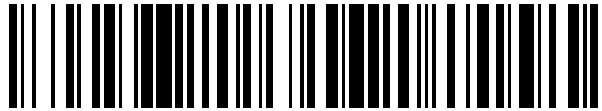


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 432**

21 Número de solicitud: 201431531

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00 (2011.01)
A61N 1/40 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.05.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070753

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**BARBER CASTAÑO, Domingo Francisco;
MEJÍAS LAGUNA, Raquel;
TAJADA HERRÁIZ, José Luis;
PÉREZ YAGÜE, Sonia y
TALELLI, Marina**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **DISPOSITIVO PARA GENERAR HIPERTERMIA EN CÉLULAS MEDIANTE NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS (MNPs), MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA EN CÉLULAS
QUE HACE USO DEL MISMO Y USO DEL DISPOSITIVO PARA DETERMINAR
TEMPERATURA EN CÉLULAS**

57 Resumen:

Dispositivo para generar hipertermia en células mediante nanopartículas magnéticas (MNPs). Método de determinación de temperatura en células que hace uso del mismo y uso del dispositivo para determinar temperatura en células.

El dispositivo permite generar hipertermia en nanopartículas magnéticas (conocidas como MNPs por sus siglas en inglés) mediante la inducción controlada de un campo magnético de manera que la temperatura de las MNPs afectadas por dicho campo magnético se controla de manera directa y se puede monitorizar para variar dicha temperatura mediante modificaciones en tiempo real del campo magnético inducido y aplicado a dichas MNPs. Todo el proceso se encuentra controlado mediante una unidad central de proceso que a su vez permite automatizar todo el proceso. Asimismo se describen en este documento tanto un método para determinar temperatura celular mediante la implementación del dispositivo de la invención como el uso del mismo para determinar temperatura en células.

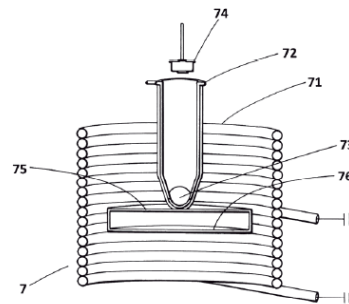


FIG. 1

**DISPOSITIVO PARA GENERAR HIPERTERMIA EN CÉLULAS MEDIANTE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (MNPS), MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE
TEMPERATURA EN CÉLULAS QUE HACE USO DEL MISMO Y USO DEL DISPOSITIVO
PARA DETERMINAR TEMPERATURA EN CÉLULAS**

5

DESCRIPCIÓN

OBJETO DE LA INVENCION

10 El objeto de la invención se enmarca en el campo de la nanotecnología.

Más concretamente el objeto de la invención que se describe en este documento está orientado a un sistema para generar hipertermia en células previamente tratadas con nanopartículas magnéticas (MNPs) mediante la inducción de Campos Magnéticos Alternos (AMFs) con control de las temperaturas alcanzadas en el interior de la célula. Para lograr dicho control el dispositivo consta con la capacidad de aplicar simultáneamente AMFs al cultivo celular tratado con MNPs y a una muestra de referencia de la cual se obtienen las lecturas de temperatura en la cual se encuentra las MNPs en la misma concentración que las presentes en el interior de la célula.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad los sistemas existentes empleados para generar hipertermia en nanopartículas magnéticas (MNPs) funcionan mediante el efecto de la inducción generada sobre éstas por Campos Magnéticos Alternos AMFs.

25

Actualmente existen generadores de AMF que trabajan en una frecuencia fija que es seleccionada previamente sin capacidad de poderse variar ésta durante el proceso de aplicación sobre las MNPs; sin embargo la complejidad del proceso de aplicación de hipertermia intracelular en cultivos *in-vitro*, que permiten el correcto estudio de los procesos de muerte celular ampliamente conocidos en la actualidad pero aún por determinar, requiere de un control muy preciso de la temperatura alcanzada por las MNPs absorbidas en el interior de la célula. En la actualidad diferentes estudios y publicaciones intentan dilucidar los procesos generados (apoptosis, autofagia, necrosis, termoablación etc) que conllevan a la destrucción de

30

estas células portadoras de MNPs y expuestas a un AMF. También son conocidas las soluciones que recurren al control de la intensidad del AMF (al tratarse de circuitos resonante LC variando la frecuencia de aplicación), dicha variación se hace para lograr mantener una temperatura que como hemos visto en el comentario anterior no toman del interior de las células, sino del medio celular (placa de cultivo) empleando sondas de temperatura de fibra óptica que no se ven afectadas por el AMF. Dichas soluciones presentan el problema de que al no captarse del interior de la célula el valor de la temperatura tomada no es nada precisa.

