

16. Ciencia e Ingeniería de Materiales

Desarrollo de nano-agentes magnéticos para aplicación de hipertermia combinada con direccionamiento en el tratamiento selectivo del cáncer

Autora: Moscoso, Verónica Victoria, veronica.vmoscoso@gmail.com

Orientadora: Fernández van Raap, Marcela, marcelaraap@gmail.com

Instituto de Física La Plata (IFLP -CONICET) / Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

1. Resumen

La hipertermia magnética para el tratamiento de tumores es una alternativa terapéutica que se comenzó a estudiar hace ya muchos años, con el fin de encontrar una nueva herramienta para la terapia antitumoral menos agresiva que las ya conocidas.

Se sintetizaron nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) de aproximadamente 11 nm de diámetro mediante co-precipitación en medio acuoso. La superficie de las nanopartículas se funcionalizaron con 3aminopropil triethoxisilano (APTS) y ácido fólico (AF) para direccionamiento en células tumorales que sobreexpresen el receptor folato. Estas nanoestructuras tienen una disipación de calor caracterizada por un valor de SpecificAbsorptionRate (SAR) de 7.53 W/gFe para la termoterapia magnética bajo la acción de campos de radiofrecuencia en condiciones clínicas (100 kHz y 5 kA/m).

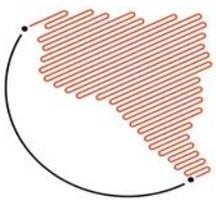
La experimentación *in vitro* con la célula LM3 (Malignant neoplasms of the mouse mammary gland (NCIt: C21678). https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_D269) permitió demostrar la disminución de la viabilidad celular un 6-7% luego del contacto con nanopartículas magnéticas durante 24 horas y posterior aplicación de campo magnético, respecto del control no expuesto al campo.

Palabras clave: Hipertermia magnética, nanopartículas, magnetita, termoterapia antitumoral, ácido fólico.

2. Introducción

El tratamiento de tumores con calor, hipertermia, es una alternativa terapéutica que se comenzó a estudiar hace ya muchos años, con el fin de encontrar una

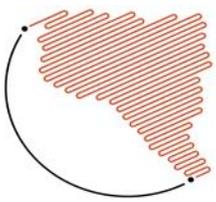
nueva herramienta para la terapia antitumoral menos agresiva que las ya conocidas. En la década del 80 se demostró que el tratamiento de tumores con elevación de temperatura por encima de los 42



°C durante una hora inhibe la proliferación maligna a través de la inducción de muerte celular por necrosis y/o apoptosis^{1,2}. Si bien este hallazgo despertó una nueva posibilidad para la terapia del cáncer, los métodos disponibles para lograrla (rayos láser, radiaciones ionizantes y microondas) no pudieron ser utilizados en forma selectiva debido a la aplicación externa que afectaba tanto al tejido tumoral como a las células sanas circundantes. Avances posteriores posibilitaron el uso de nanoactuadores que dieron lugar a nuevas modalidades en la terapia oncológica que la generación del calor dentro del tumor y no afuera del cuerpo, es decir estas modalidades son menos invasivas y localizadas. En la termoterapia la modalidad que hace uso de nanoactuadores magnéticos es la hipertermia magnética (HM)³. Se utilizan nanoestructuras magnéticas, en general nanopartículas magnéticas de óxidos de Fe (magnetita y maghemita) de diversas formas, tamaños y/o estructuras tipo carozo/capa. En estas técnicas el material absorbe energía de un campo oscilante de frecuencia en el rango de las radiofrecuencias para luego liberarlo al medio circundante en forma de calor. La investigación de los últimos años ha sido llevada a cabo en fluidos magnéticos^{4,5} *in vitro* en cultivos celulares que internalizaron

NPs (Hipertermia intracelular) e *in vivo* en animales que presentan tumores. La primera está orientada a la generación de nanopartículas biocompatibles que presenten mayor disipación de calor con el fin de disminuir las dosis necesarias, estableciéndose la meta de un valor de disipación específica de 1 kW/g_{NP}⁶. La experimentación *in vitro* en cultivos de células eucariotas ha indicado una incorporación en endosomas del orden de 20 a 30 pg de óxido de Fe/célula⁷. *In vivo* la experimentación ha revelado un impacto distintivo a nivel celular y en la fisiología del tumor lo que favorece la combinación con las modalidades oncológicas clásicas de radio y quimioterapia.

