstico.

En los últimos años, el interés científico se ha centrado en el descubrimiento de nuevas proteínas y rutas moleculares involucradas específicamente en la progresión y crecimiento del tumor.

Sin embargo, la escasez de mutaciones somáticas y la falta de dianas terapéuticas limitan la oportunidad de desarrollar terapias molecularmente dirigidas para pacientes con NB de alto riesgo.

La tasa general de supervivencia una vez superado los 5 años en el NB es solamente del 45% a pesar de recibir terapias multimodales intensivas. Además una gran mayoría de niños con NB en tratamiento son refractarios a las terapias convencionales o bien, sufren recaídas. Los fármacos quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento del NB tienen toxicidad en tejidos sanos, por ello es necesario el diseño de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas.

La nanotecnología proporciona potentes herramientas para el diagnóstico por imagen, el tratamiento y la prevención de procesos cancerígenos, entre los que encontramos el neuroblastoma. Sin embargo la reducción de la toxicidad y de los efectos secundarios provocados por la quimioterapia, no están aún correlacionadas con un aumento sostenido de la tasa de supervivencia total. Por esta razón, en la actualidad se están realizando grandes esfuerzos para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas que mejorarían la eficacia del tratamiento mediante el aumento de concentración de los agentes terapéuticos en el tumor reduciendo la exposición sistémica y por tanto, los efectos tóxicos secundarios.

Entre las diferentes alternativas que se han estudiado, vamos a destacar el uso de terapias genéticas en combinación con nanopartículas modificadas con un ligando ya que nos permiten desarrollar terapias dirigidas y personalizadas a cada paciente según el fenotipo de NB.

BIBLIOGRAFIA

1. Rodríguez-Nogales C, Noguera R, Patrick C, Blanco-Prieto MJ. Therapeutic opportunities in neuroblastoma using nanotechnology. *J Pharmacol Exp Ther*. 11 de enero de 2019.
2. MacFarland S, Bagatell R. Advances in neuroblastoma therapy. *Curr Opin Pediatr*. febrero de 2019;31(1):14-20.
3. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*. junio de 2015;93:52-79.
4. Barrena Delfa S, Rubio Aparicio P, Martínez Martínez L. Neuroblastoma. *Cir Pediatr*. abril 2018;31(2):57-65.
5. Johnsen JI, Dyberg C, Fransson S, Wickström M. Molecular mechanisms and therapeutic targets in neuroblastoma. *Pharmacol Res*. 2018;131:164-76.
6. Van Arendonk KJ, Chung DH. Neuroblastoma: Tumor Biology and Its Implications for Staging and Treatment. *Children (Basel)* 17 de enero de 2019;6(12).
7. Barrie S, Rich, Michael P. La Quaglia. Neuroblastoma, *Pediatric Surgery*: 441-458. 2012. UpToDate.

8. Jason M Shohet, MD, PhD; Jed G Nuchtern, MD, FACS, FAAP. Treatment and prognosis of neuroblastoma. Marzo 2019. UpToDate.
9. Davidoff AM. Neuroblastoma. *Semin Pediatr Surg.* febrero de 2012;21(1):2-14.
10. Mandal A, Bisht R, Pal D, Mitra AK. Chapter 4 - Diagnosis and Drug Delivery to the Brain: Novel Strategies. *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices.* Boston: Elsevier; 2017;4:59-83.
11. Din F ud, Aman W, Ullah I, Qureshi OS, Mustapha O, Shafique S, et al. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int J Nanomedicine.* 5 de octubre de 2017;12:7291-309.
12. Romero G, E. Moya S. Synthesis of Organic Nanoparticles. En: de la Fuente JM, Grazu V, editors. *Nanobiotechnology - Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles.* Vol. 4. Spain: Elsevier; 2012. p. 115-141
13. Pandey P, Dahiya M. A Brief Review on Inorganic Nanoparticles. *J Crit Rev.* 2 de julio de 2016;3(3):18-26.
14. Wolinsky JB, Colson YL, Grinstaff MW. Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *Journal of Controlled Release.* 10 de abril de 2012;159(1):14-26.
15. Moreno D, Zalba S, Navarro I, Tros de Ilarduya C, Garrido MJ. Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 1 de febrero de 2010;74(2):265-274.
16. Loi M, Di Paolo D, Soster M, Brignole C, Bartolini A, Emionite L, et al. Novel phage display-derived neuroblastoma-targeting peptides potentiate the effect of drug nanocarriers in preclinical settings. *J Control Release.* 10 de septiembre de 2013;170(2):233-41.
17. Jølck, R. I., Feldborg, L. N., Andersen, S., Moghimi, S. M., & Andresen, T. L. Engineering Liposomes and Nanoparticles for Biological Targeting. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* 2010; 125: 251-280.
18. Voeller J, Sondel PM. Advances in Anti-GD2 Immunotherapy for Treatment of High-risk Neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* abril de 2019;41(3):163-9.
19. Keyel ME, Reynolds CP. Spotlight on dinutuximab in the treatment of high-risk neuroblastoma: development and place in therapy. *Biologics.* 2019;13:1-12.
20. Sait S, Modak SI. Anti-GD2 immunotherapy for neuroblastomas. *Expert Rev Anticancer Ther.* octubre de 2017;17(10):889-904.