Uno de los mayores problemas para la aplicación de tratamientos de hipertermia en células vivas es que la temperatura alcanzada en el interior de las células no debe sobrepasar los 45°C ni ser menor de 43°C y en todo caso debe ser controlada. Se presentan por lo tanto dos inconvenientes:

- Al tratarse de un tratamiento que requiere de la aplicación de AMF no se pueden emplear elementos con partes metálicas para la lectura de la temperatura.
- Dado el tamaño de las células y su naturaleza es imposible medir la temperatura de su interior sin alterarlas y alterar la medida.

Los actuales equipos para la aplicación de AMF in-vitro constan de sistemas de medición de la temperatura alcanzada, pero solo en el medio de cultivo en el cual se encuentran las células. El inconveniente de éstos es obvio, ya que únicamente pueden reflejar la temperatura del medio, no la alcanzada por las concentraciones de MNPs presentes en los orgánulos (lisosomas) de las células que las contienen tras su absorción.

Como ya se ha mencionado existen equipos donde las mediciones de temperatura no cuentan con la posibilidad de mostrar la temperatura alcanzada en el interior de la célula, por lo que es imposible con esos dispositivos la obtención de una temperatura precisa y constante en las MNPs y la determinación de la temperatura de las células, lo que convierte en tarea prácticamente imposible la experimentación precisa de los procesos de hipertermia intracelular.

A la vista de lo anterior se hace necesaria una solución a la carencia de una referencia de la temperatura alcanzada en el interior de la célula y a la imposibilidad de una supervisión y ajuste continuo automatizado de la temperatura de las MNPs presentes en el interior de la célula durante el proceso de aplicación del AMF.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 En un primer aspecto de la invención se tiene un dispositivo para generación de hipertermia en MNPs que aporta una solución al problema anteriormente planteado, al permitir generar una variación automatizada de la frecuencia y amplitud del AMF generado, posibilitando la regulación de la temperatura alcanzada por las MNPs bajo su influencia, así como la posibilidad de efectuar una medición de alta precisión por comparación de la temperatura alcanzada por estas MNPs en el interior de la célula.

10 Para ello se emplea al menos una MNP de referencia que es exactamente igual a aquella MNPs que se encuentra en el interior de la célula; si bien preferiblemente se emplea una multitud de MNPs presentadas como una concentración de MNPs calibrada o muestra de referencia de concentración conocida, que será similar a la conocida en el interior de la célula.

15 Dado que el proceso de captación de las MNPs por las células es ampliamente conocido en biología, las vías de distribución y asimilación celular son asimismo conocidas, pudiéndose conocer por varios medios la concentración de MNPs en el interior de las células una vez éstas son depositadas en el medio de cultivo.

20 El dispositivo aquí descrito se basa en el conocimiento de esta concentración para realizar una medición precisa de la temperatura de una concentración de MNPs o muestra de referencia de concentración conocida ubicada dentro un contenedor como puede ser un tubo Eppendorf que se encuentra alojado en el interior del dispositivo y expuesto al mismo AMF aplicado al cultivo *in vitro* a procesar.

25 Esto permite la lectura continua del contenido de este contenedor (un tubo Eppendorf por ejemplo) mediante una sonda de temperatura sin contacto que puede estar basada en una pila receptora de infrarrojos que está alojada en el exterior de la zona afectada por el AMF generado cuya incidencia provocaría un aumento de temperatura en sus partes metálicas lo cual iría en detrimento de la medida a realizar; dicha sonda de temperatura sin contacto permite
30 conocer la temperatura de las MNPs de referencia con una precisión de 0,01°C, que será similar a la temperatura alcanzada por las MNPs absorbidas por las células presentes en el cultivo *in vitro*.

