

Artículo original

APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E HIPERtermIA PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER DE PÁNCREAS

Oihane Ibarrola Moreno <https://orcid.org/0000-0002-9089-6925>¹;
Ángel del Pozo Pérez <https://orcid.org/0000-0002-2211-9200>¹;
Andrés Arbona Celaya <https://orcid.org/0000-0002-8529-1868>²

1. Ingeniera superior Química, Biokeralty, Álava, España.
2. Licenciado en Ciencias Químicas, Biokeralty, Álava, España.

RESUMEN

El adenocarcinoma ductal de páncreas es una enfermedad huérfana y de muy mal pronóstico, incluso cuando se diagnostica precozmente. La tasa de supervivencia después de 5 años es inferior al 5% y no ha cambiado en los últimos 30 años a pesar de los tremendos esfuerzos en las etapas preclínica y clínica. En los últimos años, el uso de enfoques basados en nanotecnología se ha aplicado para la detección y tratamiento de múltiples enfermedades. En este contexto, el consorcio NoCanTher ha estado trabajando para escalar bajo condiciones GMP (Good Manufacturing Practices) e ISO una nanoformulación basada en nanopartículas magnéticas para una terapia combinada contra esta enfermedad. Así mismo, ha sido necesaria la producción del equipo de hipertermia y la consecución de los estudios regulatorios de toxicidad in vitro e in vivo. Todos los lotes fueron fabricados en salas blancas GMP e ISO 13485 (1) y cumplieron con las especificaciones definidas. Todos los ensayos, tanto in vitro como in vivo, arrojaron buenos resultados en cuanto a la seguridad de las nanopartículas. Gracias al Proyecto Nocerther, se ha podido comenzar con un ensayo clínico de seguridad con un tratamiento totalmente innovador para tratar el adenocarcinoma de páncreas con nanopartículas magnéticas e hipertermia.

Palabras clave: Cáncer de Páncreas; Nanopartículas Magnéticas; Hipertermia; Producción de Nanopartículas.

DOI: <https://doi.org/10.26852/01234250.634>

Recibido: 18/01/2023

Aceptado: 10/02/2023

Correspondencia: oihane.ibarrola@keralty.com

APPLICATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES AND HYPERTHERMIA FOR THE TREATMENT OF PANCREATIC CANCER

ABSTRACT

Pancreatic ductal adenocarcinoma is an orphan disease with a very poor prognosis, even when diagnosed early. The survival rate after 5 years is less than 5% and has not changed in the last 30 years despite tremendous efforts in the preclinical and clinical stages. In recent years, the use of nanotechnology-based approaches has been applied for the detection and treatment of multiple diseases. In this context, the NoCanTher consortium has been working to scale up under GMP (Good Manufacturing Practices) and ISO conditions and evaluate a nanoformulation based on magnetic nanoparticles for a combination therapy against this disease. All batches were manufactured in GMP and ISO 13485 clean rooms and met the defined specifications. All the tests, both in vitro and in vivo, gave good results regarding the safety of the nanoparticles. Thanks to the Nocanther Project, it has been possible to start a clinical safety trial with a totally innovative treatment to treat pancreatic adenocarcinoma with magnetic nanoparticles and hyperthermia.

Keywords: Pancreatic cancer, Magnetic Nanoparticles, Hyperthermia, Nanoparticle Production.

INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma ductal de es la séptima causa de muerte por cáncer. Actualmente, la única opción potencialmente curativa es la resección quirúrgica, pero sólo se puede aplicar a tumores localizados de etapa temprana, que constituyen menos del 20% de los casos en el momento del diagnóstico y tiene una morbimortalidad elevada.

Por ello es urgente el desarrollo de tratamientos efectivos para esta enfermedad, y dado que los enfoques estándar no han proporcionado ninguna mejora significativa, el uso de nuevas estrategias terapéuticas podría ser la solución para este caso particular. En este marco, la nanotecnología proporciona una novedosa y original solución mediante la hipertermia magnética, que se basa en el uso de nanopartículas magnéticas para inducir de forma remota un aumento de temperatura en los tejidos y órganos tumorales cuando se aplica un campo magnético de radiofrecuencia. En particular, se están investigando activamente las nanopartículas de óxido de hierro como terapia combinada a través de tratamientos de hipertermia magnética.