21. Zhu R, Wang Z, Liang P, He X, Zhuang X, Huang R, et al. Efficient VEGF targeting delivery of DOX using Bevacizumab conjugated SiO₂@LDH for anti-neuroblastoma therapy. *Acta Biomater.* 2017;63:163-80.
22. Zuccari G, Milelli A, Pastorino F, Loi M, Petretto A, Parise A, et al. Tumor vascular targeted liposomal-bortezomib minimizes side effects and increases therapeutic activity in human neuroblastoma. *J Control Release.* 10 de agosto de 2015;211:44-52.
23. Cossu I, Bottoni G, Loi M, Emionite L, Bartolini A, Di Paolo D, et al. Neuroblastoma-targeted nanocarriers improve drug delivery and penetration, delay tumor growth and abrogate metastatic diffusion. *Biomaterials.* noviembre de 2015;68:89-99.
24. Boloix A, París-Coderch L, Soriano A, Roma J, Gallego S, Sánchez de Toledo J, et al. Nuevas estrategias terapéuticas para el neuroblastoma basadas en el uso de microRNAs. *An Pediatr (Barc).* 1 de agosto de 2016;85(2):109.e1-109.e6.
25. Tivnan A, Orr WS, Gubala V, Nooney R, Williams DE, McDonagh C, et al. Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD2 coated nanoparticles. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e38129.
26. Di Paolo D, Yang D, Pastorino F, Emionite L, Cilli M, Daga A, et al. New therapeutic strategies in neuroblastoma: combined targeting of a novel tyrosine kinase inhibitor and liposomal siRNAs against ALK. *Oncotarget.* 6 de octubre de 2015;6(30):28774-89.
27. Yavuz B, Zeki J, Taylor J, Harrington K, Coburn JM, Ikegaki N, et al. Silk Reservoirs For Local Delivery Of Cisplatin For Neuroblastoma Treatment: In Vitro And In Vivo Evaluations. *J Pharm Sci.* 21 de marzo de 2019;1-8.
28. Coburn JM, Na E, Kaplan DL. Modulation of vincristine and doxorubicin binding and release from silk films. *Journal of Controlled Release.* 28 de diciembre de 2015;220:229-238.
29. Villaverde G, Baeza A, Melen GJ, Alfranca A, Ramirez M, Vallet-Regí M. New targeting agent for the selective drug delivery of nanocarriers for treating neuroblastoma. *J Mater Chem B.* 10 de junio de 2015;3(24):4831-42.
30. Villaverde G, Alfranca A, Gonzalez-Murillo Á, Melen GJ, Castillo RR, Baeza A, et al. Molecular Scaffolds as Double-Targeting Agents For the Diagnosis and Treatment of Neuroblastoma. *Angewandte Chemie International Edition.* 15 de abril de 2019.
31. Lee J, Min H-S, You DG, Kim K, Kwon IC, Rhim T, et al. Theranostic gas-generating nanoparticles for targeted ultrasound imaging and treatment of neuroblastoma. *J Control Release.* 10 de febrero de 2016;223:197-206.
32. Lee J, Jeong EJ, Lee YK, Kim K, Kwon IC, Lee KY. Optical Imaging and Gene Therapy with Neuroblastoma-Targeting Polymeric Nanoparticles for Potential Theranostic Applications. *Small.* 2 de marzo de 2016;12(9):1201-1211.

33. Gamble LD, Purgato S, Murray J, Xiao L, Yu DMT, Hanssen KM, et al. Inhibition of polyamine synthesis and uptake reduces tumor progression and prolongs survival in mouse models of neuroblastoma. *Sci Transl Med.* 30 de enero de 2019;11(477).