En un segundo aspecto de la invención se tiene un método para determinar temperatura en células utilizando del dispositivo para generación de hipertermia en MNPs del primer aspecto de la invención. Dicho método del segundo aspecto de la invención requiere de la inserción previa de nanopartículas magnéticas MNPs en la célula, dicha inserción se puede hacer de distintas maneras, siendo la funcionalización (por ejemplo con una proteína) de las MNPs de manera que la célula ingiera las mismas hacia su lisosoma un ejemplo, pero puede llevarse a cabo de otras maneras. Una vez tenemos las células con las MNPs en su interior se depositan en el portamuestras del dispositivo de la invención el cual ya tiene las nanopartículas magnéticas de referencia en el contenedor y se procede a generar al menos un campo magnético, preferiblemente alterno (conocido por sus siglas en inglés AMF) y controlado de forma continua en el interior de la bobina, preferiblemente en una zona donde el campo magnético inducido sea homogéneo como puede ser la central del interior de la bobina, provocando hipertermia en las MNPs (las que se encuentran en el interior de la célula y las de referencia); dado que ambas MNPs son exactamente iguales y reaccionan igual al campo magnético se puede determinar la temperatura de unas midiendo las de las otras, es decir se puede determinar la temperatura de las MNPs de referencia mediante la toma de temperatura haciendo uso de la sonda y esa temperatura registrada se tiene por igual a aquella temperatura de las MNPs presentes en el interior de la célula pues son idénticas y las condiciones a las que están sometidas son iguales.

Al generar el campo magnético la temperatura de ambos tipos de MNPs, las de referencia y las ubicadas en el interior de la célula sufren una elevación de temperatura (hipertermia) a causa de la incidencia del campo magnético AMF, a continuación se procede a captar mediante la sonda de temperatura sin contacto la temperatura de las nanopartículas magnéticas de referencia, alojadas preferentemente en el fondo del tubo Eppendorf, para posteriormente poder, de manera indirecta, determinar la temperatura de las nanopartículas magnéticas que están en el interior de la célula a partir de la temperatura de estas nanopartículas magnéticas de referencia. Cabe destacar que el contenedor, en este caso el tubo Eppendorf, se encuentra ubicado en el interior de la bobina de tal manera que la sonda de temperatura se encuentra ubicada en una zona externa al campo magnético generado por la bobina, mientras que las MNPs de referencia se encuentran ubicadas en el contenedor en una zona interior de la bobina donde el campo magnético es homogéneo, es decir en una zona esencialmente central del interior de la bobina.

En un tercer aspecto de la invención se tiene un uso del dispositivo para generación de hipertermia en MNPs del primer aspecto de la invención para determinar temperatura en células.

5 **DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Muestra una sección de un detalle del modulo generador de campos magnéticos alternos AMFs.

Figura 2.- Muestra un esquema del dispositivo de la invención donde se aprecian los distintos componentes que lo conforman.

Figuras 3a, 3b – 3a) Muestra la capacidad de calentamiento de un primer tipo de MNPs (MNP1) durante la aplicación de un campo magnético alterno para dos concentraciones diferentes. 3b) Muestra la capacidad de calentamiento de otros dos tipos de MNP (MNP2 y MNP3) que se encuentran a una misma concentración.

Figura 4.- Muestra los resultados obtenidos tras realizar un análisis *in vitro* de células con MNPs y tratadas con hipertermia (HPTM).

Figura 5.- Muestra imágenes de microscopio óptico donde se aprecian células tratadas sólo con MNP y, en un segundo recuadro, células tratadas con MNPs durante 60 minutos de campo magnético alterno.

30 **REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION**

En una realización preferida de un aspecto de la invención referido a un dispositivo (1) para generar hipertermia en nanopartículas magnéticas (76) como el que se muestra en la figura

2, éste presenta un módulo generador (7) de Campos Magnéticos Alternos (AMFs), como el mostrado en la figura 1, el cual se encuentra gobernado por una unidad central de proceso (2) y englobado en una cámara isotérmica que aloja al menos el módulo generador (7) de campos magnéticos alternos AMFs.

