



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado

Hipertermia magnética intracelular para terapia del
cáncer

Autor

Lucio Caveró Alonso

Director

Ángel Millán Escolano

Facultad de Ciencias

Curso 2022/23

Índice

1. Introducción	3
2. Objetivos	5
3. Fundamentos teóricos	
3.1 Terapia hipertérmica con nanopartículas magnéticas	6
3.2 Partículas monodominio	6
3.3 Relajación magnética en nanopartículas magnéticas monodominio	7
3.4 Potencia de calentamiento	8
4. Materiales y métodos	
4.1 Equipo	9
4.2 Procedimiento para las medidas magnetotérmicas	12
4.3 Caracterización de las nanopartículas por microscopía electrónica	12
5. Resultados	
5.1 Síntesis y caracterización estructural de las NPs magnéticas	13
5.2 Medidas de magnetotermia	15
5.2.1 Frecuencia: 22 kHz	15
5.2.2 Frecuencia: 46 kHz	17
5.2.3 Frecuencia: 76 kHz	19
5.2.4 Efecto de la frecuencia sobre el SAR	21
6. Conclusiones	24
7. Agradecimientos	25
8. Referencias	26
9. Anexo	

9.1 Procedimiento para las medidas en el laboratorio	28
9.2 Análisis de los datos	31

1. Introducción

La hipertermia magnética intracelular es una técnica que se utiliza paralelamente junto a otras técnicas como la quimioterapia o la radioterapia para combatir algunos cánceres [1-3].

Antes de esta técnica de carácter puramente magnético, se utilizaban otro tipo de hipertermias que eran administradas mediante dispositivos externos como láseres [4], ultrasonidos y radiofrecuencia [5]. Sin embargo, todos presentaban alguna limitación: penetración superficial, sobrecalentamiento de tejido sano que llevaba a quemaduras y ampollas al producirse necrosis de las células sanas [6].

En la actualidad, el tratamiento hipertérmico con nanopartículas consiste en el calentamiento global de todo el tumor y es una técnica invasiva, ya que las nanopartículas se inyectan directamente al tumor con una aguja, además de la introducción de sondas de temperatura en el tejido circundante sano que rodea al tumor para controlar la temperatura [7-9].

Frente a estos problemas y con el fin de generalizar el uso de la terapia por hipertermia magnética en el uso clínico diario, el grupo de investigación en cuyo seno se realiza este TFG propone la hipertermia magnética intracelular local. Esta técnica consiste en la eliminación de las células tumorales mediante internalización celular de las nanopartículas magnéticas que luego son sometidas a un campo magnético alterno externo, produciendo un cambio en la temperatura local de la zona de interés que desemboca en la apoptosis celular y por consiguiente en la destrucción del tumor.

En el proyecto de investigación en el que se encuadra este TFG se pretende mejorar de la siguiente forma la técnica anteriormente expuesta. Frente a la eliminación del tumor mediante la subida global de la temperatura del mismo, que requiere mucho calor y es necesaria por tanto la inyección de una gran cantidad de nanopartículas dentro del tumor, se propone calentar únicamente la zona alrededor de las nanopartículas, de forma que se degeneren las células en su entorno más próximo y se dispare la muerte de las células por apoptosis, sin que aumente la temperatura global de la célula. Así, solo habría que suministrar una pequeña cantidad de nanopartículas en sangre, que se dirigirán al interior de las células cancerígenas y eliminarían las células tumorales al calentarlas con un campo magnético alterno.

En este trabajo se han utilizado nanopartículas magnéticas de gamma-óxido de hierro III, que funcionalizadas con los adecuados agentes biológicos diana se dirigen a las células tumorales. A este proceso se le denomina vectorización y se basa en dotar a las nanopartículas con la capacidad para acumularse preferentemente en el tejido tumoral y, así, reducir los efectos colaterales en tejidos adyacentes [2-6].

Utilizamos estas nanopartículas por diferentes motivos. Entre ellos destaca que las dimensiones de las partículas deben estar entorno a 10-100 nm, ya que con este tamaño son consideradas como adecuadas para cualquier aplicación que requiera penetración en el tejido [6]. Además, por debajo de estos valores las partículas sufren una excreción renal muy rápida y por encima de 200 nm experimentan una fuerte fagocitosis por parte de células del sistema inmune (fuerte retención en el bazo y el hígado) [2-6].

El trabajo que aquí se presenta se desarrolló en el INMA (Instituto de Nanociencia y de Materiales de Aragón) y es una pequeña parte del proyecto que se ha ido realizando durante años junto con otros centros de investigación europeos y nacionales, con carácter multidisciplinar puesto que es necesario un amplio conocimiento tanto en química, como en física, en biología y en ingeniería. Las nanopartículas magnéticas han sido sintetizadas en el INMA, y el equipo de hipertermia ha sido diseñado y construido por el Departamento de Electrónica de Potencia, siendo un proyecto común en el que también participan el Departamento de Bioquímica y Biología Celular y la Universidad de Aveiro, y que ha dado lugar a un gran número de publicaciones (más de 30).

2. Objetivos

Los principales objetivos de este proyecto son:

1. optimizar la técnica de la hipertermia magnética intracelular mediante el estudio de la potencia de calentamiento de las nanopartículas magnéticas al ser sometidas a diferentes frecuencias e intensidades de campo magnético.
2. adquirir experiencia en el trabajo en el laboratorio, siendo el primer proyecto importante y de carácter de investigación en el que he participado.

Utilizaremos dispersiones de nanopartículas de óxido de hierro III ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en agua ya preparadas y mediremos el cambio en la temperatura de la dispersión al aplicar un campo magnético alterno (AMF) en función del tiempo para distintos valores de intensidad y frecuencia. A partir de las curvas de calentamiento, y conociendo la concentración de nanopartículas en la dispersión, determinaremos la potencia de calentamiento específica, normalmente conocida por sus siglas en inglés, SAR (Specific Absorption Rate).

3. Fundamentos teóricos

3.1 Terapia hipertérmica con nanopartículas magnéticas

Nuestro experimento se basa en el siguiente fenómeno puramente físico: las nanopartículas magnéticas disipan energía cuando son irradiadas con un campo magnético alterno .

En primer lugar, definiremos lo que es una nanopartícula, que no es otra cosa más que una partícula cuyas dimensiones no superan los 100 nm en ninguno de sus ejes y la nombraremos de ahora en adelante como NP para referirnos a ella.

Algunas de las posibles ventajas de utilizar la hipertermia magnética en la terapia del cáncer se explican a continuación :

1. No hay que someter al paciente a ningún tipo de operación, es decir, es una técnica no invasiva.
2. Solo se ven afectadas las NPs magnéticas por el campo magnético externo, por lo que actuamos de forma localizada sin dañar el tejido sano.
3. Podemos controlar el calentamiento que queremos obtener con las NPs en el tejido tumoral tanto mediante la frecuencia como con la intensidad del campo magnético aplicado.
4. Por último, son buenos agentes de contraste por resonancia magnética, de forma que podemos observar claramente si las NPs están localizadas adecuadamente [10].

No obstante, la terapia hipertérmica magnética tiene una limitación importante relativa a los parámetros del campo magnético utilizables. Debemos tener en cuenta que no podemos irradiar con cualquier frecuencia e intensidad de campo, ya que a partir de un producto de H por f determinado ($Hf = 4,85 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ [11]) el campo aplicado puede ser nocivo para la salud del paciente.

3.2 Partículas monodominio

El trabajo se ha realizado utilizando NPs de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), un material ferrimagnético. En este tipo de materiales, los espines atómicos en cada partícula se dividen en dominios dentro de los cuales su orientación es la misma, mientras que la orientación relativa entre diferentes dominios es aleatoria [12] tal y como se presenta en la Figura 1.

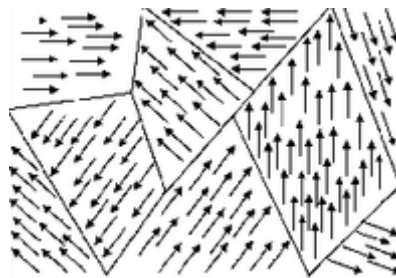


Figura 1. Representación de los dominios magnéticos de un material ferromagnético.

En nuestro caso, las dimensiones de las NPs son tan pequeñas que solo pueden contener un dominio magnético. Por tanto, todos los espines de la NP tienen la misma orientación, y decimos que son monodominio.

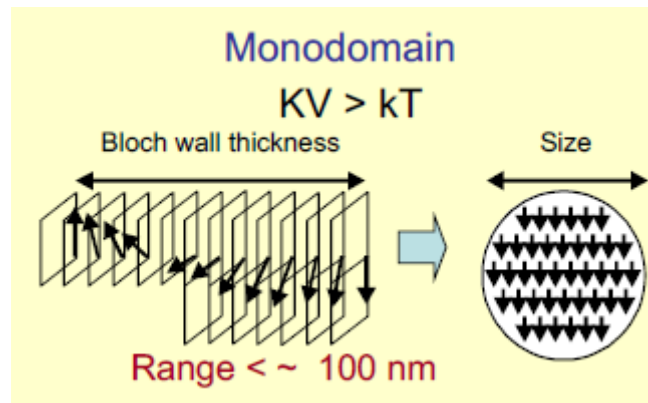


Figura 2. Representación del monodominio magnético debido a las dimensiones de las NPs.

La aparición de monodominios ocurre cuando el tamaño de las NPs es menor que el espesor de las paredes de Bloch, que se definen como la zona de transición entre dos dominios magnéticos, según se explica gráficamente en la Figura 2.

3.3 Relajación magnética en nanopartículas magnéticas monodominio

Al aplicar a las NPs un campo magnético externo AC se pueden llegar a producir dos tipos distintos de relajación magnética que dan lugar a fenómenos de disipación térmica:

Mecanismo de relajación de Néel: simplemente se trata de la rotación del momento magnético de las partículas magnéticas [13] con el campo magnético alterno, como ilustramos a continuación (Figura 3).



Figura 3. Representación del mecanismo de relajación de Néel. Imagen tomada de referencia [14].

Mecanismo de relajación de Brown: consiste en la rotación física de toda la NP al tratar de alinear su momento magnético con la dirección del campo externo, produciendo una fricción con el fluido que la rodea, causante del aumento de la temperatura [13].

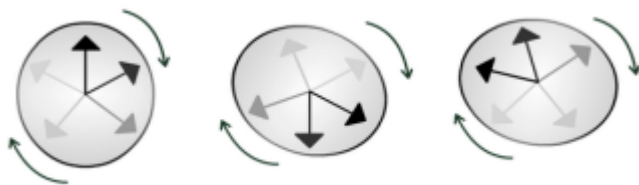


Figura 4. Representación del mecanismo de relajación de Brown. Imagen tomada de referencia [14].

Así, tenemos dos mecanismos por los que se produce el aumento de temperatura de las NPs, y en el caso de nuestro experimento contribuyen los dos según se comprobó experimentalmente al restringir la movilidad de las NPs dispersándolas en matrices sólidas [11].