El objetivo principal del proyecto Nocanther es el desarrollo de nanopartículas magnéticas y trasladarlas hasta el desarrollo clínico temprano para el cáncer de páncreas.

Para lograr este objetivo se han definido los siguientes objetivos secundarios:

- Alcanzar un escalado nanoterapéutico en condiciones certificadas desde la síntesis en el laboratorio hasta su implementación en ensayos clínicos.
- Diseñar e implementar diferentes estudios preclínicos in vitro e in vivo que permitan obtener datos preliminares de seguridad y eficacia de las nanopartículas desarrolladas.
- Desarrollar la documentación pertinente (incluyendo en dossier de dispositivo médico en investigación) para la aprobación por parte de los comités de ética y las agencias reguladoras (AEMPS) de un ensayo clínico de seguridad.

METODOLOGÍA

Para alcanzar los objetivos (2) establecidos en el proyecto (3) ha sido necesaria la producción regulatoria de las nanopartículas magnéticas (4,5), la producción del equipo de hipertermia (6,7), así como la consecución de los estudios regulatorios de toxicidad in vitro e in vivo (8).

Producción y escalado de Nanopartículas Magnéticas:

- a) Ruta Regulatoria: La ruta regulatoria llevada a cabo ha tenido como objetivo la solicitud de Marcado CE de conformidad con las Regulaciones de Dispositivos Médicos (UE) 2017/745 (9) del Parlamento Europeo.

TABLA 1. NORMAS APLICADAS ESCALADO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	
EN ISO 780:2015	Embalaje. Embalaje de distribución. Símbolos gráficos para el manejo y almacenamiento de paquetes.
EN ISO 1041:2008 + A1:2013	Información suministrada por el fabricante de dispositivos médicos.
EN ISO-10993-1:2010	Evaluación biológica de dispositivos médicos-Parte 1: Evaluación y prueba dentro de un proceso de gestión de riesgos
EN ISO 11137-1:2015	Esterilización de productos sanitarios. Radiación Parte 1. Requisitos para el desarrollo, validación y control de rutina de un proceso de esterilización de dispositivos médicos.
EN ISO 13485:2016	Dispositivos médicos. Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos para fines regulatorios.
EN ISO 14155:2012	Investigación clínica de dispositivos médicos para seres humanos-Buena práctica clínica
EN ISO 14971:2012	Dispositivos médicos. Aplicación de la gestión de riesgos a los dispositivos médicos.
EN ISO 15223-1:2016	Dispositivos médicos. Símbolos que se utilizarán con las etiquetas de los dispositivos médicos, el etiquetado y la información que se suministrará. Requerimientos generales.
BS EN 60601-1:2006 + A12:2014	Equipo eléctrico médico. Requisitos generales de seguridad básica y funcionamiento esencial.
BS EN 62366-1:2015	Dispositivos médicos. Aplicación de la ingeniería de usabilidad a los dispositivos médicos.

- b) Gestión del Riesgo (10): Se ha realizado un análisis de riesgos para poder valorar los riesgos en las diferentes etapas del Proyecto NoCanTher. Para ello, se ha establecido un plan de evaluación y monitoreo para minimizar los riesgos tanto en la etapa de producción como en la etapa clínica.

El Plan de Análisis de Riesgos realizado se define a continuación:

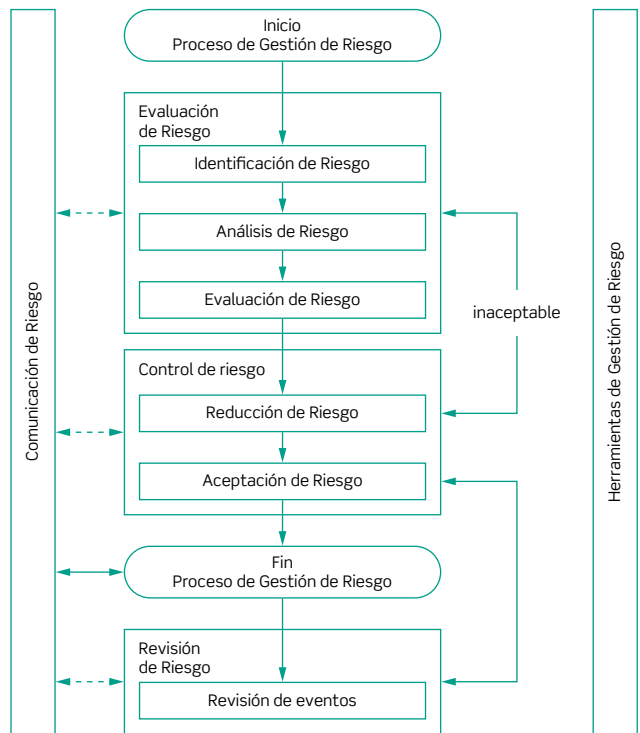


FIGURA 1. Proceso de análisis de riesgos.

- c) Escalado y producción de Nanopartículas Magnéticas (11): La optimización y validación de la fabricación de las nanopartículas magnéticas cumple con la Directiva de Dispositivos Médicos 93/42/EEC cumpliendo con los siguientes objetivos: Optimización de la fabricación, validación de técnicas analíticas, validación de las técnicas de caracterización, elaboración de procedimientos normalizados

de trabajo, auditoría ISO 13485, evaluación de deficiencias, emisión de Certificado ISO13485, diseño y aprobación de acondicionamientos primarios y secundarios elaboración del PMF (Product Master File), fabricación de los lotes bajo condiciones ISO y realización de estudios de estabilidad (los resultados cumplieron con las especificaciones dentro de los primeros seis meses para estudios de condiciones aceleradas y veinticuatro meses para estudios de largo plazo).

Para la fabricación de las nanopartículas, los lotes han sido fabricados (12,13) en salas blancas GMP e ISO 13485 (14).



FIGURA 2. Viales de lotes sintetizados para los ensayos normativos toxicológicos y de estabilidad.

Todos los lotes certificados han sido caracterizados para verificar las propiedades de las nanopartículas (15-17).

TABLA 2. ESPECIFICACIONES DE LOS LOTES DE NANOPARTÍCULAS

CONTROL DE CALIDAD FINAL DEL PRODUCTO	
Apariencia. Método visual	Líquido con coloración marrón claro a marrón oscuro sin precipitación de partículas visible.
pH. pH-metro	4-7,5
Tamaño agregado de partículas. Nanosight NS300 SPAN = (D90-D10)/D50 Nanosight NS300	90-180nm ≤ 1,2
Potencial Zeta. Zetasizer nano	[-20 a +20 mV]
Contenido en hierro. AAS	≥50 mg/ml
Endotoxinas. D Kinetic method	≤ 1,6 EU/mg
SAR (Tasa de Absorción Específica)	≥ 10 W/g
Análisis Termogravimétrico (TGA)	≥ 10% coating

Estudios Normativos de Toxicidad In Vitro (18,19)

- a) Estudio de irritación cutánea mediante una prueba in vitro con el modelo Epiderm®.
- b) Estudio de citotoxicidad en la línea celular PANC-1: El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del elemento de prueba (MNP), sobre la viabilidad celular en la línea celular de un tumor epitelial pancreático humano PANC-1.
- c) Pruebas de Hemocompatibilidad (I)-Hemólisis y Aglutinación: Este estudio abarcó dos pruebas de hemocompatibilidad, diseñadas según lo indicado en la norma UNE-EN ISO 10993-4 (20).
- d) Prueba de Hemocompatibilidad (II)- Hemoglobina libre: El presente estudio complementa el estudio incluido en el GLPs DDUNAV 007/19 y añade una prueba de hemólisis, diseñada según lo indica la norma UNE-EN ISO 10993- 4.

Estudios Normativos de Toxicidad In Vivo

Se realizó el diseño experimental in vivo necesario y la creación de un sistema de gestión de calidad de acuerdo con las mejores prácticas con respecto a los principios

de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) de animales in-vivo en las pruebas reglamentarias de medicamentos (de acuerdo con las directivas CE2001/82/EC (21), 2001/83/EC (22) y de acuerdo también con la Directiva 2010/63/EU (23). El diseño experimental in vivo será por lo tanto acreditado a las normas ISO con el fin de proporcionar estándares de calidad en el trabajo realizado (por ejemplo, ISO 15189 (24) y/o ISO 9001 (25).