5

Dicho módulo generador (7) de AMFs se encuentra adaptado para poder modificar al menos una de: frecuencia y amplitud de una onda a aplicar donde dicha modificación puede ser una variación en base al valor de una temperatura previamente medida en unas MNPs de referencia; contemplándose la posibilidad de que dicha variación de pueda producir de manera automática. En una posible realización alternativa se puede hacer uso de algoritmos que son seleccionados previamente, de manera que la regulación de la temperatura pueda efectuarse de varias formas: modulación de pulsos, de frecuencia, de amplitud o mixtas.

10

El módulo generador (7) de AMFs está basado en un sintetizador de frecuencias (3) destinado a controlar la modulación en frecuencia y que es controlado digitalmente y que posteriormente es amplificado por un una formación de transistores tipo de IGBTs (sus siglas en inglés correspondientes a: *Insulated-gate bipolar transistor*) que eleva una tensión hasta una limites necesarios para generar una onda senoidal con unas características necesarias para ser aplicada a un circuito de acoplamiento inductivo y a una bobina aplicadora. Un módulo de tensión regulable varía el voltaje entregado a los IGBTs y de esta forma controla la modulación en Amplitud que será la encargada de aplicar el AMF al cultivo *in vitro* y a las muestras de referencia de concentración conocida en el interior del tubo Eppendorf de manera simultánea.

15

20

25

El dispositivo (1) posee un sistema de criostato que permite controlar por microprocesador la temperatura de la bobina aplicadora del AMF en un valor prefijado mediante el control de la temperatura de un fluido que circula por su interior, y que permitirá en todo momento mantener las condiciones de temperatura ambientales dentro de los parámetros seleccionados (normalmente 37°C), lo que permite la realización de experimentos con cultivos *in vitro* dentro de parámetros estables y biológicamente aceptables.

30

El conjunto cuenta con un módulo de visualización de datos que facilita la visualización de parámetros correspondientes a la aplicación de AMFs a las MNPs y que tiene la capacidad de obtener y mostrar lecturas en tiempo real de todos los parámetros del proceso

(temperatura de las MNPs, corriente por la bobina aplicadora, frecuencia, amplitud, temperatura ambiente, etc.), datos que pueden representados gráficamente y almacenados por un sistema SCADA (*Supervisory Control And Data Acquisition*) que permite emplear, también en tiempo real, estos datos para posteriores trabajos de representación y análisis.

5

Adicionalmente, se han realizado las siguientes pruebas de concepto para determinar las condiciones de funcionamiento de la presente invención en diferentes escenarios:

Escenario 1. Monitoreo de nanopartículas para su capacidad de calentar

10

Las figuras 3A y 3B ilustran la capacidad de calentamiento de MNPs durante la aplicación de un campo magnético alterno para diferentes materiales de muestra mostrando, por una parte, la temperatura de la muestra y, adicionalmente, la temperatura de la bobina (*coil* normalmente, por su nomenclatura en inglés).

15

Una dispersión de MNPs en agua se colocó en un tubo Eppendorf y se colocó en el equipo. Un campo magnético alterno se aplicó con una intensidad de 250 kHz durante 40 minutos. La temperatura de la bobina se fijó a 37 °C, y la temperatura de la muestra se midió por la cámara sin contacto (conocidas en la técnica como cámaras "non-contact"). Ambas temperaturas se registraron utilizando el software SCADA y se representaron gráficamente para ver la capacidad de calentamiento de cada muestra.

20

Haciendo referencia a la figura 3A, se ilustra, en primer gráfico (31) la temperatura alcanzada para un intervalo de tiempo de una muestra de un primer material MNP1. Como conclusión principal, para una muestra de MNP1 se observa que alcanza una temperatura máxima de 49 °C y una variación de temperatura desde el tiempo 0 hasta el tiempo 2500 de 12 °C.

25

En un segundo gráfico (32), se ilustra que una muestra de MNP1 concentrada 10 veces, alcanza una temperatura máxima de 58 °C y una variación de temperatura desde el tiempo 0 hasta el tiempo 2500 de 20,5 °C.

30

Haciendo referencia a la figura 3B, se ilustra, en tercer gráfico (33) en el que la temperatura máxima alcanzada para una muestra de MNP2 es de 44 °C y una variación de temperatura

durante el intervalo de tiempo analizado de 6,5 °C.