3.4 Potencia de calentamiento

Una vez explicado el fundamento teórico en el que se basa nuestro experimento, debemos cuantificar la eficiencia que muestran las NPs al ser sometidas a distintas frecuencias e intensidades de campo. Para ello calcularemos el SAR (Specific Absorption Rate), un parámetro empírico que establece la cantidad de Vatios por gramo de NP [11], y que se calcula según la Ecuación 1:

$$SAR = \frac{C_p(H_2O) m_{total} \Delta T}{m_{nanopartículas} \Delta t}$$

Ecuación 1 [11].

Donde C_p representa el calor específico del agua, al ser el disolvente de las NPs, $m_{nanopartículas}$ es la masa de NPs de óxido de hierro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) que contiene la dispersión, m_{total} es la masa total de la dispersión, NPs y disolvente y ΔT es la diferencia de temperatura entre la muestra con las NPs y una muestra de agua pura, que se utiliza como control, en función del tiempo de aplicación del campo magnético externo. Para poder llevar a cabo este cálculo de forma precisa hemos tomado el mismo volumen de la muestra de NPs y disolvente como del agua control mediante una pipeta calibrada y utilizando la siguiente aproximación:

$$\frac{m_{nanopartículas}}{m_{total}} \sim C_{nanopartículas} (g/mL)$$

Ecuación 2 [11].

Donde $C_{nanopartículas}$ hace referencia a la concentración de las NPs en la solución de agua y es un parámetro medido mediante ICP-OES por el servicio de análisis (SAI) de la Universidad de Zaragoza.

Una vez calculado el SAR o potencia de calentamiento seremos capaces de determinar en torno a qué frecuencia e intensidad de campo nos interesa trabajar para un óptimo calentamiento sin sobrepasar el límite sanitario Hf .

4. Materiales y métodos

4.1 Equipo

A continuación, se presenta una imagen del equipo empleado para la toma de medidas de magnetotermia en el laboratorio:

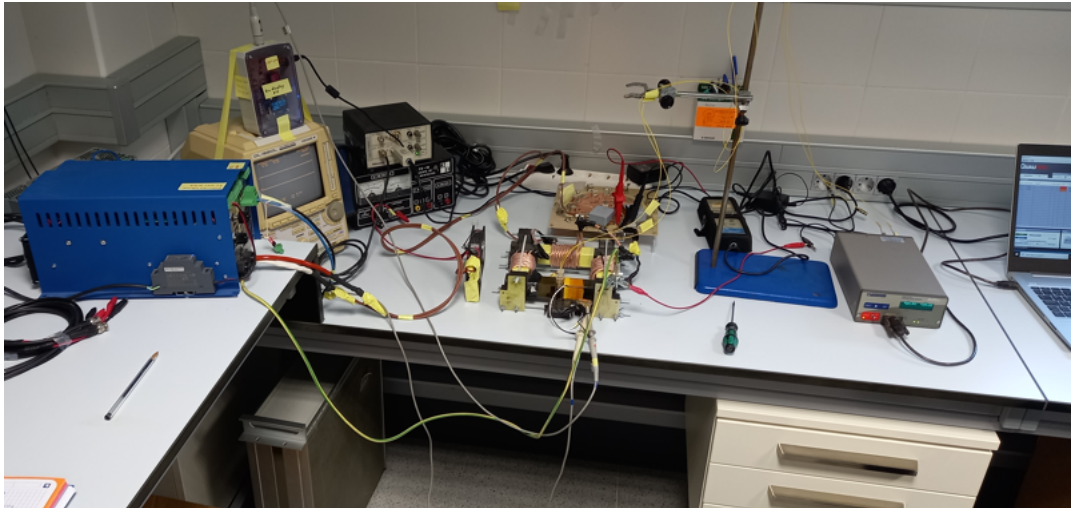


Figura 5. Imagen del equipo utilizado para la aplicación de campos magnéticos alternos a dispersiones de NPs magnéticas y determinación del calor generado.

La caja azul es un **inversor con control de fase**. Su entrada es una fuente de tensión continua constituida por tres fuentes de carril DIN de 48 V conectadas en serie. En caso necesario, se puede aumentar esta tensión hasta 650 V. La Figura 6 muestra el esquema interno del inversor. Se trata de un puente en H con transistores FET de SiC representado de manera simplificada como interruptores. Contiene dos ramas, izquierda y derecha, con salidas de tensión A y B, respectivamente. Los transistores de la misma rama se abren y cierran de forma complementaria.

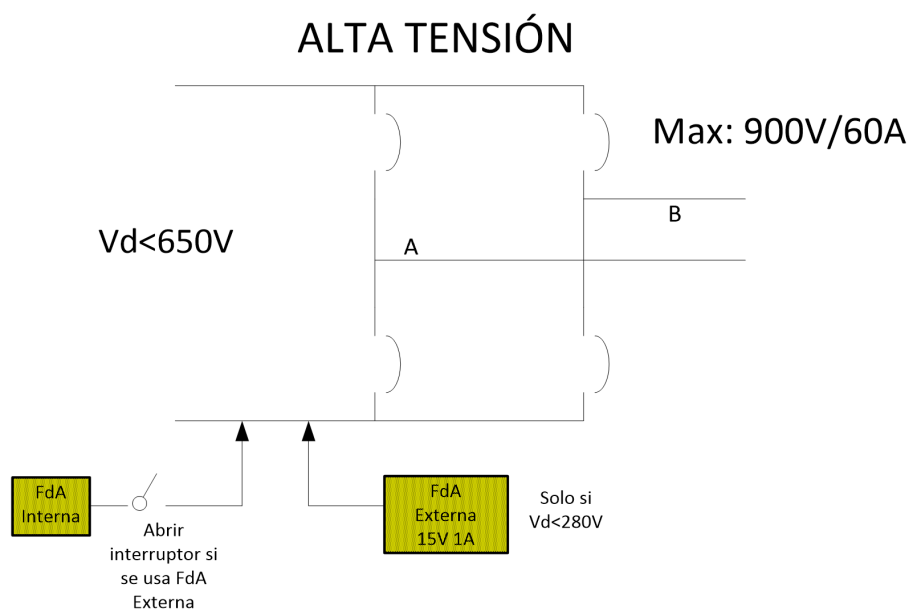


Figura 6. Representación del esquema interno del inversor.

La onda de salida del inversor es el resultado de restar dos ondas cuadradas, A y B, con ciclo de servicio 50%. El desfase entre las ondas cuadradas permite variar la amplitud del armónico principal que se aplica al **circuito resonante RLC**. Una vez tenemos la onda incidente, podemos verla en el osciloscopio y ajustar la frecuencia y desfase de la misma mediante sendos potenciómetros de ajuste situados en el equipo inversor. El sensor de campo B está formado por una espira situada en el extremo del circuito magnético que recoge el flujo que atraviesa la muestra en la zona de medida. Observando en el osciloscopio la onda del sensor de campo B se consigue alcanzar visualmente la frecuencia de resonancia, que tiene lugar cuando la onda observada alcanza su mayor amplitud.

Para poder medir a diferentes frecuencias debemos modificar la capacidad del circuito resonante serie RLC, mediante la conexión en serie o en paralelo de los condensadores. A frecuencias bajas dominan los condensadores sobre la impedancia total mientras que a frecuencias elevadas domina la inductancia L. Así, modificando el número de condensadores y su conexión tanto en serie como en paralelo podremos aumentar o disminuir la frecuencia con la que trabajamos. A mayor capacidad, se obtiene la resonancia a frecuencias inferiores.

Entre el inversor y el circuito resonante RLC hay un **transformador-reductor** de adaptación de impedancias. Su relación de transformación es 59:10. La onda de salida del inversor se aplica al circuito primario del transformador. El circuito secundario del transformador alimenta la carga que forma el circuito RLC.

La inductancia L es un circuito magnético de ferrita, con forma de C mayúscula, en cuya abertura se sitúan las muestras. La ferrita es de material del tipo 3C90 de Ferroxcube y la forma es de barras 1/93/28/30, aptas para frecuencias menores de 200 kHz. Tres de las barras tienen 10 espiras de hilo de Litz cada una, conectadas en serie.

En la abertura de la forma de C es donde se colocaron las dos cubetas, una con la muestra de las NPs en la solución de agua que nos interesa estudiar y la otra con agua que hará un papel de control. El agua permitirá reducir las pérdidas de transmisión de calor.

Mediante dos termómetros de fibra óptica, insensibles al campo magnético, se es capaz de medir la temperatura en ambos fluidos (NPs+agua y agua control). Así, se miden las temperaturas de ambas muestras al ser sometidas a un campo magnético externo, y se puede determinar el calentamiento debido a la transferencia de calor desde las ferritas.

El cálculo de la amplitud del campo B lo realiza un circuito electrónico construido "ad hoc", que recoge la onda de tensión captada por el sensor. En una pantalla se muestra, simultáneamente la amplitud de B en mT y la frecuencia en Hz.

A continuación, se representa un esquema del circuito eléctrico (Figura 7):

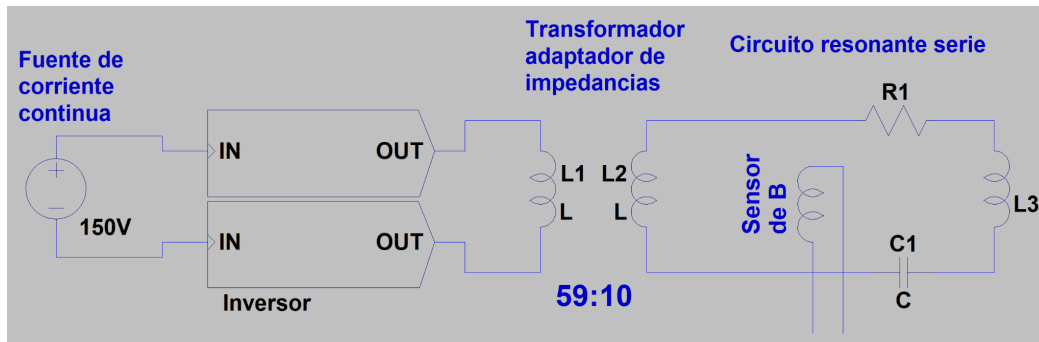


Figura 7. Esquema del circuito eléctrico.

De izquierda a derecha (Figura 7), se muestra, esquemáticamente, la fuente de corriente continua de 150 V, que el inversor convierte en alterna, y se aplica al primario L1 del transformador adaptador de impedancias, que tiene 59 espiras. El secundario L2, de 10 espiras, alimenta al circuito resonante serie RLC representado por la resistencia del devanado R1, la inductancia de las bobinas con núcleo de ferrita L3 y el condensador de resonancia C1. Se muestra también la bobina que representa el sensor de campo B, constituida por una espira.