La potencia disipada por estos nanoactuadores produce el calentamiento selectivo de las células cancerígenas, esta selectividad se deriva en que la célula cancerígena muera a temperaturas menores que la célula sana debido a una mayor perfusión. Los efectos patobiológicos, como la modificación de la estructura normal de fosfolípidos, proteínas y ácidos han sido demostrados en experimentos *in vitro* para temperaturas superiores a 42 ° C. Estos efectos conducen al deterioro de la integridad de las estructuras celulares, tales como el citoesqueleto y mitocondrias, y afecta la síntesis de macromoléculas, y la actividad de



algunas enzimas, en particular de aquellas involucradas en los sistemas de reparación del ADN⁸

En general ha sido establecido que las termoterapias asistidas con nanoactuadores se transformarán en un complemento importante de las modalidades oncológicas, aunque poco o limitado beneficio de sobrevida ha sido obtenido en tratamientos clínicos⁹ reforzando la idea de que es necesaria una mejora en la comprensión detallada de este procedimiento. Cabe enfatizar, que la traslación a la clínica no se concreta debido a problemas sin resolver relacionados principalmente con una drástica disminución en la eficiencia de calentamiento de las nanoestructuras al ser incorporadas por vía intratumoral, situación que lleva a un descontrol en el planeamiento de la dosis de nanopartículas adecuada. Recientemente, hemos encontrado evidencia experimental que indica que la drástica disminución en la eficiencia de calentamiento de las nanoestructuras al ser incorporadas por vía intratumoral se relaciona con la distribución de las nanoestructuras en el tumor¹⁰, por lo cual proponemos mejorar la distribución incluyendo una molécula ligando cuyo receptor se sobreexpresa en células tumorales.

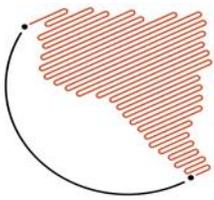
El ácido fólico es un compuesto vitamínico de bajo peso molecular que ha de-

mostrado ser eficaz como agente de direccionamiento de nanopartículas contra ciertos tipos de tumores tales como cáncer de mama, pulmón, riñón, ovario y boca¹¹ que sobreexpresan el receptor de ácido fólico. La sobreexpresión de este receptor, junto a la baja concentración de dicha proteína en las células normales hacen de éste una diana ideal para la vectorización de nanopartículas cargadas con fármacos quimioterápicos^{12, 13, 14}.

Cabe señalar que la hipertermia magnética se presenta como una herramienta prometedora para el tratamiento local de tumores sólidos. De hecho existen centros donde se realizan ensayos clínicos en pacientes en Alemania y Estados Unidos. Estos ensayos se realizan con un aplicador de campo que opera entre 2 y 15 kA/m a una frecuencia de, 100 kHz. Los ensayos en carcinomas de próstata y páncreas están en fase I (estudio de factibilidad) y los de glioblastoma multiforme en fase de aprobación¹⁵. Cabe señalar que, en este último caso solo se ha obtenido una sobrevida de un año y de 6 meses para el caso de primer recurrencia.

3. Objetivos

El objetivo general del trabajo es contribuir al establecimiento de la Nanomedicina en terapias oncológicas futuras.



En particular mejorar la termoterapia magnética utilizando direccionamiento mediante el uso de la señalización ligando de superficie – receptor celular.

Sintetizar estructuras magnéticas con alta prestación para disipación de calor bajo acción de campos de radiofrecuencia en el rango biomédico.

En este contexto, se trabaja en la funcionalización de la superficie de estas estructuras magnéticas de fase magnetita con ácido fólico, en la determinación de la inducción de muerte en respuesta a campos alternos in vitro en células tumores murinas, en el estudio de citotoxicidad y tasa de muerte celular luego de la aplicación de campo, para estimar el efecto del tratamiento terapéutico en el caso de la aplicación intratumoral.

4. Materiales y métodos

4.1. Cloruro de Hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99%), Cloruro de Hierro (II) tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99%), etanol absoluto, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), isopropanol, Triton X-100, 3aminopropil triethoxisilano (APTS) de Sigma Aldrich e Hidróxido de amonio al 28% de Cicarelli. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de Lab-Tek 8, placa de 95 wells y placas de cultivo de Ther-

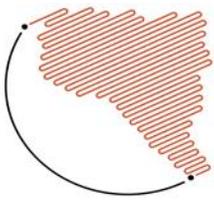
moScientific, dimetilsulfoxido (DMSO), PBS 1X, ácido clorhídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3), tiocianato $[\text{SCN}]^-$, estreptomina, glutamina y suero fetal bovino de Sigma Aldrich. Medio DMEM/F-12 de Invitrogen, HEPES de Promega, agua destilada., ácido fólico (AF).

Sensor de temperatura, Equipo TM-905. Termocupla Tipo K. Medidor de pH, equipo TPA IV, de AUTRONIX con sensor de punta de vidrio. Platina y agitador magnético. Bomba de vacío mecánica.