En un cuarto gráfico (34), se ilustra que una muestra de MNP3, alcanza una temperatura máxima de 38,5 °C y una variación de temperatura durante el intervalo de tiempo analizado de 1,5 °C.

A partir de la pendiente de la curva de la temperatura de la muestra en los primeros 60 segundos de la aplicación de la AMF, se midió el índice de absorción específica de la MNPs (curva SAR, de inglés *specific absorption rate*), utilizando la ecuación:

$$SAR = \frac{C_s}{m_{Fe}} \cdot (m_{FF} \frac{\Delta T}{\Delta t});$$

En la que C_s es la capacidad de calentamiento del dispersante, m_{Fe} y m_{FF} la masa de hierro y del ferrofluido respectivamente, y $\Delta T/\Delta t$ es la pendiente de la curva.

En particular, para el caso de la muestra de MNP1 (es decir, la muestra del primer gráfico (31) de la figura 3A):

$$SAR = \frac{C_s}{m_{Fe}} \cdot (m_{FF} \frac{\Delta T}{\Delta t}) = 16 W/g$$

Siendo:

$$C_s = 4,181 J/g \text{ } ^\circ C$$

$$m_{Fe} = 2,505 mg$$

$$m_{FF} = 0,15 g$$

$$\Delta T/\Delta t = 0,0618 \text{ } ^\circ C/s$$

Escenario 2. Análisis in vitro de células con MNPs y tratadas con hipertermia

En un ejemplo de realización, la línea celular de cáncer de páncreas Panc02 se utilizó para probar la eficacia del equipo logrando la muerte de células tratadas con MNP tras la aplicación de un campo magnético alterno.

Las células fueron tratadas aplicando MNPs al medio de cultivo y se incubaron durante una noche para que entrara en las células, tras lo cual se lavan con PBS. A continuación, se insertaron las células tratadas con MNPs y células sin ningún tratamiento en el equipo y se aplicó un campo magnético alterno (250 kHz) durante una hora. La temperatura se fijó para alcanzar hasta 45 °C.

Haciendo referencia a la figura 4, en un octavo gráfico (8) se puede observar el aumento de temperatura así como la intensidad del campo. Como controles, se utilizaron células con o sin MNPs, en el que no se aplicó AMF alguno.

Después del tratamiento aplicado mediante AMFs durante una hora, la viabilidad celular se midió usando el kit de la actividad metabólica PrestoBlue. Los resultados se muestran en un noveno gráfico (9). Las células que fueron tratadas con MNPs y AMF durante una hora demostraron una disminución del 40% de la viabilidad, lo que demuestra que tuvo lugar un proceso de hipertermia (HPTM) causando muerte de las células tumorales.

Después de 24 horas, se observó una muerte celular incluso mayor, no observada para células sin tratamiento AMF tal y como se desprende de la figura 5, en la que, en un primer recuadro (10) se observan imágenes de microscopio óptico de las células tratadas sólo con MNP y, en un segundo recuadro (11), las imágenes de microscopio óptico obtenidas para células tratadas con nanopartículas y 60 minutos de campo magnético alterno, obtenidas a las 24 horas de la aplicación de éste.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1) para generar hipertermia mediante nanopartículas magnéticas (76), dispositivo caracterizado por que comprende asociados a una unidad central de proceso (2):

- un sintetizador de frecuencias (3) digital,
- un módulo de control de amplitud (4) ,
- un amplificador de potencia (5) asociado al sintetizador de frecuencias (3) y al módulo de control de amplitud (4), amplificador de potencia (5) que comprende una formación de transistores tipo IGBTs para ampliar las mismas y elevar una tensión hasta una límites necesarios para generar una onda senoidal,
- un circuito de acoplamiento (6) asociado al amplificador de potencia (5) y adaptado para recibir la onda senoidal, y
- un módulo generador (7) de campos magnéticos alternos AMFs asociado al circuito de acoplamiento (6) y que a su vez comprende:

- una bobina (71) asociada al circuito de acoplamiento (6) y adaptada para generar campos magnéticos alternos AMFs, continuos y/o pulsados,
- un contenedor (72) ubicado al menos parcialmente en el interior de la bobina (71) de tal manera que al menos parte de su contenido sea susceptible de recibir los campos magnéticos alternos AMFs que genera la bobina (71),
- al menos una nanopartícula magnética de referencia (73) ubicada en el interior del contenedor (72),
- una sonda de temperatura (74) sin contacto asociada al contenedor (72) y ubicada de tal manera que no sea susceptible de recibir los campos magnéticos alternos AMFs que genera la bobina (71), y
- un portamuestras (75) ubicada en el interior de la bobina (71) en contacto con una parte inferior de la contenedor (72) y de tal manera que al menos parte de su contenido sea susceptible de recibir campos magnéticos alternos AMFs que genera la bobina (71), portamuestras (75) que comprende en su interior las nanopartículas magnéticas (76).

2. Dispositivo según reivindicación 1 caracterizado por que adicionalmente comprende un sistema de criostato asociado a la una unidad central de proceso (2) y operativo para controlar mediante dicha unidad central de proceso (2) una temperatura de la bobina

aplicadora en un valor prefijado mediante un control de la temperatura de un fluido que circula por su interior.

- 5
3. Dispositivo según reivindicación 1 caracterizado por que adicionalmente comprende un módulo de visualización de datos adaptado para facilitar la captación y visualización de datos correspondientes a la aplicación de AMFs a las MNPs.
- 10
4. Dispositivo (1) según reivindicación 1 caracterizado por que la sonda de temperatura comprende una pila receptora de infrarrojos.
- 15
5. Dispositivo (1) según reivindicación 1 caracterizado por que adicionalmente comprende una cámara isotérmica que aloja al menos el modulo generador (7) de campos magnéticos alternos AMFs.
- 20
6. Dispositivo (1) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque el contenedor (72) se encuentra ubicado en el interior de la bobina (71) de tal manera que la nanopartícula magnética de referencia (73) se encuentre en una zona central de la bobina (71) donde los campos magnéticos alternos AMFs son homogéneos.
- 25
7. Método para determinar temperatura en células, método caracterizado por que hace uso del dispositivo (1) descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y por que comprende:
- 30
- i. insertar una pluralidad de nanopartículas magnéticas (76) en el interior de al menos una célula,
 - ii. colocar en el portamuestras (75) una muestra que comprende la célula con las nanopartículas magnéticas (76) en su interior,
 - iii. generar al menos un campo magnético alternos AMF en el interior de la bobina (71) provocando hipertermia en las nanopartículas (73 ,76)
 - iv. captar mediante la sonda de temperatura (74) una temperatura de las nanopartículas magnéticas de referencia (73),
 - v. determinar una temperatura de las nanopartículas magnéticas en el interior de las células (76) a partir de la temperatura de las nanopartículas magnéticas de referencia (73), y
 - vi. asignar como valor de temperatura de las nanopartículas alojadas en el interior de la

célula (76) el valor de la temperatura de las nanopartículas magnéticas de referencia (73).

- 5
8. Método según reivindicación 7 caracterizado porque el paso i comprende funcionalizar la MNP e insertarla en un medio en el cual se encuentran las células de manera que las MNPs entran en el interior de la célula.
- 10
9. Método según reivindicación 7 caracterizado por que la nanopartícula magnética de referencia (73) se encuentra en una suspensión de concentración conocida.
- 15
10. Método según reivindicación 7 caracterizado por que las nanopartículas magnéticas de referencia (73) se encuentran en concentración similar a aquella presente en el interior de la célula (75); donde dicha concentración depende de al menos uno de estos valores: volumen de lisosoma de la célula, el tipo de nanopartículas (73,76), el tiempo de exposición del cultivo celular a las nanopartículas (76), y la funcionalización de las nanopartículas (76).
- 20
11. Método según reivindicación 7 caracterizado por que la temperatura máxima provocada en el paso iii es de 45°C.
12. Uso del dispositivo (1) descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para determinación de temperatura en células.