La relación entre amplitud de corriente de bobina y campo B en la zona de la muestra se ha obtenido caracterizando el sistema con una sonda de corriente comercial de Agilent mediante regresión lineal.

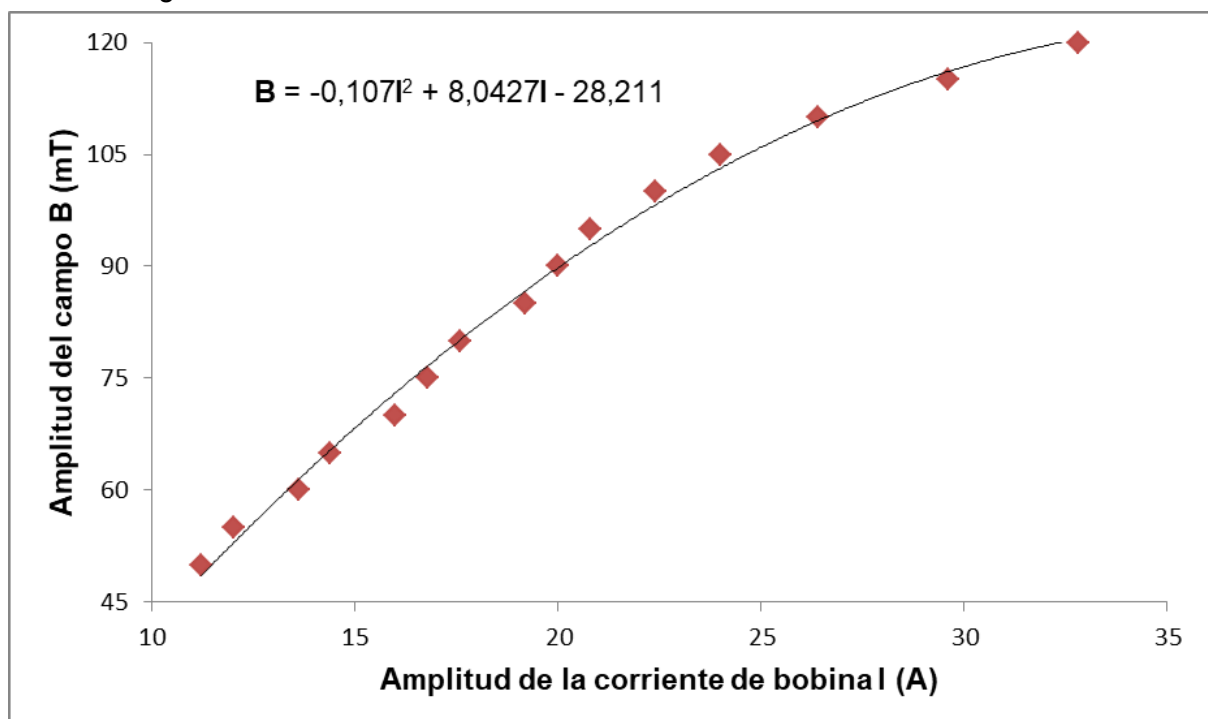


Figura 8. Amplitud del campo B en función de la corriente de bobina.

Se observa un comportamiento lineal hasta corrientes de 20 A con una relación de 4,5 mTA⁻¹. El sistema permite medir hasta densidades de flujo de 120 mT.

4.2 Procedimiento para las medidas magnetotérmicas

Hemos seguido el siguiente esquema de trabajo para cada una de las mediciones:

- 1- Establecemos la frecuencia que nos interesa jugando con los condensadores.
- 2- Aumentamos o disminuimos el campo magnético aplicado utilizando los potenciómetros de ajuste situados en el inversor y siempre buscando que nuestra onda esté en resonancia.
- 3- Una vez está el equipo preparado, quitamos la señal de entrada, situamos las muestras de NPs+agua y agua dentro de la ferrita e introducimos en cada una de ellas los sensores ópticos que miden la temperatura de la muestra y la representa frente al tiempo gracias al software utilizado (Optilink).
- 4- Se introduce la señal de entrada, la que genera el campo magnético, durante 100 segundos y medimos las temperaturas de ambas muestras.
- 5- Calculamos la diferencia de ambas temperaturas en función del tiempo y utilizando Excel ajustamos estas funciones a un polinomio de segundo grado cuya primera derivada evaluada en 0 nos dará la potencia de calentamiento de las NPs de la muestra. Con esto, teniendo en cuenta que la concentración de las NPs en la solución (13 mgmL^{-1}) podemos calcular el SAR.

Se han tomado medidas a diversas frecuencias entre 22 kHz y 77 kHz y distintas intensidades de campo magnético entre 26 mT y 110 mT.

4.3 Caracterización de las nanopartículas por microscopía electrónica

Las NPs magnéticas fueron estudiadas gracias a un microscopio electrónico de transmisión (TEM), en concreto, el Titán con corrección de aberraciones (FEI). El análisis químico del contenido de hierro en las muestras se llevó a cabo por espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado (ICP-OES).

5. Resultados

5.1 Síntesis y caracterización estructural de las NPs magnéticas

Se utilizaron nanopartículas fabricadas mediante coprecipitación en medio básico y posterior tratamiento hidrotérmal según se describe en Gu et al. 2020 [11].

La muestra se examinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). En las figuras 9 y 10 se muestran imágenes de las NPs. Como se puede observar las NPs tienen forma rectangular con bordes redondeados.

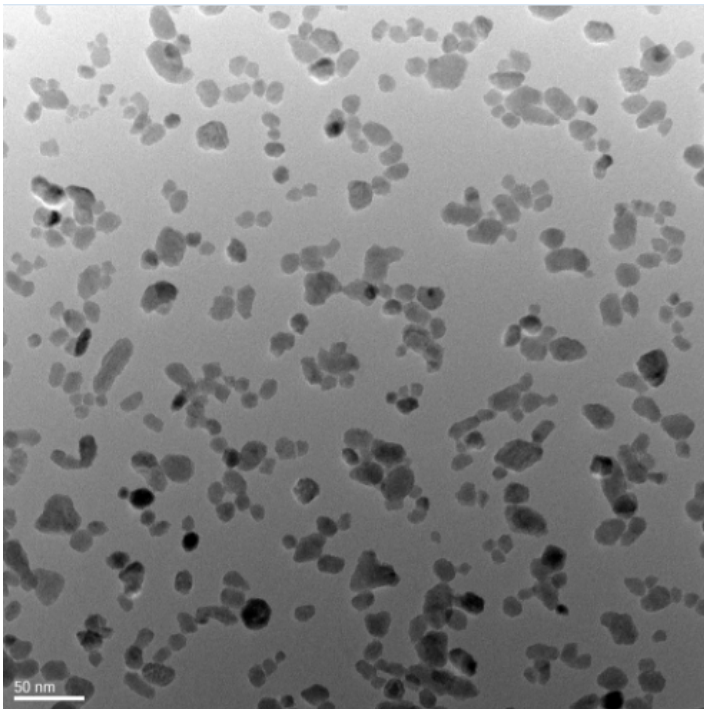


Figura 9. NPs magnéticas vistas por TEM con baja resolución.

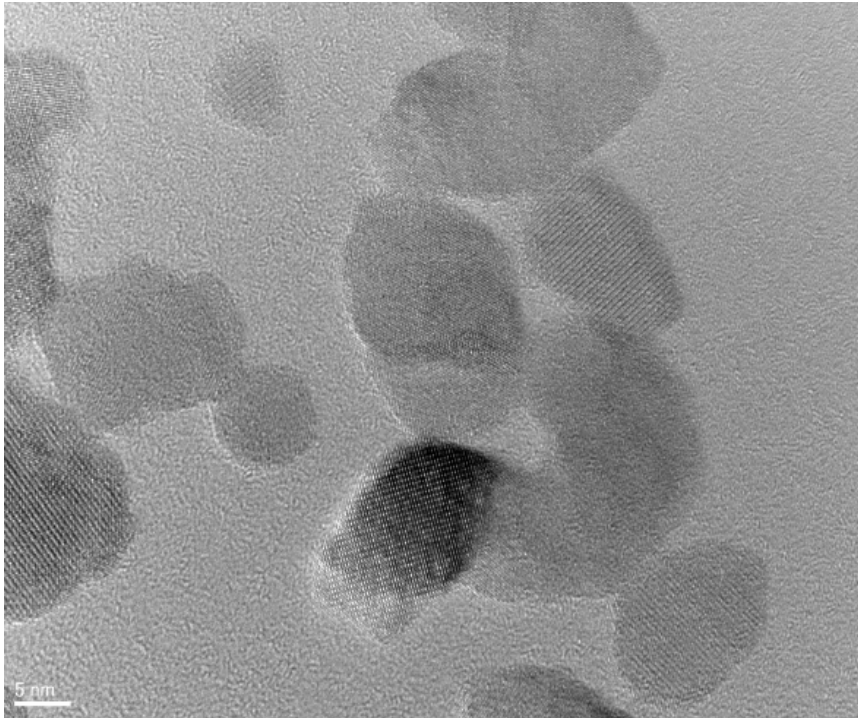


Figura 10. NPs magnéticas vistas por TEM con alta resolución.

Se realiza un análisis de tamaños sobre las imágenes TEM sobre un muestreo de 101 NPs. Puesto que las NPs son ortoédricas, se calcula el diámetro de una esfera con volumen equivalente. Es decir, se mide el largo y el ancho de la NP, se asume una altura similar al ancho, se calcula el volumen y posteriormente se estima el diámetro de una esfera con este volumen. Resulta un diámetro equivalente promedio de 18,9 nm y una desviación estándar de 5,7 nm.

En la Figura 11 representamos un histograma de la población de partículas.