4.2. Síntesis de nanopartículas magnéticas (NPM)

Para la síntesis de las nanopartículas magnéticas 2.7450 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 1.061 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ fueron disueltas en 50,00 ml de agua destilada cada una, se agregan en balón de cuatro bocas. Se lleva a 60 °C. Desde bureta se agregan 3 ml de NH_4OH , se deja reaccionar 30 minutos con agitación magnética, se agregan 72 ml de NH_4OH por goteo, se deja reaccionar durante 1 hora. El producto obtenido se decanta con imán 0.1 T, se quita el sobrenadante y se lava 4 veces con 20 ml de agua destilada cada uno¹⁶

La concentración de hierro total del ferrofluido se midió por espectrofotometría UV-vis, midiendo la absorbancia en la longitud de onda de 480 nm característi-



ca del complejo Fe-SCN en un espectrofotómetro Shimadzu UV2600. Las alícuotas medidas de la muestra se trataron con HCl, y HNO₃ en caliente para disolver las nanopartículas y oxidar el Fe(II) a Fe (III), ya que este último forma un complejo (Fe(SCN)₅⁻²) soluble en fase acuosa y que posee una coloración muy intensa que permite un límite de detección bajo. Se midieron soluciones de concentración conocida de hierro con las cuales se construyó una curva de calibración y a partir de esta se puede cuantificar el contenido total de hierro en las muestras de nanopartículas analizadas.

4.3. Caracterización de las NPM

Las micrografías TEM y las imágenes de difracción de electrones (ED) fueron obtenidas utilizando un microscopio electrónico JEOL JEM-1210, que funciona a 120 kV. Para este fin, se secó una gota de coloide sobre una grilla de cobre recubierto de carbono.

Las medidas de magnetización (M) en función del campo magnético aplicado (H) se realizaron a temperatura ambiente utilizando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) Lake Shore 7404 operado entre -1.8 y 1.8 T. Para la medida 50 µl de muestra se envasaron en sachet termo contraíble.

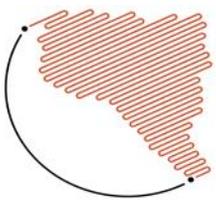
Para la medida de Specific Absorption Rate (SAR) se utilizó en equipo aplicador portátil de Campo Magnético Alternado (AMF) 100 kHz, 117 Gauss o 9.3 kA.m-. Las muestras se centraron en la bobina. La temperatura fue medida para la caracterización de los geles de NPs. Un sensor de fibra óptica se colocó en el centro de la muestra conectado a un acondicionador de señal calibrado (Neoptix) con una precisión de ± 0.1 °C. La temperatura fue detectada durante todo el experimento.

4.4. Funcionalización de las superficies de las NPM

La funcionalización de las superficies de las nanopartículas se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito¹⁷ de Nanopartículas secadas en bomba de vacío durante 3.5 hs, 60 mg de Nanopartículas fueron suspendidas en 0.15 ml de APTS y 16.6 ml de Etanol absoluto. Se deja en agitación magnética durante 8 horas a temperatura ambiente.

La solución se decanta con imán 0.1T, se quita el sobrenadante y se lava 4 veces con etanol absoluto. Se resuspende en 2.5 ml de etanol absoluto.

50 mg AF y 18 mg EDC se disuelven en 2.5 ml de DMSO con agitación magnética, 30 minutos a temperatura ambiente.



Se agregan 2.5 ml de la suspensión de nanopartículas y se deja con agitación magnética, 24 horas a temperatura ambiente.

La solución se centrifuga a potencia 4 durante 15 minutos, se descarta el sobrenadante y se lava 3 veces con PBS 1X, pH=7.07.

La muestra se resuspende en 20 ml de PBS 1X y se guarda en heladera.

4.5. Cultivo celular

Células LM3¹⁸, malignas de ratón, son mantenidas en botellas T25 con dos pasajes por semana diluyendo 1/5 o 1/10, según ritmo de crecimiento y necesidades experimentales.

Medio de cultivo DMEM-F12 con 10 % de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 6g/L de HEPES 1X y 1 vol % antibiótico penicilina-estreptomicina (p/s, 10.000U/ml).

Medio de congelamiento 90% de SFB y 10 % DMSO, se descongelan aproximadamente 3 millones por criotubo y se pasan a medio de cultivo con 20% de SFB.

Las células fueron cultivadas en condiciones estándar (37 °C, 5% CO₂) en DMEM-F12 con 10 % de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 6g/L de HEPES y antibiótico (penicilina-estreptomicina).

4.6. Viabilidad celular y ensayos de toxicidad

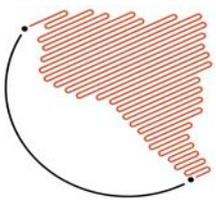
La viabilidad luego de 24 horas de exposición a concentraciones variables de NPs en solución (10-200 µg.mL⁻¹) fue evaluada usando el Test MTT. Para esto, las células LM3 fueron sembradas en placa de 96 wells a 60% de confluencia antes de la adición de NPS (APTS y AF, 100 µL) diluidas en DMEM-F12. Fueron consideradas seis réplicas por condición (concentración y tiempo de incubación) NPs con y sin AF.

Los Wells control consistían de células no expuestas a NPs (control de 100% de actividad metabólica).