- a) Estudios intravenosos NOAEL en ratas (I): resultados del rango de dosis. Como parte de la evaluación preclínica de la toxicidad, el propósito de este estudio fue definir la dosis máxima a utilizar en estudios.
- b) Estudios intravenosos NOAEL en ratas (II)–clínicos y ex vivo: Este protocolo incluye la evaluación de la toxicidad después de su administración por vía intravenosa única en ratas.
- c) Estudios intravenosos NOAEL en ratas (III)–polarización de macrófagos: En el grupo final de experimentos realizados como parte del estudio intravenoso NOAEL en ratas, se han llevado a cabo mediciones de los niveles de IL12 en suero con y sin administración de las MNP.
- d) Evaluación del potencial de sensibilización de la piel mediante el ensayo de los ganglios linfáticos locales (LLNA:DA): Según norma UNE-EN ISO 10993-10.
- e) Estudio de reactividad intracutánea en conejos: Este protocolo incluyó un estudio de reactividad intracutánea (intradérmica) en conejos, diseñado según lo indica la norma UNE EN ISO 10993-10..f (26) Análisis de toxicología tisular ex vivo: Este estudio se realizó mediante el análisis microscópico de diferentes órganos (hígado, riñón, bazo, pulmón y ganglios linfáticos) de 6 ratones (3 tratados con NOC001 + Hipertermia y 3 en grupo de control) con tumores subcutáneos de células cancerosas MiaPaCa2.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

Producción y escalado de Nanopartículas Magnéticas: Todos los lotes certificados han sido caracterizados para verificar las propiedades de las nanopartículas, cumpliendo con las especificaciones establecidas así como con ISO 13485.

Estudios Normativos de Toxicidad In Vitro (27-30):

- a) Estudio de irritación cutánea mediante una prueba in vitro con el modelo Epiderm®: La viabilidad media de los tres tejidos individuales para las NOC, una vez aplicada la corrección, fue del 90,42% (superior al 50%). Por lo tanto, de acuerdo con la directriz de la OCDE, el objeto de ensayo se clasificó como NO IRRITANTE.
- b) Estudio de citotoxicidad en la línea celular PANC-1: Los resultados de viabilidad celular para los diferentes ensayos (NOC a 3; 1, 0,3 y 0,1 mg/mL) fueron de 99100%, 90% y 89%, respectivamente. Estos datos suponen una disminución en la viabilidad con respecto al excipiente (CN) de un 1%, 0%, 10% y 11%. Aplicando el criterio de que una sustancia se considera citotóxica cuando hay una disminución en la viabilidad superior al 30%, el producto NOC en estas condiciones de prueba, a una concentración igual o inferior a 3 mg de hierro/ml, puede calificarse de NO CITOTÓXICO.%.

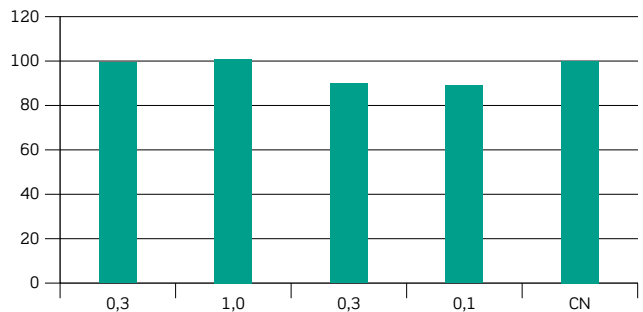


FIGURA 3. Viabilidad celular (%) de los tratamientos. El gráfico representa los valores de viabilidad celular del producto de prueba frente a su excipiente. Diluciones de NOC (3; 1; 0,3 y 0,1 mg/mL), versus control negativo (CN).