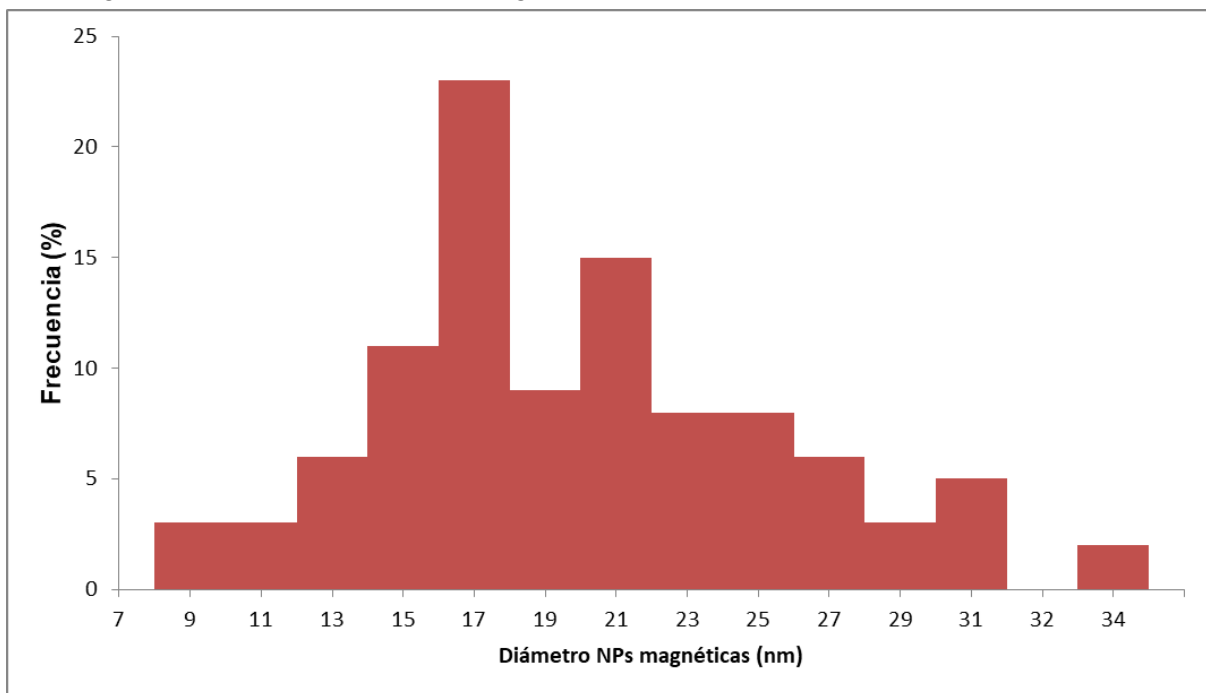


Figura 11. Histograma del diámetro equivalente de las NPs magnéticas.

El valor medio del diámetro de las NPs ha sido de 18,9 nm y su desviación estándar de 5,6 nm.

También presentamos una imagen del patrón de difracción de electrones de una NP en la Figura 12 que coincide con la estructura de la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

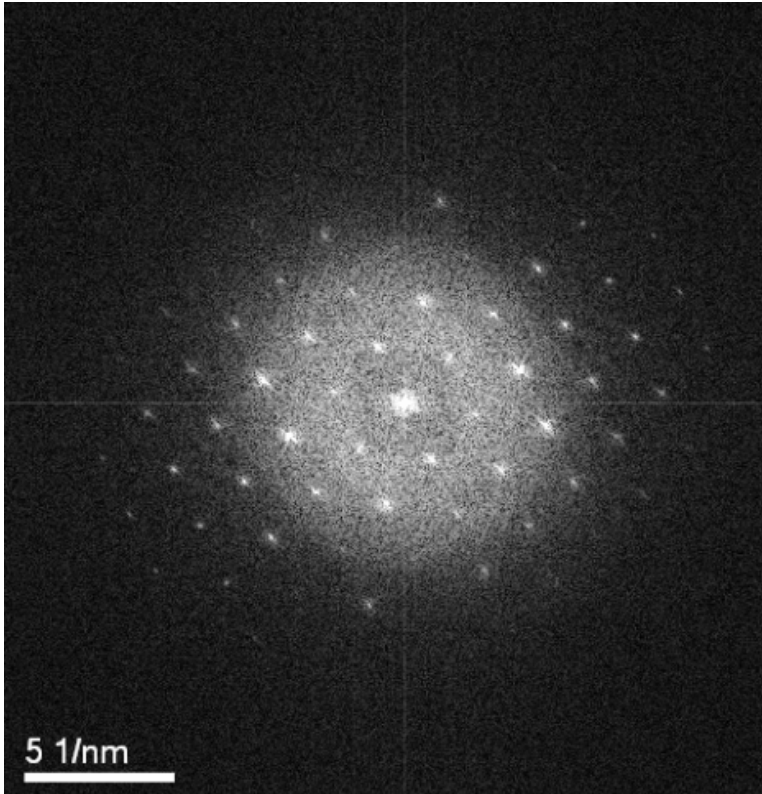


Figura 12. Patrón de difracción de electrones de una NP compatible con la estructura cristalina del $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Se muestran los resultados obtenidos para las distintas frecuencias y valores de intensidad de campo B estudiados.

5.2 Medidas de magnetotermia

Las medidas de calentamiento magnetotérmico se realizaron utilizando el equipo y procedimientos descritos en la sección 4. A continuación se describen los resultados obtenidos para cada frecuencia del campo magnético alterno aplicado.

5.2.1 Frecuencia: 22 kHz

Las frecuencias utilizadas tienen una cierta variabilidad entre las distintas medidas realizadas a distintos valores de B debido a los límites del montaje y al trabajar siempre en resonancia.

En cualquier caso, la frecuencia promedio fue de 22,1 kHz y el coeficiente de variación del 1%. Observamos como en ningún caso sobrepasamos el límite sanitario del producto Hf siendo el valor máximo obtenido en el ensayo inferior al 50% de dicho valor límite.

Tabla 1. Valores de SAR para distintas intensidades de campo magnético a frecuencias alrededor de 22 kHz.

Frecuencia (kHz)	B (mT)	Hf ($\text{Am}^{-1}\text{s}^{-1}$) (10^9)	Potencia (10^{-2})	SAR (Wg^{-1})
21,9	70	1,22	4,16	13,4
22,0	81	1,42	5,73	18,4
22,0	100	1,75	7,98	25,7
22,4	114	2,03	8,52	27,4

A continuación se muestran los valores del SAR en función de la intensidad del campo magnético B (Figura 13). Observamos que a medida que la intensidad del campo aumenta, la potencia y por tanto el SAR aumenta. La relación observada se ajusta muy bien ($R^2 = 0,997$) a una función polinómica de grado 2.

Se observa claramente como el incremento del SAR al aumentar la intensidad de campo B se va estabilizando a ciertos valores a partir de ciertos campos, en este caso, observamos que tenemos un crecimiento uniforme hasta alcanzar los 100 mT y es a partir de este valor cuando la función parece dejar de crecer de forma lineal y se estabiliza en valores de SAR cercanos a 27 Wg^{-1} .

Otro parámetro que es relevante comentar es el valor absoluto del SAR, para bajas frecuencias (22 kHz) es necesario un campo de 114 mT para obtener un valor de SAR de $27,4 \text{ Wg}^{-1}$.

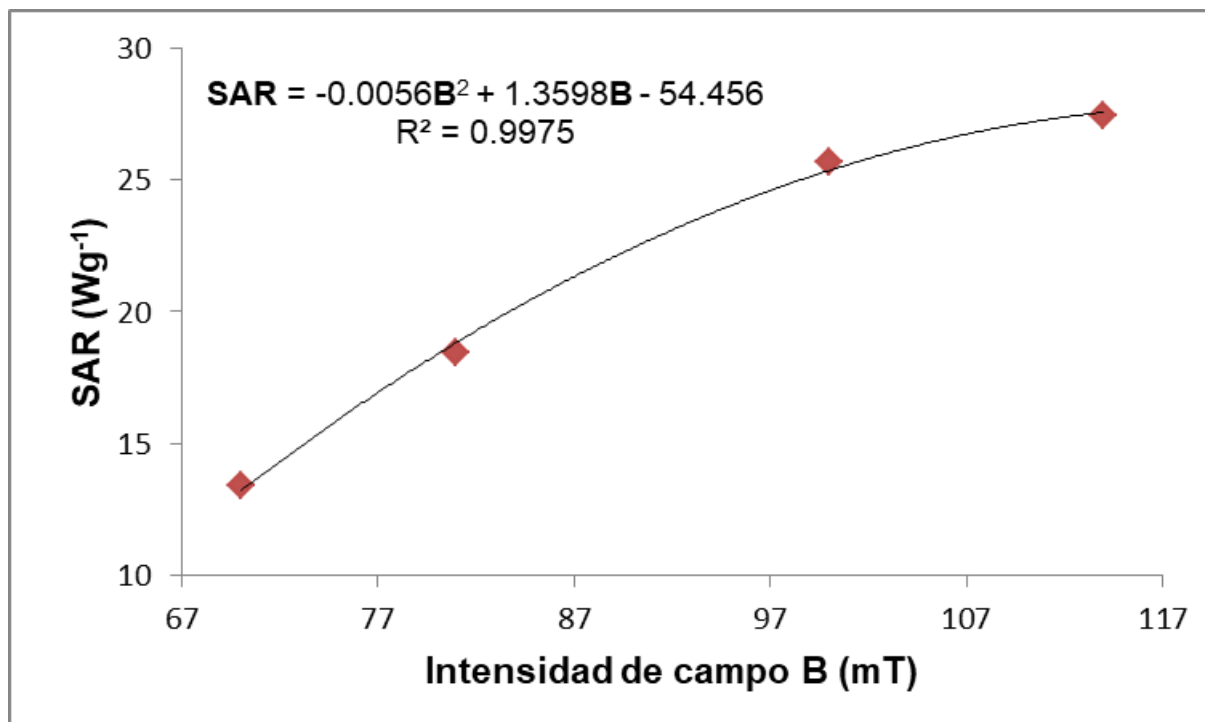


Figura 13. SAR en función de la intensidad de campo magnético B para frecuencias en torno a 22 KHz.

Pasamos a presentar ahora el SAR en función del producto Hf (Figura 14).

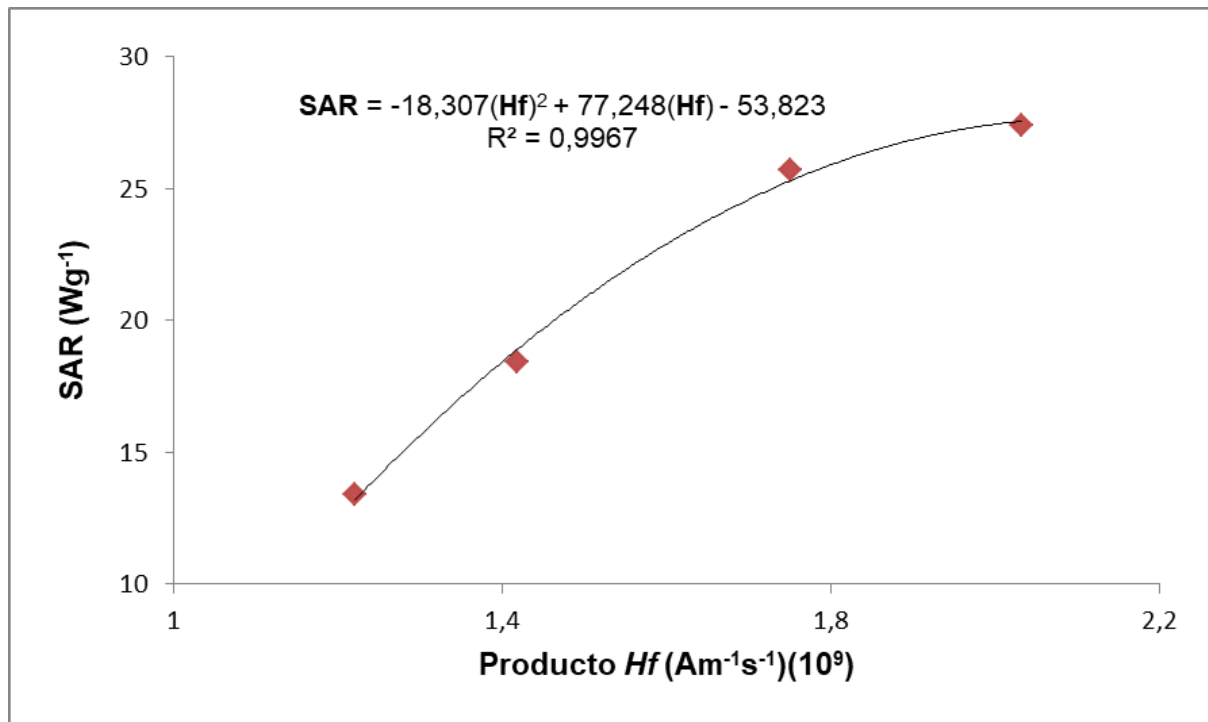


Figura 14. SAR en función del producto Hf para frecuencias en torno a 22 kHz.