Luego del tiempo de incubación, los Wells fueron vaciados, lavados tres veces con PBS y luego expuestas a 100 µL de DMEM-F12 conteniendo 10 vol % del agente MTT (5 mg.mL⁻¹ en agua).

Luego de dos horas de incubación con el agente MTT, los Wells fueron vaciados, secados (10 minutos) antes de la adición de 100 µL de la solución de lisis celular (90 vol % isopropanol, 10 vol % Triton X-100, 0.1 vol% ácido clorhídrico 37°C).

La absorbancia a 562 nm de los cristales formados fue determinada en microplaca de lectura (BioTeck µQuant (Gen 5TM software)) y se expresó como un porcentaje de absorbancia de los Wells control no expuestos a NPM.



Los valores reportados son la media de las seis réplicas, Las barras de error corresponden al error de propagación.

4.7. Experimentos de hipertermia magnética en condiciones clínicas (100 kHz, 117 Gauss o 9.3 kA.m-1)

Estos experimentos fueron llevados a cabo en equipo aplicador portátil de Campo Magnético Alterno (AMF) con convección forzada de aire para enfriamiento, un dispositivo diseñado y construido para permitir frecuencias y dimensiones de campo con amplitudes compatibles con aquellos utilizados en ensayos clínicos. El dispositivo tiene un receptor cilíndrico (30 mm diámetro, 76 mm longitud) para mantener el ejemplo dentro del resonador inductor durante la aplicación de área¹⁹. En estos casos, las LM3 células se cultivan y se exponen al campo magnético en Lab-Tek 8, (55 mm longitud, 25 mm de ancho, 12 mm de altura). Un soporte de plástico sirvió como un baño térmico donde se agregó agua tibia (37 °C) para estar en contacto con el Lab-Tek durante la aplicación en el campo.

El Lab-Tek se centró entonces dentro del inductor resonante para garantizar la uniformidad del campo. Se emplearon dos cámaras Lab-Tek equivalentes, una para estar expuesta al campo magnético

y la otra para no estar expuesta a él (control sin campo). Previa aplicación de campo, se sembraron células LM3 (400 μ L por well) en la cámara de múltiples well y se dejó que alcanzaran aprox. 60% de confluencia dentro de una incubadora de cultivo celular (37 °C, 5% CO₂).

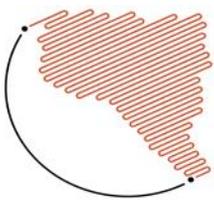
Posteriormente, se retiró el medio celular y se reemplazó con medio dopado con las NPM modificadas con ácido fólico a una concentración de 50 μ g.mL⁻¹ durante 24 h. Los wells de control se expusieron a medio celular sin NPM.

Después de 24 h, los wells se vaciaron, se enjuagaron tres veces con PBS y después se expusieron a 400 μ l de medio celular antes de colocarlos dentro del aplicador de AMF.

Se aplicaron tres ciclos de exposición al campo de 30 minutos (100 kHz, 117 Gauss o 9,3 kA.m⁻¹) seguidos de 10 minutos sin campo magnético, mientras que el campo de control no se mantuvo todo el tiempo dentro de la incubadora.

Al final de los tres ciclos, el ensayo MTT se realizó como se explica en la sección de viabilidad y toxicidad de las células. Se usaron 400 μ L de DMEM-F12 que contenía 10% en volumen del reactivo MTT (5 mg.mL⁻¹ en agua) y 200 μ L de la solución de lisis por well.

Se empleó un lector de microplacas Bio-Teck μ Quant (software Gen 5TM) para



medir la absorbancia a 562 nm. Los valores de actividad metabólica se expresan como un porcentaje de la absorbancia del control sin aplicación del campo, reflejando así el efecto de la aplicación del campo magnético sobre la actividad metabólica de cada condición evaluada. Estos experimentos se repitieron dos veces con un mismo lote de NPM. Los valores reportados son los medios de las tres réplicas. Las barras de error corresponden a la propagación del error.

5. Resultados y discusión

5.1. Caracterización de la estructura de las NPM

Mediante el análisis del patrón de Difracción de Electrones (DE) se evidenció la naturaleza de las nanopartículas comprobándose que la reacción de síntesis fue exitosa obteniéndose magnetita. El patrón fue indexado con la estructura cúbica de la spinela inversa (grupo espacial $Fd\bar{3}m$, tarjeta de datos #750449).
Figura 1

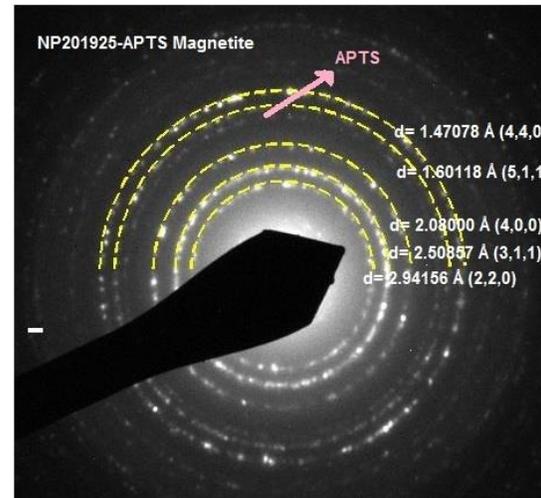


Figura 1: Difracción de electrones. Confirma que las nanopartículas sintetizadas son de Magnetita.