- c) Pruebas de Hemocompatibilidad (I)–Hemólisis y Aglutinación: Se calculó el porcentaje de hemólisis de cada concentración de NOC analizada (NOC no diluido y con diluciones 1:2 y 1:4 en PBS). Los resultados obtenidos fueron de 0,0, 0,2, y 0,3, respectivamente, concluyendo que el elemento NOC NO presenta actividad hemolítica in vitro en ninguna de las concentraciones probadas.
- d) Prueba de Hemocompatibilidad (II)- Hemoglobina libre.

Al aplicar el estándar por el cual una sustancia se considera hemolítica a una determinada concentración cuando el porcentaje de hemólisis obtenido es superior al 2%, podemos concluir que el elemento NOC NO presenta actividad hemolítica in vitro en ninguna de las concentraciones probadas.

Estudios Normativos de Toxicidad In Vivo:

- a) Estudios intravenosos NOAEL en ratas (I): En la primera fase la administración de las NOC a dosis únicas de hasta 1000 mg/kg por vía intravenosa en ratas no produjo mortalidad en ninguno de los animales, por lo que se estimó que el DL50 era mayor de 1000 mg/kg del peso corporal (Programa estadístico AOT425). Del mismo modo, ninguna de las dosis probadas de 175, 550 y 1000 mg/kg, comprometió la vida de los animales, o produjo signos de toxicidad relacionados con la administración del producto.
En la segunda fase, la administración de las NOC a una dosis única de 1000 mg/kg produjo la mortalidad del 20% de las hembras; mientras que las dosis más bajas probadas de 550 y 175 mg/kg no pusieron en peligro la vida de los animales.
En base a los resultados obtenidos, se ha establecido el rango de dosis entre 550 y 1000 mg/kg como rango para probar la dosis máxima en estudios de toxicidad normativos posteriores.

- b) Estudios intravenosos NOAEL en ratas (II)–clínicos y ex vivo: Todos los hallazgos detectados en los animales que recibieron la dosis más alta (900 mg/kg), desde las alteraciones analíticas hasta el oscurecimiento de los órganos animales y abdominales, así como los depósitos de tejido, son consistentes con la existencia de una sobrecarga de hierro.
Siguiendo las pautas de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos para estimar dosis equivalentes humanas (intravenosas) de modelos animales, incluso la dosis más baja aquí utilizada, que es de 100 mg/kg en una rata, corresponde a 16,2 mg/kg en un humano. La dosis prevista del agente NTT es menor a la citada, aproximadamente de 0,5 mg/kg en un adulto de 70 kg, y en cualquier caso está previsto su uso mediante inyección intersticial, no intravenosa. Por lo tanto, podemos llegar a la conclusión de que, a los niveles de dosis humanos previstos, el agente NTT NO ES TÓXICO.
- c) Estudios intravenosos NOAEL en ratas (III)–polarización de macrófagos: Los datos recopilados dan evidencia de que las MNP pueden estar involucradas de manera beneficiosa en la polarización de los macrófagos en estado proinflamatorio M1, la cual sabemos que ayuda a la supresión del tumor. Esto es debido a que la IL-12 está asociada a la inhibición de la angiogénesis, con lo cual realiza una función de apoyo en las terapias antitumorales. Además, se ha demostrado que la aplicación de calor en las nanopartículas de hierro promueve todavía más la polarización de los macrófagos a M1, siendo así la combinación de nanopartículas de hierro junto con el calor un buen candidato terapéutico contra el cáncer.
Por lo tanto, aunque no es posible llegar a una conclusión definitiva sin realizar más estudios, los indicios apuntan a que en el método termoterapéutico puede haber un efecto

ANTITUMORAL BENEFICIOSO gracias a la polarización de los macrófagos (figura 4).

- d) Evaluación del potencial de sensibilización de la piel mediante el ensayo de los ganglios linfáticos locales (LLNA:DA): El valor del índice de sensibilización (SI) calculado para el grupo de control positivo (C+) fue de 4,1. En función del modelo de predicción señalado en la pauta 442A de la OCDE, el C+ se clasificó como un sensibilizador positivo debido a su valor superior a 2,5.