En la Figura 14 se observa que nos encontramos por debajo del valor límite del producto de H por f . La relación observada se ajusta muy bien ($R^2 = 0,997$) a una función polinómica de grado 2. Se observa como el SAR aumenta linealmente al aumentar Hf y que a partir de Hf de $1,8 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ el aumento se ralentiza tendiendo hacia un valor máximo.

5.2.2 Frecuencia: 46 kHz

Tabla 2. Valores de SAR para distintas intensidades de campo magnético a frecuencias alrededor de 46 kHz.

Frecuencia (kHz)	B (mT)	Hf ($\text{Am}^{-1}\text{s}^{-1}$)(10^9)	Potencia (10^{-2})	SAR (Wg^{-1})
45,8	31	1,13	3,34	10,7
45,9	42	1,53	5,14	16,5
46,2	56	2,06	6,52	20,9
46,4	67	2,47	11,1	35,7

Las frecuencias utilizadas tienen una cierta variabilidad en las distintas medidas realizadas a distintos valores de B debido a limitaciones del montaje y al hecho de trabajar siempre en resonancia.

En cualquier caso, la frecuencia promedio ha sido de 46,1 kHz y con un coeficiente de variación del 0,4%. Observamos como en ningún caso sobrepasamos el límite sanitario establecido del producto Hf siendo el valor máximo obtenido en el ensayo inferior al 50% de dicho valor límite.

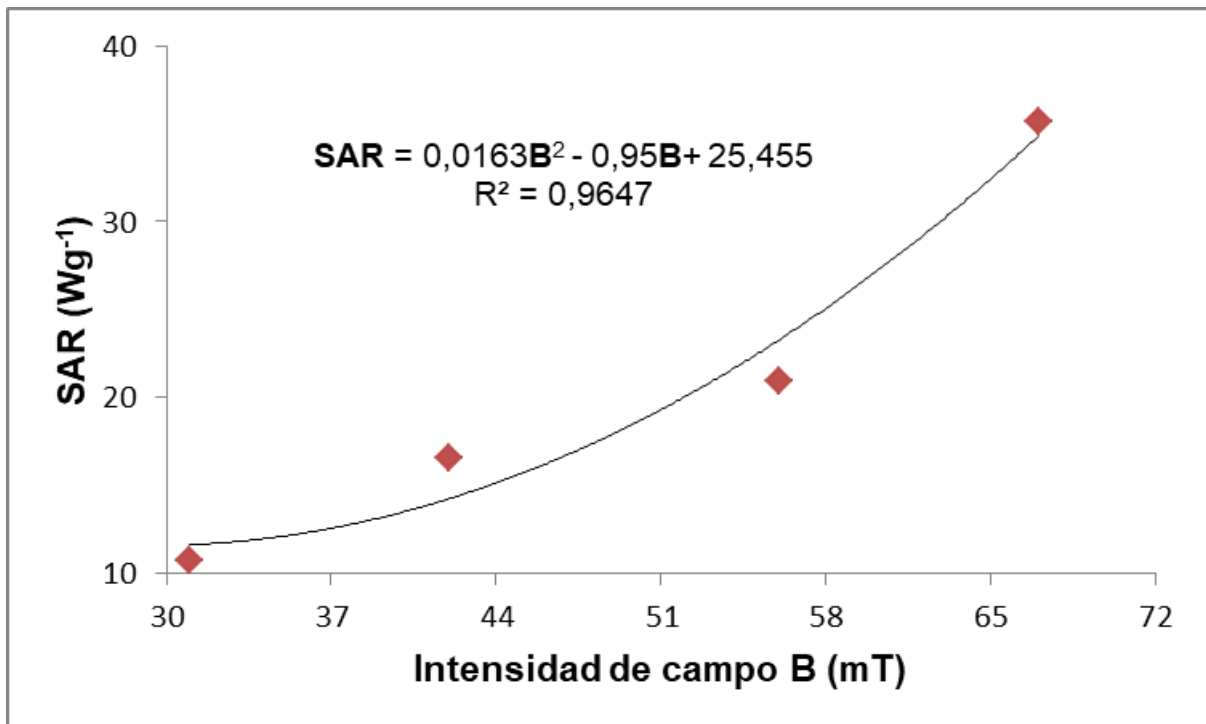


Figura 15. SAR en función de la intensidad de campo magnético B para frecuencias en torno a 46 kHz.

La relación observada entre el SAR y la intensidad de campo B se ajusta muy bien ($R^2 = 0,997$) a una función polinómica de grado 2 (Figura 15). Sin embargo, a diferencia de las medidas realizadas a frecuencia de 22 kHz, en el caso de esta frecuencia de 46 kHz, el SAR no tiende a saturar a partir de una determinada intensidad de campo magnético B sino que por el contrario sigue aumentando cada vez en mayor grado al aumentar la intensidad.

A continuación, presentamos el SAR en función del producto Hf (Figura 16).

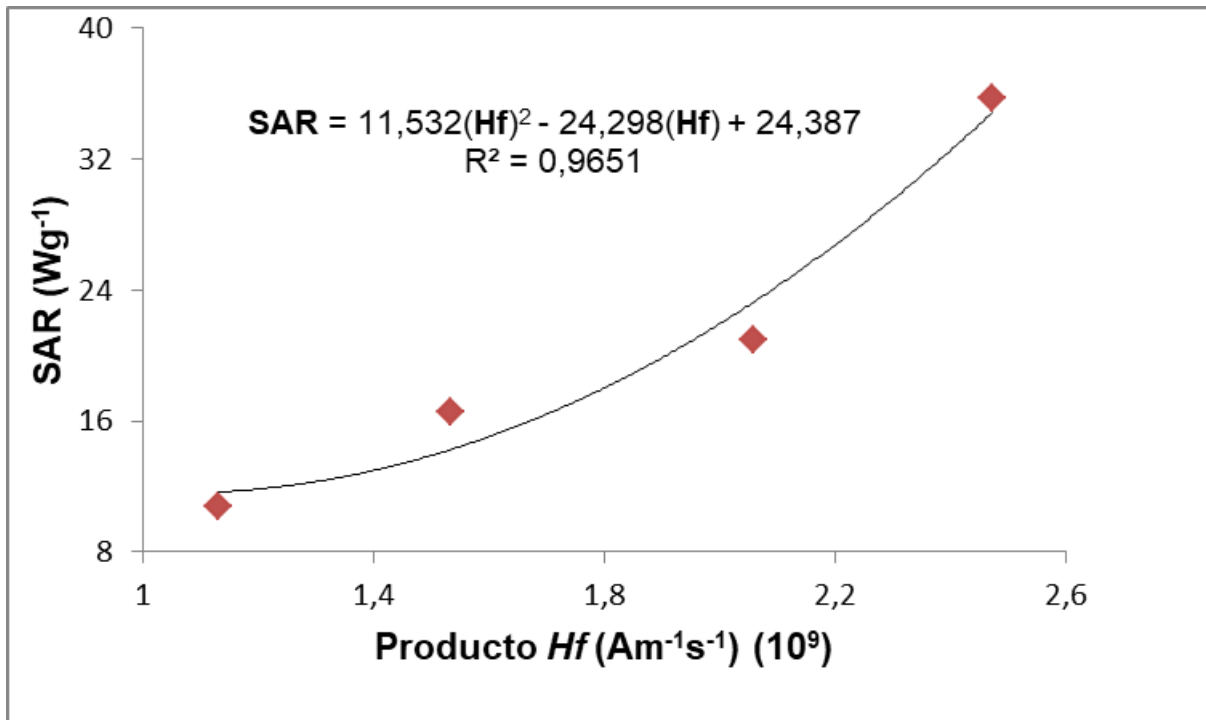


Figura 16. SAR en función del producto Hf para frecuencias en torno a 46 kHz.

La relación observada se ajusta muy bien ($R^2 = 0,965$) a una función polinómica de grado 2. Se observa como el SAR aumenta de forma lineal al aumentar Hf hasta valores de Hf de $2,06 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ para posteriormente aumentar mucho más rápidamente con Hf .

5.2.3 Frecuencia: 76 KHz

Tabla 3. Valores de SAR para distintas intensidades de campo magnético B a frecuencias alrededor de 76 kHz.

Frecuencia (kHz)	B (mT)	Hf ($\text{Am}^{-1}\text{s}^{-1}$) (10^9)	Potencia (10^{-2})	SAR (Wg^{-1})
75,9	25	1,51	4,18	13,5
76,4	36	2,19	7,13	22,9
76,4	43	2,61	8,17	26,3
76,7	53	3,23	20,2	65,1

Como ocurría anteriormente las frecuencias utilizadas tienen una cierta variabilidad debido a limitaciones del montaje y al hecho de buscar siempre la frecuencia de resonancia. En cualquier caso, la frecuencia promedio fue de 76,3 kHz y con un coeficiente de variación del 0,6%. Observamos como en ningún caso sobrepasamos el límite establecido para Hf por razones sanitarias.