Pueden observarse partículas individuales de forma esférica y no se detecta formación de agregados durante la síntesis. Una imagen representativa se muestra en la Figura 2.

El diámetro medio y la polidispersidad de cada muestra se determinaron contando y midiendo más de 300 partículas a partir de imágenes Microscopia de Transmisión de Electrones TEM con el software ImageJ. Una vez obtenido el histograma de tamaños se ajustó una distribución lognormal.

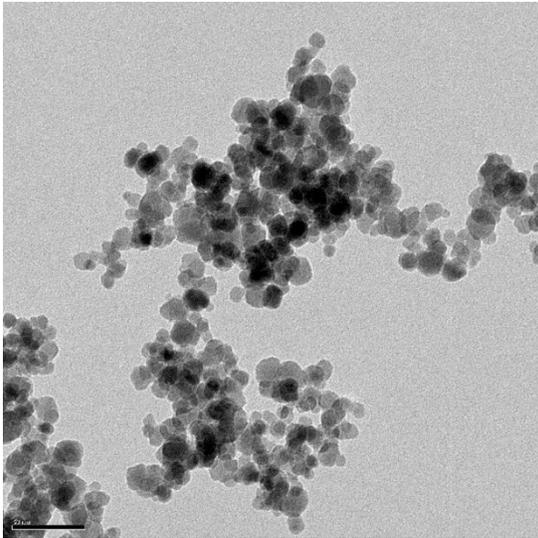
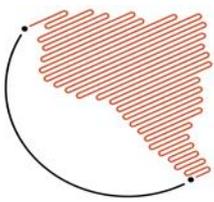


Figura 2: Imagen TEM, de las nanopartículas de magnetita.

El diámetro promedio obtenido para las nanopartículas fue de 11.4nm con una desviación estándar de 1.94. Figura 3 Mediante la medida del Potencial ζ , Tabla 1, se pudo evidenciar la correcta incorporación del APTS y del AF en la superficie desnuda de las nanopartículas. En primera instancia la unión del APTS dejó expuesto el grupo funcional (SiO-), luego, la incorporación del AF dejó expuesto el grupo funcional (COO-). Se puede observar que las superficies de las nanopartículas desnudas posee carga positiva, cuando se une covalentemente el APTS la superficie adquiere carga negativa, mientras que en el paso final, al incorporar a la superficie el AF, la carga negativa se incrementa debido a

los grupos funcionales negativos tanto del APTS como del AF.

El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido fólico se evaluó mediante Dispersión de luz dinámica (DLS), obteniéndose un valor medio de 206 nm. Figura 4.

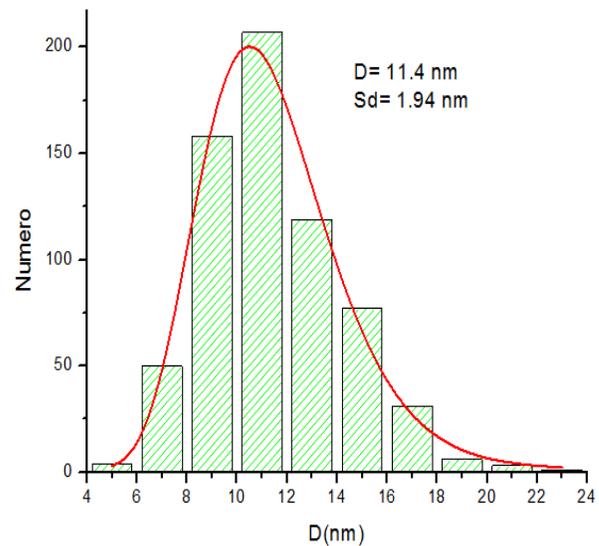


Figura 3: Histograma obtenido a partir del conteo de NPM observadas por micrografías TEM.

	Potencial ζ
NPs	4.74
NPs + APTS	-5.47
NPs + APTS + AF	-24.17

Tabla 1: Valores de Potencial ζ evaluado en los distintos pasos de la funcionalización de las nanopartículas.