Por lo tanto, considerando que no hay una relación dosis-respuesta entre las tres concentraciones probadas y el SI obtenido, así como la falta de eritema, edema o cualquier otra reacción inflamatoria en las zonas de aplicación, el elemento de prueba (NOC) fue clasificado como NO SENSIBILIZANTE.

- e) Estudio de reactividad intracutánea en conejos: Tomando como base los valores de eritema y edema después de 24, 48 y 72 horas en las áreas tratadas con las NOC o con el control negativo, se calculó la puntuación de irritación intracutánea para cada animal y cada zona. Luego se calculó la puntuación media para cada zona (tratamiento y control negativo), obteniendo valores de 0,0 y 0,2 respectivamente. Finalmente, al restar los valores calculados,

se determinó que la puntuación de irritación intracutánea final para el elemento de prueba era de -0,2 ($\leq 1,0$).

En vista de los resultados obtenidos, es posible concluir que, en las condiciones de prueba, el elemento de prueba (NOC) no causó irritación intracutánea y por tanto se pudo clasificar como NO IRRITANTE.

- f) Análisis de toxicología tisular ex vivo: Al comparar las imágenes histológicas del grupo tratado con las del grupo de control, la diferencia más notable es la presencia de abundantes macrófagos cargados de partículas de hierro y depósitos en las células de Kupffer en los hígados de los animales del grupo tratado. Además, en algunos casos se observó una degeneración globoide en los hepatocitos lobulares, lo que podría atribuirse a la sobrecarga de hierro que conlleva la infusión de las nanopartículas magnéticas. A pesar de su significado, tales características no son infrecuentes en el hígado y no están asociadas con una fisiología hepática adversa.

En el resto de los órganos analizados (pulmón, riñón, bazo y ganglios linfáticos), los cambios histológicos observados simplemente mostraron una relación con el proceso tumoral o con el procesamiento histológico de las muestras,

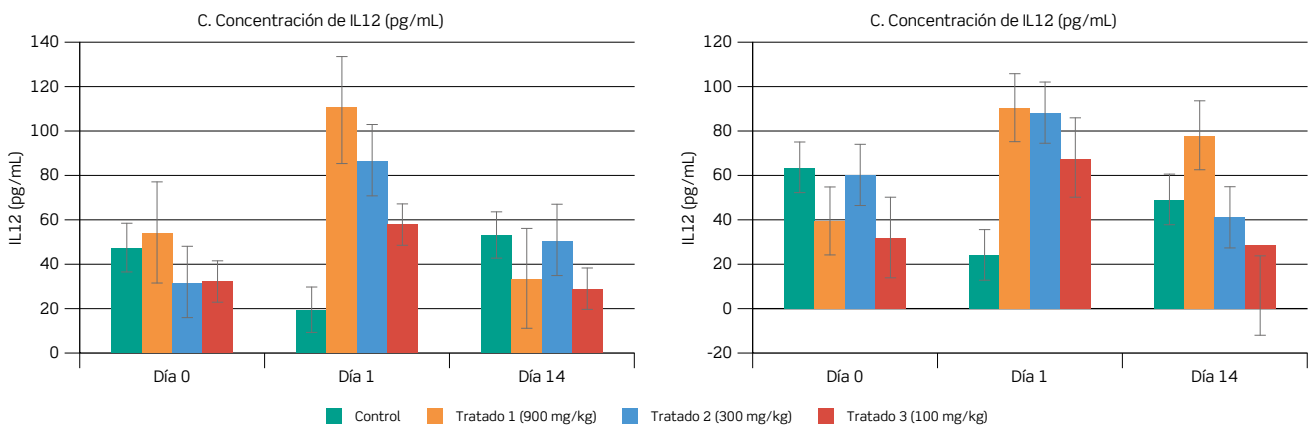


FIGURA 4. Efecto en los niveles séricos de IL-12 después de la administración del NOC. Para cada grupo de estudio, los promedios de los niveles séricos de IL-12 (pg/mL) frente al tiempo de prueba (antes de la administración, día 1 y día 14 del estudio) están representados por un gráfico de columnas

más bien que efectos que puedan atribuirse a las MNP. Por lo tanto, consideramos que la aplicación intratumoral de las MNP y el AMF a las dosis probadas es SEGURA y BIEN TOLERADA en los tejidos fuera del tumor.