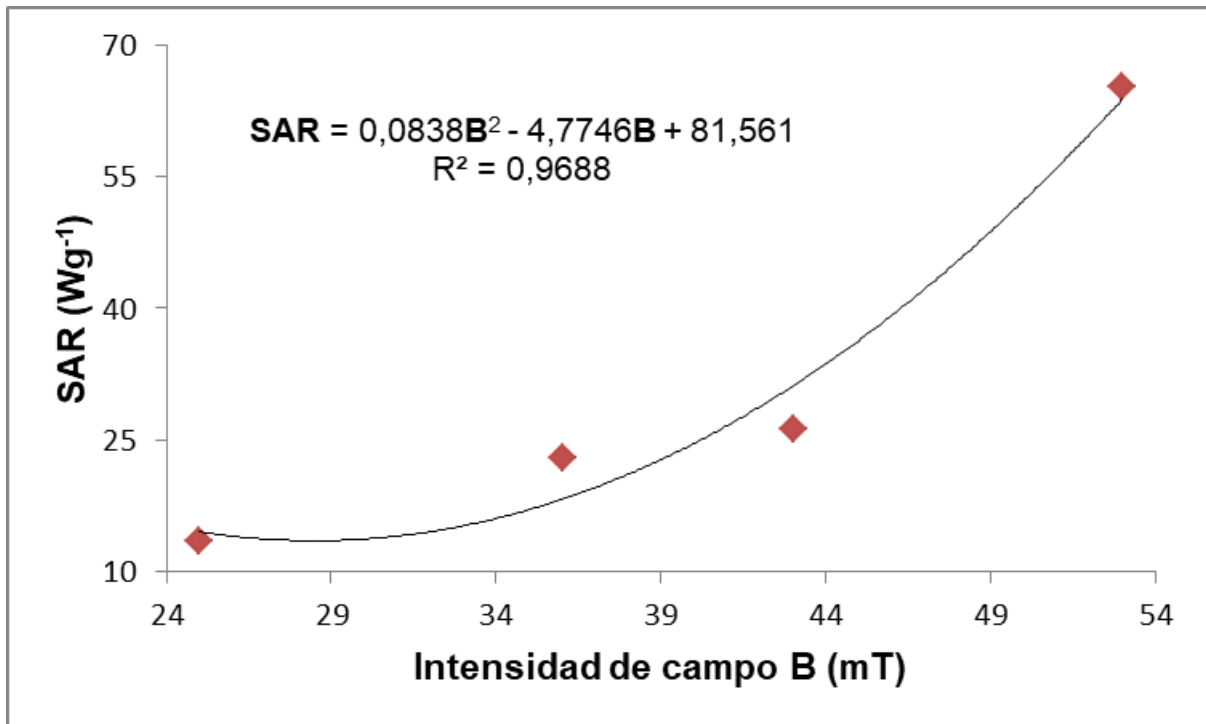


Figura 17. SAR en función de la intensidad de campo magnético B para frecuencias en torno a 76 kHz.

La relación observada entre el SAR y la intensidad de campo B se ajusta muy bien ($R^2 = 0,969$) a una función polinómica de grado 2 (Figura 17). Sin embargo, a diferencia de las medidas realizadas a 22 kHz, y al igual que las realizadas a 46 kHz, se observa que a partir de cierta intensidad de campo magnético B el aumento del SAR con la intensidad de campo se acelera. Así, observamos que al aumentar la intensidad del campo magnético de 43 a 53 mT, el valor del SAR obtenido casi se triplica.

A continuación, se representa el SAR en función del producto Hf (Figura 18).

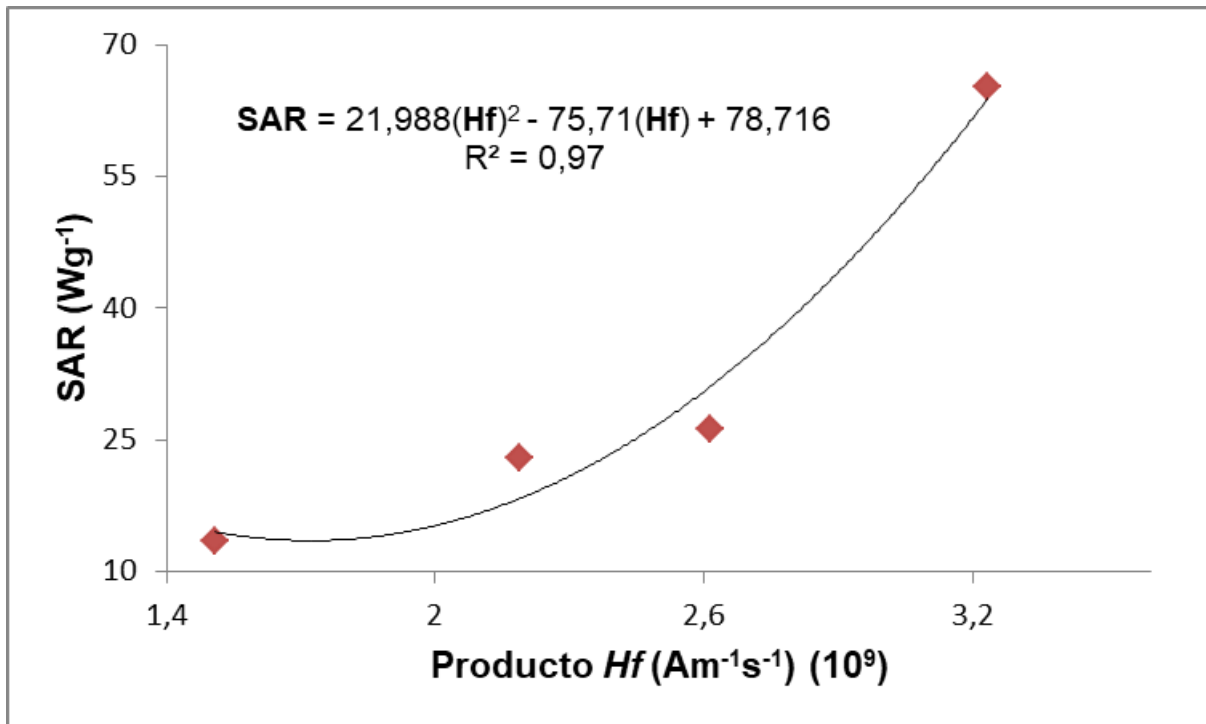


Figura 18. SAR en función del producto Hf para frecuencias en torno a 76 kHz.

La relación observada se ajusta muy bien ($R^2 = 0,97$) a una función polinómica de grado 2. Se observa como el aumento del SAR aumenta a partir de un valor de Hf determinado ($2,61 \times 10^9 Am^{-1}s^{-1}$) que es todavía más acusado que en la Figura 16.

5.2.4 Efecto de la frecuencia sobre el SAR

A continuación, con el fin de seleccionar la frecuencia más adecuada para alcanzar un calentamiento óptimo, representamos el SAR en función de la intensidad de campo magnético B para las 3 frecuencias estudiadas. (Figura 19).

La utilización de una frecuencia baja (22 kHz) necesita la aplicación de valores de intensidad de campo relativamente altos (80 mT) para obtener valores de SAR mayores de 10. La forma de la relación en esta frecuencia baja indica que la utilización de valores altos de intensidad de campo no producirán valores excesivamente altos de SAR, lo cual puede ser interesante de cara a una mayor seguridad para el paciente.

La utilización de las frecuencias media (46 kHz) y alta (76 kHz) consigue obtener valores de SAR mayores de 20 con intensidades de campo magnético menores que con la frecuencia baja (22 kHz), lo cual puede ser interesante desde el punto de vista de consumo de energía. Sin embargo, la respuesta del SAR a la intensidad del campo magnético indica que pequeños aumentos de la intensidad del campo por encima de un cierto umbral (55 mT para 46 kHz y 45 mT para 76 kHz) a estas frecuencias medias y altas, puede dar lugar a un rápido aumento del valor del SAR.

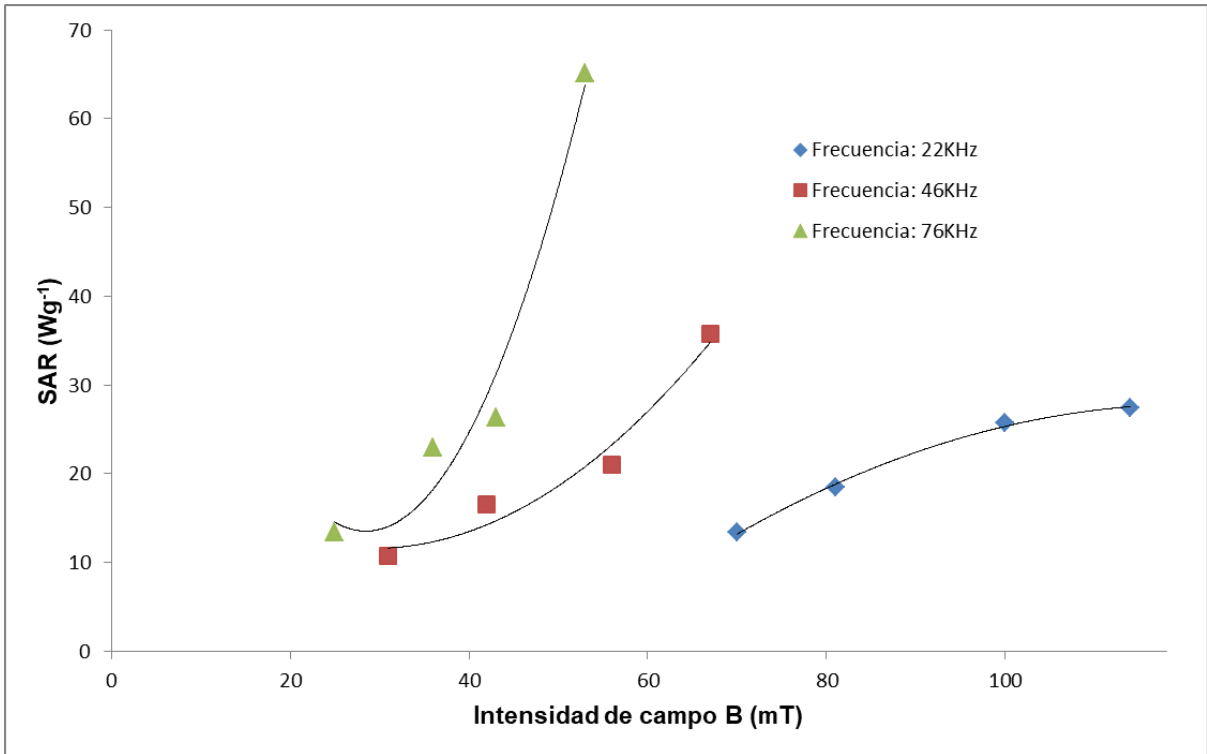


Figura 19. SAR en función de la intensidad de campo magnético B para distintas frecuencias.

A continuación, presentamos una gráfica donde observamos el SAR en función del producto Hf para las 3 frecuencias estudiadas. (Figura 16).