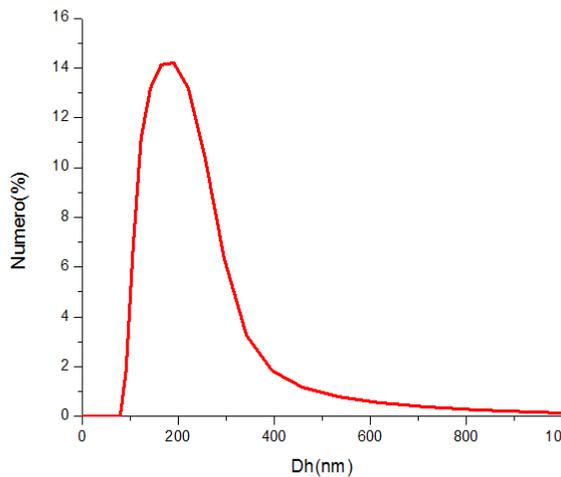
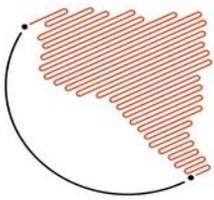


Figura 4: Diámetro hidrodinámico de nanopartículas funcionalizadas con ácido fólico, obtenido por DLS.

La capacidad de calentamiento de las nanopartículas de magnetita sintetizadas y funcionalizadas con ácido fólico se evaluó en equipo AMF, en un gel de agarosa que contiene 2mg de hierro uniformemente distribuido. Del ajuste de la pendiente inicial se obtiene una pendiente de 0.014 C/s de la cual se deriva la Tasa de Absorción Específica (SAR del inglés SpecificAbsorptionRate) de 7.53 W/gFe, calculada con la siguiente ecuación:

$$SAR = \frac{C * \frac{dT}{dt}}{x}$$

Siendo C la capacidad calorífica de la agarosa $4.3 \pm 0.1 \text{ J cm}^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1} \left[\frac{\text{J}}{\text{K m}^3} \right]$ y x la concentración de la solución de nanopartículas expresada en mgFe/ml.

Figura 5.

La caracterización magnética de las NPM se realizó en la suspensión coloidal

acuosa. En la figura 6 se observa el comportamiento característico de un conjunto de nanopartículas superparamagnéticas. No se observa coercitividad y los datos fueron bien ajustados con una función Langevin pesada con una distribución lognormal de momentos magnéticos, que tiene en cuenta la distribución de momentos de las nanopartículas debido a la distribución de tamaños. De este análisis se obtiene la magnetización de saturación de las NMP funcionalizadas con AF de 88.5759 emu/gFe. Esta propiedad es importante porque está estrechamente ligada con la capacidad de disipación de calor de las NPM. Figura 6

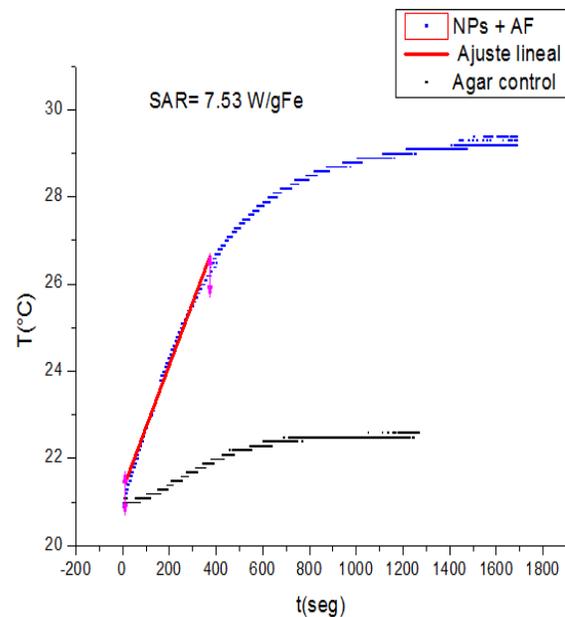


Figura 5: Ensayo de hipertermia en aplicador de campo, bajo condiciones clínicas, 100 kHz, 117 Gauss o 9.3 kA.m⁻¹ Curva de calentamiento de NPM funcionalizadas con ácido fólico.

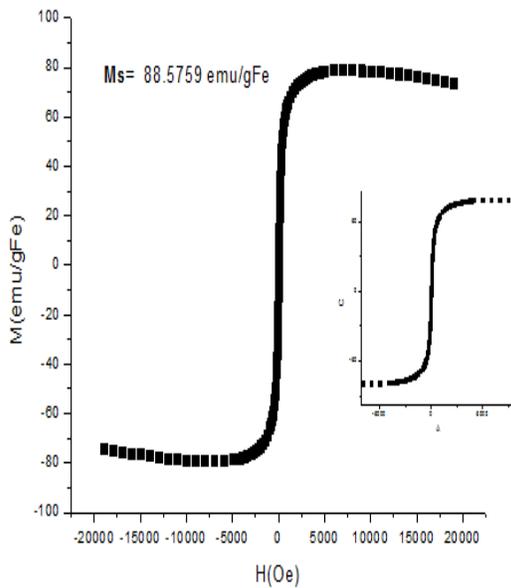
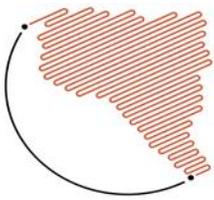


Figura 6: Magnetización máxima obtenida para las NPM funcionalizadas con ácido fólico.