DISCUSIÓN

La aplicación de la nanotecnología a la medicina ya ha supuesto un avance significativo en el tratamiento de una serie de enfermedades. Sin embargo, aún se requiere un mayor desarrollo de la nanoterapia con características nuevas o mejoradas para abordar las necesidades médicas no satisfechas y permitir la implementación de la medicina personalizada (31).

Actualmente, las prioridades en el campo de la nanoterapia son dirigir más esfuerzos de investigación hacia el desarrollo de productos competitivos y garantizar un entorno regulatorio bien diseñado (32). La clave del éxito es un enfoque interdisciplinario y

de mente abierta complementado con la asociación y el intercambio de conocimientos entre la academia, la industria y las agencias reguladoras.

Gracias al Proyecto Nocanther, se ha podido comenzar con un ensayo clínico de seguridad con un tratamiento totalmente innovador para tratar el adenocarcinoma de páncreas con nanopartículas magnéticas e hipertermia.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores de este artículo certifican la ausencia de cualquier tipo de conflicto de interés.

FINANCIACIÓN

El presente informe ha sido desarrollado dentro del proyecto NOCANTHER: Buenas prácticas para el escalado de nanoterapias, financiado por el programa Horizonte 2020 de la Unión Europea bajo el Acuerdo de Subvención n.º 685795.

REFERENCIAS

1. UNE-EN ISO 13485:2018 Productos sanitarios. Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos para fines reglamentarios. (ISO 13485:2016). (Versión consolidada)
2. Hidalgo M. Pancreatic Cancer: Pancreatic Cancer: Overview. *Lancet*. 2011;378(9791):1605-1617. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
3. Johannsen M, Gneveckow U, Taymoorian K, et al. Termoterapia en cáncer de próstata mediante el uso de nanopartículas magnéticas. *Actas Urol Esp*. 2007;31(6):660-667. [https://doi.org/10.1016/S0210-4806\(07\)73703-8](https://doi.org/10.1016/S0210-4806(07)73703-8)
4. Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, et al. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperth*. 2005;21(7):637-647. <https://doi.org/10.1080/02656730500158360>
5. Noh, S.H.; Moon, S.H.; Shin, T.H.; Lim, Y.; Cheon, J. Recent Advances of Magneto-Thermal Capabilities of Nanoparticles: From Design Principles to Biomedical Applications. *Nano Today* 2017, 13, 61-76. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2017.02.006>
6. Périgo, E.A.; Hemery, G.; Sandre, O.; Ortega, D.; Garaio, E.; Plazaola, F.; Teran, F.J. Fundamentals and Advances in Magnetic Hyperthermia. *Appl. Phys. Rev*. 2015, 2, 041302. <https://doi.org/10.1063/1.4935688>
7. Thiesen, B.; Jordan, A. Clinical Applications of Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia. *Int. J. Hyperth*. 2008, 24, 467-474. <https://doi.org/10.1080/02656730802104757>
8. Kossatz, S.; Grandke, J.; Couleaud, P.; Latorre, A.; Aires, A.; Crosbie-Staunton, K.; Ludwig, R.; Dähring, H.; Ettl, V.; Lazaro-Carrillo, A.; et al. Efficient Treatment of Breast Cancer Xenografts with Multifunctionalized Iron Oxide Nanoparticles Combining Magnetic Hyperthermia and Anti-Cancer Drug Delivery. *Breast Cancer Res*. 2015, 17, 66. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0576-1>