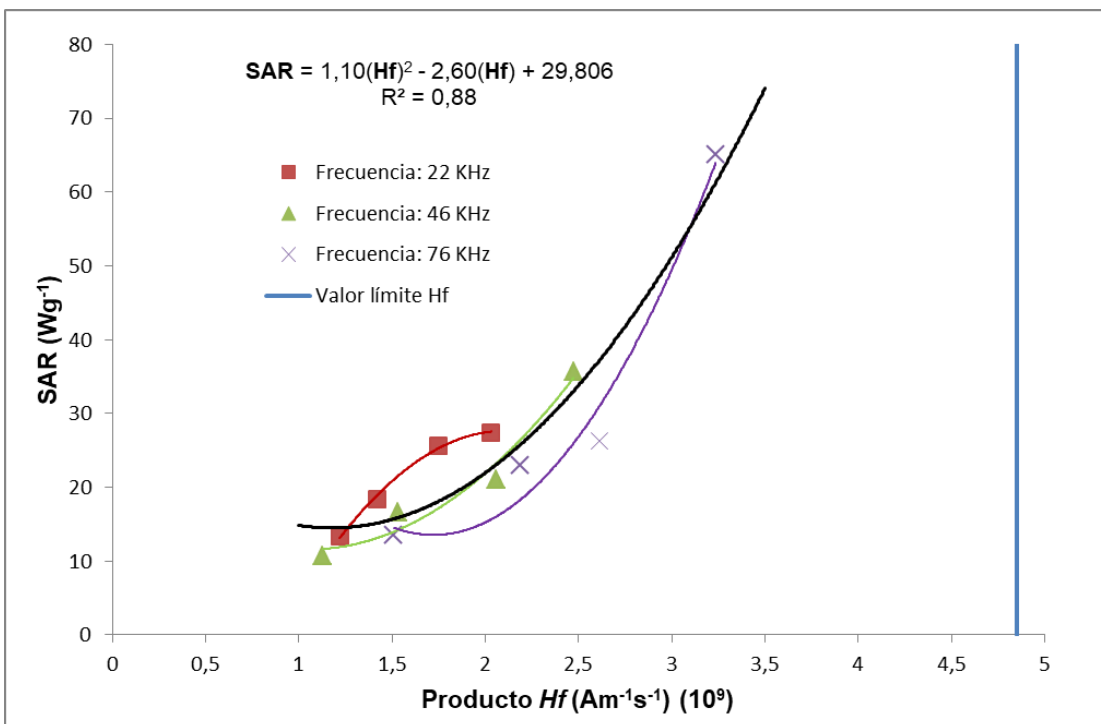


Figura 20. SAR en función del producto Hf para distintas frecuencias. La barra vertical de color azul indica el límite para uso sanitario. La línea de color negro representa la regresión con todos los puntos.

La variación del SAR con el producto Hf es bastante similar independientemente de la frecuencia utilizada (Figura 20).

6. Conclusiones

Las principales conclusiones a las que llegamos analizando los datos medidos en el laboratorio son las siguientes:

1. La tasa de absorción específica denominada SAR aumenta con la intensidad del campo magnético externo aplicado para una misma frecuencia.
2. El aumento del valor del SAR al aumentar la intensidad del campo magnético es lineal, pero a partir de un cierto valor límite de campo magnético el incremento del valor del SAR se ralentiza (para frecuencias bajas) o se dispara (para frecuencias medias y altas).
3. La utilización de las frecuencias media (46 kHz) y alta (76 kHz) consigue obtener valores de SAR mayores de 20 con intensidades de campo magnético menores que con la frecuencia baja (22 kHz), lo cual puede ser interesante desde el punto de vista de consumo de energía. Por otra parte, pequeños aumentos de la intensidad del campo por encima de un cierto umbral (55 mT para 46 kHz y 45 mT para 76 kHz), son suficientes para lograr un rápido aumento del valor del SAR.
4. En ninguno de los valores obtenidos sobrepasamos el límite impuesto del producto Hf que resulta perjudicial para el cuerpo humano; siendo el valor máximo obtenido para este valor en nuestros experimentos de $3,23 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$, con el que se consiguen valores de SAR muy notables de cerca de 70 Wg^{-1} .

En cuanto al objetivo científico principal de este trabajo, hemos demostrado que, a la hora de optimizar la potencia de calentamiento en la hipertermia magnética sin sobrepasar el valor permitido de Hf , se puede optar tanto por una subida de la frecuencia como por una subida de la intensidad del campo. Por tanto, la selección de los parámetros del campo vendrá determinada por cuestiones técnicas asociadas a la fabricación del equipo y a que sea más sencillo y económico aumentar la frecuencia o la intensidad del campo de dicho equipo.

En cuanto a mis objetivos de formación académica, he conseguido familiarizarme con el trabajo en el laboratorio; he puesto a punto el equipo de hipertermia que entonces no estaba en uso y lo he modificado para adaptarlo a los objetivos del trabajo a realizar siguiendo el equipo según los datos que quería obtener y utilizando los programas necesarios para el análisis de los datos tomados.

También he sido capaz de estudiar la potencia de calentamiento a distintas frecuencias e intensidad de campos magnéticos pudiendo comparar el comportamiento de las NPs según se sometían a unas u otras frecuencias e intensidades.

7. Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo financiero de Gobierno de Aragón (proyecto nº: LMP220_21) y del MICINN (proyecto PID2021-124354NB-100). Personalmente, agradezco el apoyo inestimable y la dedicación de Abelardo Martínez.

8. Referencias

- 1 Wust, P. *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 3, 487-497 (2002).
- 2 Fratila, R. M. & De La Fuente, J. M. *Nanomaterials for magnetic and optical hyperthermia applications.* 1st edn, (Elsevier, 2019).
- 3 Jeyadevan, B. Present status and prospects of magnetite nanoparticles-based hyperthermia. *J. Ceram. Soc. Jpn.* 118, 391-401 (2010).
- 4 Ritz, J., Germer, C., Roogan, A., Isbert, C., Pelz, J., Buhr, H. Hyperthermic effects of laser induced thermotherapy-comparison of arterial microembolisation and hepatic blood flow occlusion. *Gastroenterology*, 116, A491–A491 (1999).
- 5 D'Andrea, J., Gandhi, O., Lords, J., Durney, C., Johnson, C.C., Astle, L. Physiological and behavioral effects of chronic exposure to 2450-MHz microwaves. *J. Microw. Power* 14, 351–362 (1979).
- 6 Ferreras Mayo, A. 2020. Hipertermia basada en nanopartículas para el tratamiento del cáncer. TFG. Universidad Complutense de Madrid. 20 pp. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ALBERTO%20FERRERAS%20MAYO.pdf>
- 7 Giustini, A. J. *et al.* Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment. *Nano Life* 01, 17-32 (2010).
- 8 Johannsen, M. *et al.* Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase i trial. *Int. J. Hyperther.* 23, 315-323 (2007).
- 9 Maier-Hauff, K. *et al.* Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J. Neuro-Oncol.* 81, 53-60 (2007).
- 10 Gómez-Vallejo V. *et al.* PEG-copolymer-coated iron oxide nanoparticles that avoid the reticuloendothelial system and act as kidney MRI contrast agents. *Nanoscale*, 10, 14153-14164 (2018).
- 11 Gu Y, Yoshikiyo M, Namai A, Bonvin D, Martinez A, Pinol R, Tellez P, Silva JON, Ahrentorp F, Johansson C, Marco-Brualla J, Loshuertos R, Fernandez-Silva P, Cui Y, Ohkoshi S, Millan A. Magnetic hyperthermia with -Fe₂O₃ nanoparticles. *RSC Advances*, 10, 28786 (2020).
- 12 Cullity, B. D.; Graham, C. D. *Introduction to Magnetic Materials* (2nd ed.). New York, Wiley–IEEE, (2008)
- 13 Velez G. Y.; *Estudio teórico y experimental sobre la relajación de Neél en ensambles de partículas magnéticas interactuantes*, (2019)

14 Aranda Escribano N. ICMA:Hipertermia magnética local intracelular para terapia del cáncer,36.(2020). Disponible en: <https://zaguan.unizar.es/record/97950/files/TAZ-TFG> (2020).

8. Anexo

8.1 Procedimiento para las medidas en el laboratorio

En primer lugar conectaremos todos los aparatos electrónicos a las tomas de corrientes y es fundamental que la inductancia L , es decir, el circuito magnético de ferrita (Figura A.1), esté conectado tanto en serie con los aparatos electrónicos (inversor, transformador y condensadores) como también a tierra. En ningún caso debemos manipular el equipo sin verificar que la ferrita está conectada a tierra ya que por ella circulan intensidades eléctricas de valores de varios órdenes de magnitud superiores al valor límite que resulta peligroso para el cuerpo humano.

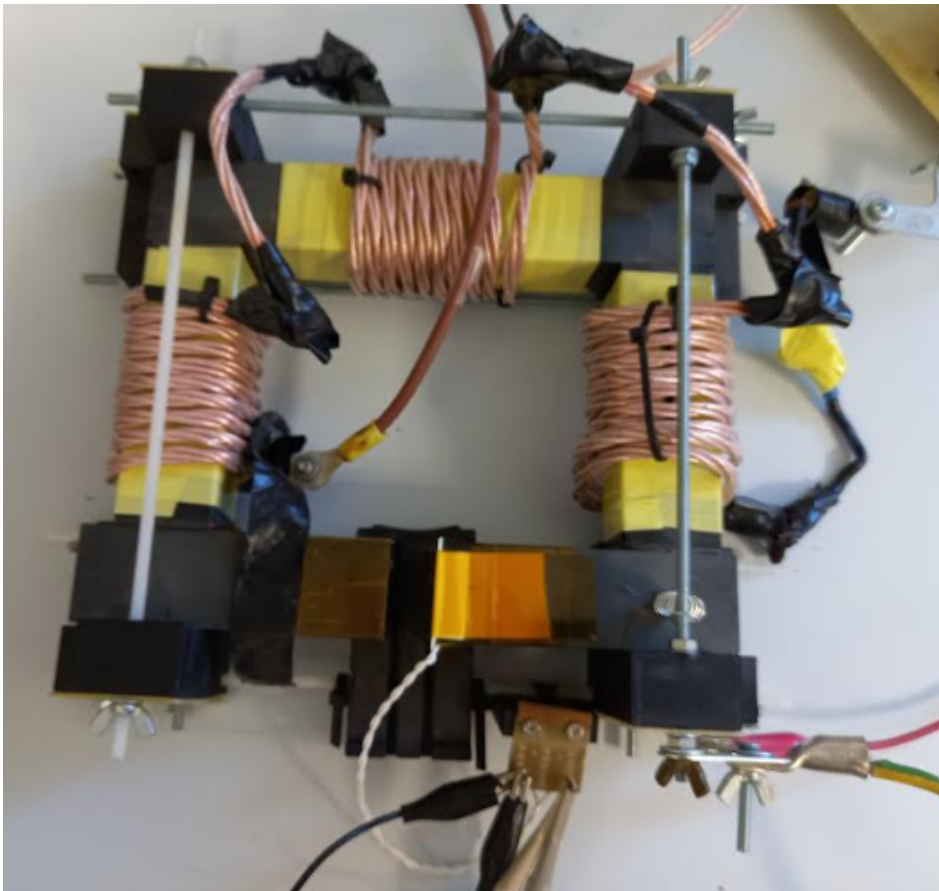


Figura A.1. Imán de Ferrita.