5.2. Ensayos in-vitro de citotoxicidad

El ensayo in-vitro en células LM3 evidenció que la toxicidad de las NPM funcionalizadas con AF es apreciable a concentraciones superiores a 50 $\mu\text{g/ml}$. Figura 7. Por este motivo se eligió 50 $\mu\text{g/ml}$ como concentración para el ensayo de inducción de muerte celular por aplicación de campo alterno (hipertermia magnética).

Las células expuestas a las NPM funcionalizadas con AF y sometidas luego al campo magnético pierden aproximadamente 6-7% de su viabilidad respecto del control no expuesto al campo.

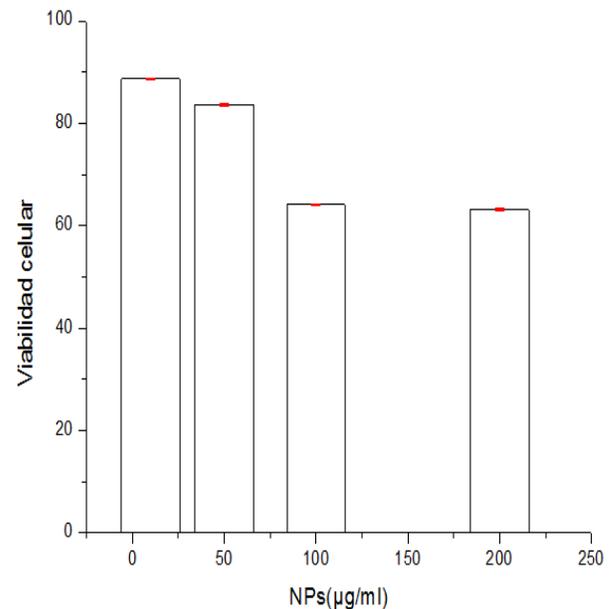
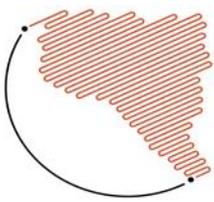


Figura 7: Histograma de viabilidad celular luego de incubación en contacto con NPM + AF durante de 24 horas y posterior aplicación de campo magnético.

6. Conclusiones

Las nanopartículas sintetizadas por el método de co-precipitación en medio acuoso resultaron ser nano-agentes prometedores para la aplicación de hipertermia magnética en el tratamiento selectivo del cáncer. La funcionalización de la superficie resultó exitosa, pudiendo aplicarse dicho protocolo en futuros nano-agentes.

Viendo los resultados del ensayo in-vitro, donde en condiciones de aplicación de campos biomédicos la muerte celular inducida in vitro fue muy baja, evaluamos la posibilidad de continuar con el desa-



rollo de nano-agentes que posean mejores valores de SAR, para esto se trabajará en la síntesis de nanoflowers, que consten en nanopartículas individuales ensambladas y que posean momentos magnéticos alineados en la misma dirección, y su posterior funcionalización con APTS y AF. A fin de evitar aumentar la dosis de NPM o aumentar los valores de amplitud de campo y frecuencia a valores fuera del rango biomédico.

7. Referencias bibliográficas

¹S. B. Field, C. C. Morris. (1983)The relationship between heating time and temperature: its relevance to clinical hyperthermia. *RadiotherOncol. J EurSocTher-RadiolOncol.* 1:179.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(83\)80020-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(83)80020-6)

²S. A. Sapareto, W. C. Dewey.(1984) Thermal dose determination in cancer therapy. *Int J RadiatOncolBiol Phys.* 10:787.

DOI: [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(84\)90379-1](https://doi.org/10.1016/0360-3016(84)90379-1)

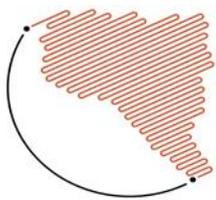
³F. Ulrich, D. Nestler, H. Niehoff, P. Wust,B. Thiesen, H. Orawa, V. Budach, A. Jordan (2011). Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined

with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. K. Maier-Hauff, J. Neuro-Oncol.103, 317. DOI: 10.1007/s11060-010-0389-0

⁴D. Coral, P. Mendoza Zélis, M. Marzia; M. Morales, A. Craievich, F. Sanchez, M. Fernández van Raap. (2016)Effect of nanoclustering and dipolar interactions in heat generation for magnetic hyperthermia.*Langmuir*, 32 (5), pp 1201–1213, DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b03559

⁵M. B. Fernández van Raap, D. F. Coral, S. Yu, G.A. Muñoz, F. H. Sánchez, A.Roig, (2017) Anticipating hyperthermia efficiency of magnetic colloids by a semi-empirical model: a tool to help medical decisions *PhysChemChem Phys.*8;19(10):7176-7187. doi: 10.1039/c6cp08059f