9. Reglamento (UE) 2017/745 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de abril de 2017, sobre los productos sanitarios, por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE, el Reglamento (CE) n° 178/2002 y el Reglamento (CE) n° 1223/2009 y por el que se derogan las Directivas 90/385/CEE y 93/42/CEE del Consejo
10. Rampton D, Folkersen J, Fishbane S, et al. Hypersensitivity reactions to intravenous iron: Guidance for risk minimization and management. *Haematologica*. 2014;99(11):1671-1676. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.111492>
11. Mosayebi, J.; Kiyasatfar, M.; Laurent, S. Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. *Adv. Healthc. Mater*. 2017, 6, 1700306. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700306>
12. Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim WS. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater*. 2015;16(2). <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>
13. Tietze R, Zaloga J, Unterweger H, et al. Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;468(3):463-470. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.022>
14. Mülhopt, S.; Diabaté, S.; Dilger, M.; Adelhelm, C.; Anderlohr, C.; Bergfeldt, T.; de la Torre, J.G.; Jiang, Y.; Valsami-Jones, E.; Langevin, D.; et al. Characterization of Nanoparticle Batch-to-Batch Variability. *Nanomaterials* 2018, 8, 311. <https://doi.org/10.3390/nano8050311>
15. Etemadi, H.; Plioger, P.G. Magnetic Fluid Hyperthermia Based on Magnetic Nanoparticles: Physical Characteristics, Historical Perspective, Clinical Trials, Technological Challenges, and Recent Advances. *Adv. Ther*. 2020, 3, 2000061. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000061>
16. Gutiérrez, L.; de la Cueva, L.; Moros, M.; Mazarío, E.; de Bernardo, S.; de la Fuente, J.M.; Morales, M.P.; Salas, G. Aggregation Effects on the Magnetic Properties of Iron Oxide Colloids. *Nanotechnology* 2019, 30, 112001. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aafbff>
17. Kossatz, S.; Ludwig, R.; Dähring, H.; Ettelt, V.; Rimkus, G.; Marciello, M.; Salas, G.; Patel, V.; Teran, F.J.; Hilger, I. High Therapeutic Efficiency of Magnetic Hyperthermia in Xenograft Models Achieved with Moderate Temperature Dosages in the Tumor Area. *Pharm. Res*. 2014, 31, 3274-3288. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1417-0>
18. Kossatz S, Ludwig R, Dähring H, et al. High therapeutic efficiency of magnetic hyperthermia in xenograft models achieved with moderate temperature dosages in the tumour area. *Pharm Res*. 2014;31(12):3274-3288. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1417-0>
19. Kossatz S, Grandke J, Couleaud P, et al. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):1-17. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0576-1>
20. UNE-EN ISO 10993-4:2018 Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 4: Selección de los ensayos para las interacciones con la sangre. (ISO 10993-4:201)
21. Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios.
22. Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano
23. Directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos
24. UNE-EN ISO 15189:2013 (Versión corregida en fecha 2014-11-26) Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia. (ISO 15189:2012, versión corregida 2014-08-15)
25. ISO 9001:2015(es): Sistemas de gestión de la calidad–Requisitos
26. UNE ENISO 10993-10:2013 Evaluación biológica de dispositivos médicos–Parte 10: Pruebas de irritación y sensibilización cutánea (ISO 10993-10:2010)
27. Ludwig R, Teran FJ, Teichgraber U, Hilger I. Nanoparticle-based hyperthermia distinctly impacts production of ROS, expression of Ki-67, TOP2A, and TPX2, and induction of apoptosis in pancreatic cancer. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:1009-1018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S108577>
28. Stapf M, Teichgräber U, Hilger I. Methotrexate-coupled nanoparticles and magnetic nanochemotherapy for the relapse free treatment of T24 bladder tumours. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:2793-2811. <https://doi.org/10.2147/IJN.S120969>

29. Southern P, Pankhurst QA. Commentary on the clinical and preclinical dosage limits of interstitially administered magnetic fluids for therapeutic hyperthermia based on current practice and efficacy models. *Int J Hyperth.* 2018;34(6):671-686.
30. <https://doi.org/10.1080/02656736.2017.1365953>
31. Gaharwar US, R P. Iron Oxide Nanoparticles Induced Oxidative Damage in Peripheral Blood Cells of Rat. *J Biomed Sci Eng.* 2015;08(04):274-286. <https://doi.org/10.4236/jbise.2015.84026>
32. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, et al. Intracranial Thermotherapy Using Magnetic Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy: Results of a Feasibility Study on Patients with Glioblastoma Multiforme. Vol 81.; 2007. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9195-0>
33. Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, et al. Efficacy and Safety of Intratumoural Thermotherapy Using Magnetic Iron-Oxide Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy on Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme. Vol 103.; 2011. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0389-0>