Una vez conectados los distintos elementos, encenderemos todos los aparatos que vamos a usar para la medida de datos una vez tengamos las muestras a analizar colocadas en su lugar. Solo conectaremos el equipo a la corriente en el momento de tomar las medidas para evitar un consumo de energía excesivo.

Disponemos de un ventilador que se utiliza para enfriar ambas muestras tanto la de las NPs+agua como la del agua control además de la ferrita, pero que en nuestro experimento no hemos utilizado ya que el aire hacía mover los hilos del termómetro óptico agitando así las muestras y produciendo calor en vez de enfriar que debía ser su principal utilidad.

Preparamos las dos muestras (NPs+agua y agua control) en dos cubetas. La de NPs+agua ha sido filtrada por dos filtros, uno de 0.69 micrómetros y otro de 0.22 micrómetros mientras que la otra cubeta simplemente contiene agua destilada. Ambas cubetas contenían el mismo volumen de muestra. Se ha utilizado una pipeta milimetrada para cerciorarnos de que ambos volúmenes eran idénticos. Una vez preparadas las dos cubetas con las muestras, se colocan en el interior de la C formada por el imán de ferrita y perforamos ambas cubetas por la tapa superior de éstas para poder introducir los termómetros ópticos (Figura A.2) en ellas.

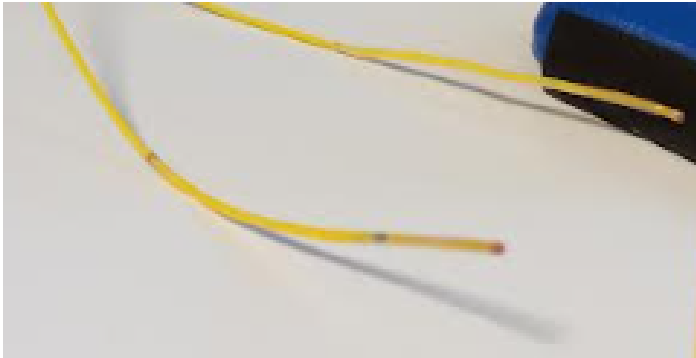


Figura A.2. Termómetros ópticos.

Los termómetros ópticos están a su vez conectados a un display (Figura A.3) que nos muestra la temperatura de la zona a medir y mediante el software Optilink, que presentamos a continuación su funcionamiento, podemos medir la temperatura de ambas muestras una vez aplicamos el campo magnético.



Figura A.3. Display de temperatura.

La Figura A.4 muestra un pantallazo del programa.

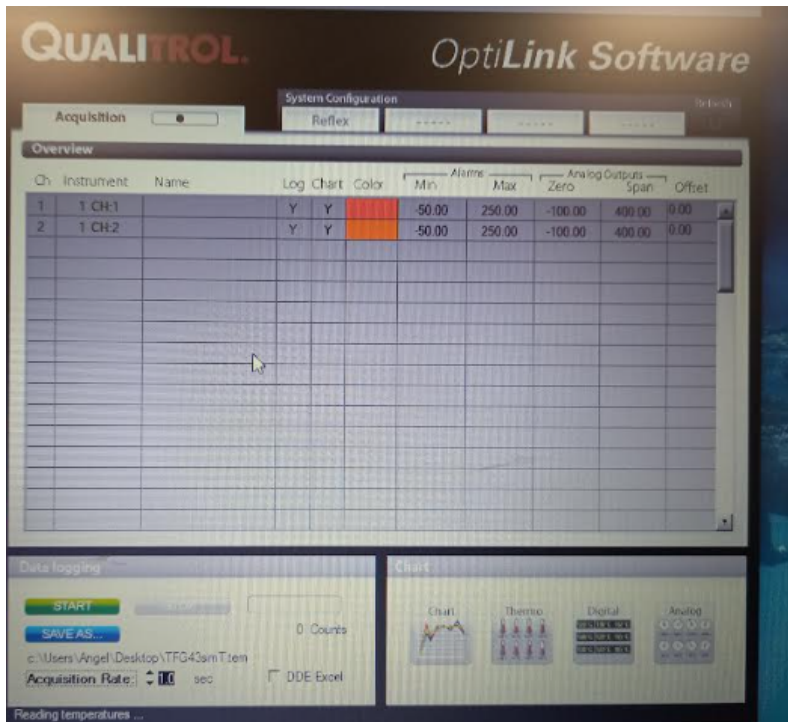


Figura A.4. Programa Optilink empleado en la toma de medidas de temperatura.

El uso del programa es sencillo; guardamos el fichero de medidas en el ordenador con el botón que se muestra: save as, y una vez estamos listos para la toma de medidas pulsamos el botón: start. Una vez tomadas las medidas clicamos el botón: stop y nos guardará el archivo como un .tem, el cual se puede abrir en Excel sin ningún problema, que es donde realizaremos todo nuestro análisis.

Una vez aplicamos el campo magnético observamos en el chart del programa (Figuras A.5 y A.6) como aumenta la temperatura de la muestra de forma inmediata, siendo crucial apuntar el momento exacto en el que el campo se ha aplicado para las posteriores medidas.

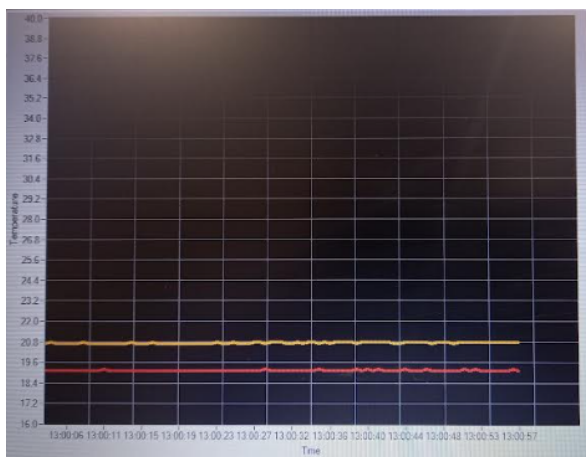


Figura A.5. Antes de aplicar campo.

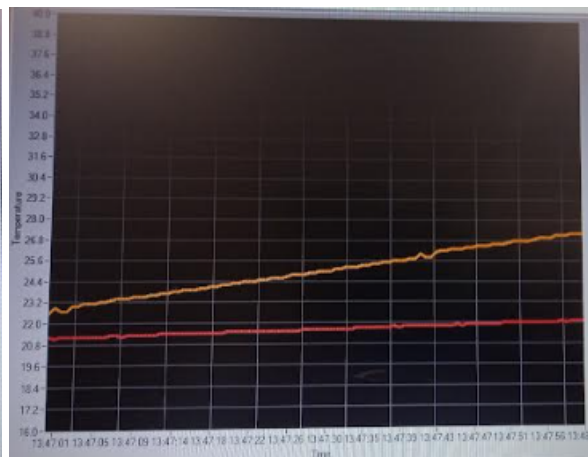


Figura A.6. Una vez aplicado el campo.

Finalizadas las medidas procedemos al cálculo de las magnitudes más relevantes para este trabajo: el Specific Absorption Rate (SAR) y la potencia de calentamiento. Para esta última, debemos calcular la diferencia de temperaturas de la muestra de NPs+agua y del agua control una vez aplicado el campo magnético externo para el tiempo que determinemos. Es

importante que el número de medidas sea considerable pero no es necesario llegar a temperaturas del orden de 46°C ya que aunque está es la temperatura a la que se produce apoptosis celular, se suelen formar jorobas en nuestras gráficas que falsifican las medidas de la potencia de calentamiento. Así, un ejemplo sería el siguiente:

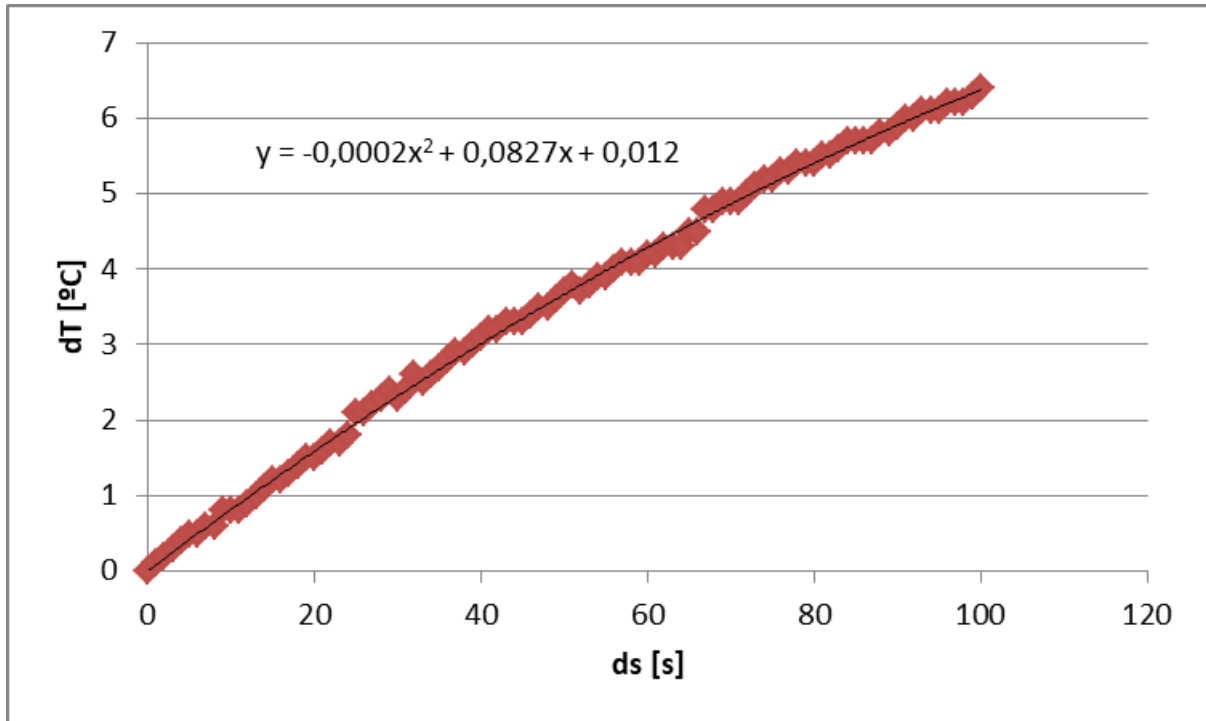


Figura A.7. Diferencia de temperaturas entre las muestras de NPs+agua y de agua control en función del tiempo una vez aplicado el campo magnético para una frecuencia de 38 KHz e intensidad 56 mT.

Con estos datos, haciendo la derivada primera polinómica de la regresión que pasa por el punto cero, se obtiene la potencia de calentamiento y aplicando la Ecuación 1 obtenemos el valor del SAR.

Repetiremos este mismo proceso para cada frecuencia e intensidad de campo magnético.

8.2 Análisis de los datos

La relación entre el SAR y las variables intensidad del campo magnético B y Hf se ha analizado mediante regresión con el programa EXCEL.