⁶P. Hugounenq, M. Levy, D. Alloyeau, L. Lartigue, E. Dubois, V. Cabuil, C. Ricolleau, S. Roux, C. Wilhelm, F. Gazeau, R. Bazzi, (2012). Iron oxide monocrytallinenanoflowers for highly efficient magnetic hyperthermia, *J. Phys. Chem. C* 116(29), 15702–15712 <https://doi.org/10.1021/jp3025478>



⁷A Villanueva, M Canete, AG Roca, M Calero, S Veintemillas-Verdaguer, CJ Serna, et al. (2009) The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology*; 20(11):115103. DOI: 10.1088/0957-4484/20/11/115103

⁸Dewey WC. (1994) Arrhenius Relationships from the Molecule and Cell to the Clinic. *International Journal of Hyperthermia*;10(4): 457–83. DOI: 10.1080/02656730902747919

⁹ S. Luo, L. F. Wang, W. J. Ding, H. Wang, J. M. Zhou, H. K. Jin, S. F. Su and Ouyang W.W., *OA Cancer*, (2014) 2, 2.

10 I. Hilger.(2013) In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia. *Int J Hyperthermia*,29(8): 828–834 doi: 10.3109/02656736.2013.832815.

¹¹S. Kobayashi, A. Ohki, M. Tanoue, Y. Inaoka, K. Murase, (2017)Comparative Study of Extracellular and Intracellular Magnetic Hyperthermia Treatments Using Magnetic Particle Imaging *Open J.*

¹²D. Coral, P. A. Soto, V. Blank, A. Veiga, E. Spinelli, S. Gonzalez, G. Saraco, M. Bab, D. Muraca, P. C. Setton-Avruj, A.

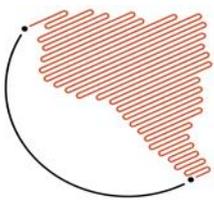
Roig, L. Roguin and M. B. Fernández van Raap, (2018) Nanoclusters of crystallographically aligned nanoparticles for magnetic thermotherapy: aqueous ferrofluid, agarose phantom and ex-vivo melanoma tumour assessment *Nanoscale*, 10, 21262 - 21274, DOI: 10.1039/C8NR07453D

¹³Teow Y. y Valiyaveetil S. (2010)Active targeting of cancer cells using folic acid-conjugated platinum nanoparticles. *Nanoscale*. 2: 2607-2613. DOI: 10.1039/c0nr00204f

¹⁴S. Sriraman, G. Salzano, C. Sarisozen, V. Torchilin. (2016) Anti-cancer activity of doxorubicin-loaded liposomes co-modified with transferrin and folic acid *Eur J Pharm Biopharm*.105: 40-49. DOI:10.1016/j.ejpb.2016.05.023

¹⁵<http://www.magforce.de/en/produkte.html>

¹⁶M. E. de Sousa, M. B. Fernández van Raap, P. C. Rivas, P. Mendoza Zélis, P. Girardin, G. A. Pasquevich, J. L. Alessandrini, D. Muraca, F. H. Sánchez, (2013) Stability and Relaxation Mechanisms of Citric Acid Coated Magnetite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia *J. Phys. Chem. C*, 117, 5436–5445. <https://doi.org/10.1021/jp311556b>



¹⁷P. Azcona, I. López-Corral, V. Lassalle. (2018) Fabrication of folic acid magnetic nanotheranostics: An insight on the T formation mechanism, physicochemical properties and stability in simulated physiological media. *Colloids and Surfaces A* 537 185–196
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.025>

¹⁸A. J. Urtreger, V. E. Ladedá, L. I. Puricelli, A. Rivelli, M. Vidal, E. Sacerdote de Lustig, E. D. Bal de Kier Joffe. (2004) Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines, *Breast Cancer Res.* 6(2): R116–R129. doi: 10.1186/bcr757

¹⁹S.A. González, E.M. Spinelli, A.L. Veiga, D.F. Coral, M.B. Fernández van Raap, P. Mendoza Zélis, G.A. Pasquevich and F.H. Sánchez. (2017) Portable Electromagnetic Field Applicator for Magnetic Hyperthermia Experiments 8 th IEEE Latin American Symposium on Circuits and Systems Circuits & Systems (LASCAS), IEEE 8th Latin American Symposium nLASCAS 2017 doi: 10.1109/LASCAS.2017.7948091

8. Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Mariana Tasso por su invaluable ayuda con los ensayos in vitro, las medidas de DLS y Potencial ζ , a la Dra. Luciana Juncal quien colaboró en las medidas de concentración de la solución de ferrofluido, y a la Dra. María Elisa de Sousa quien colaboró en la medición de SAR.

9. Recursos financieros

- Proyecto UNLP 11/X807
- Proyecto PIP 0897, CONICET
- Instituto Nacional del Cáncer, Argentina