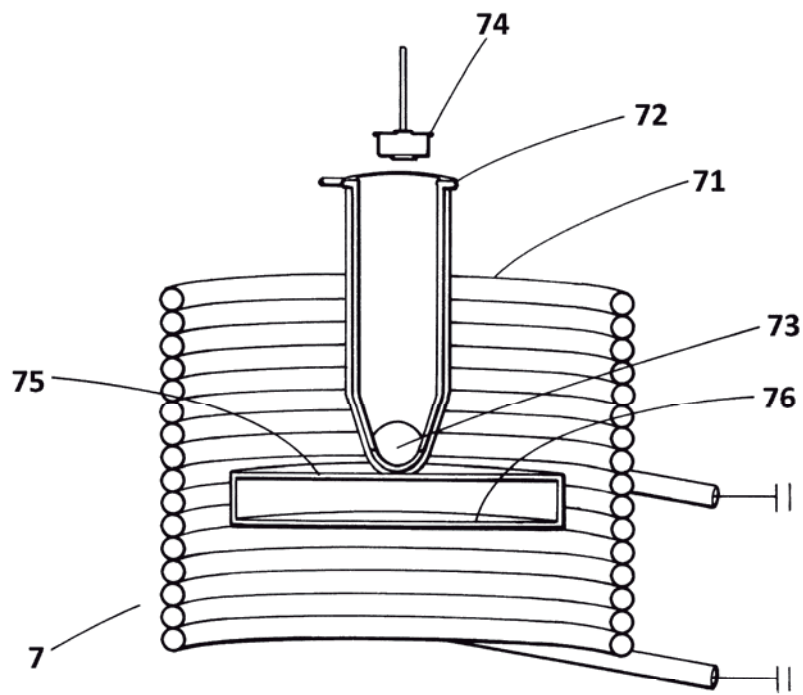


FIG. 1

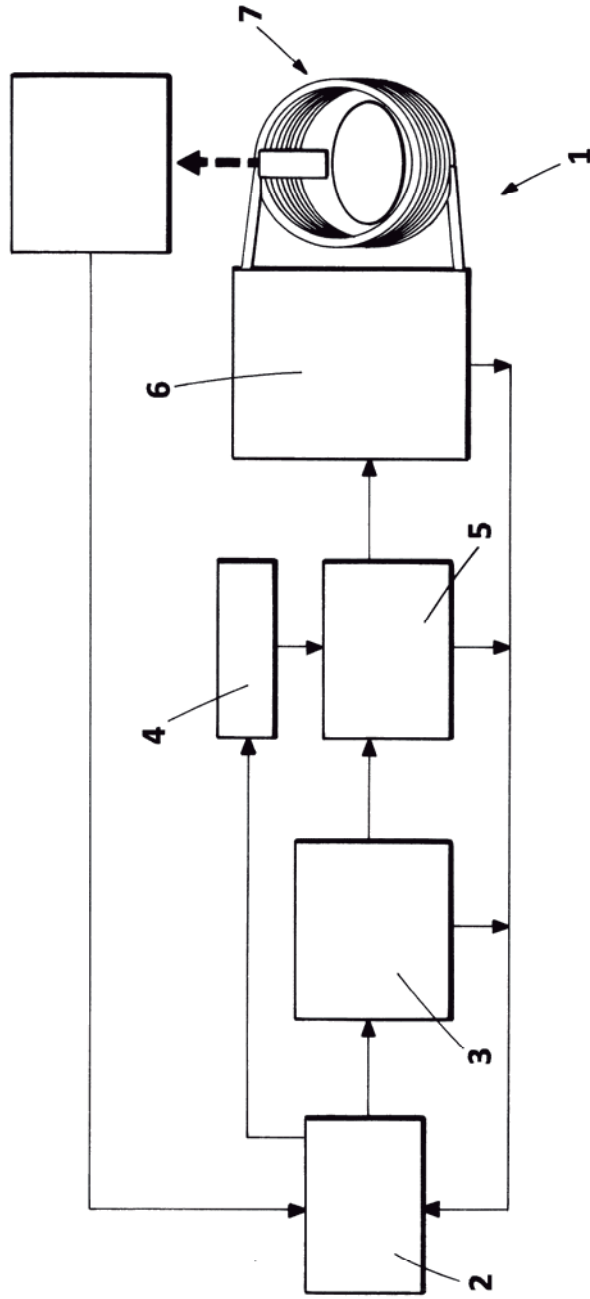


FIG. 2

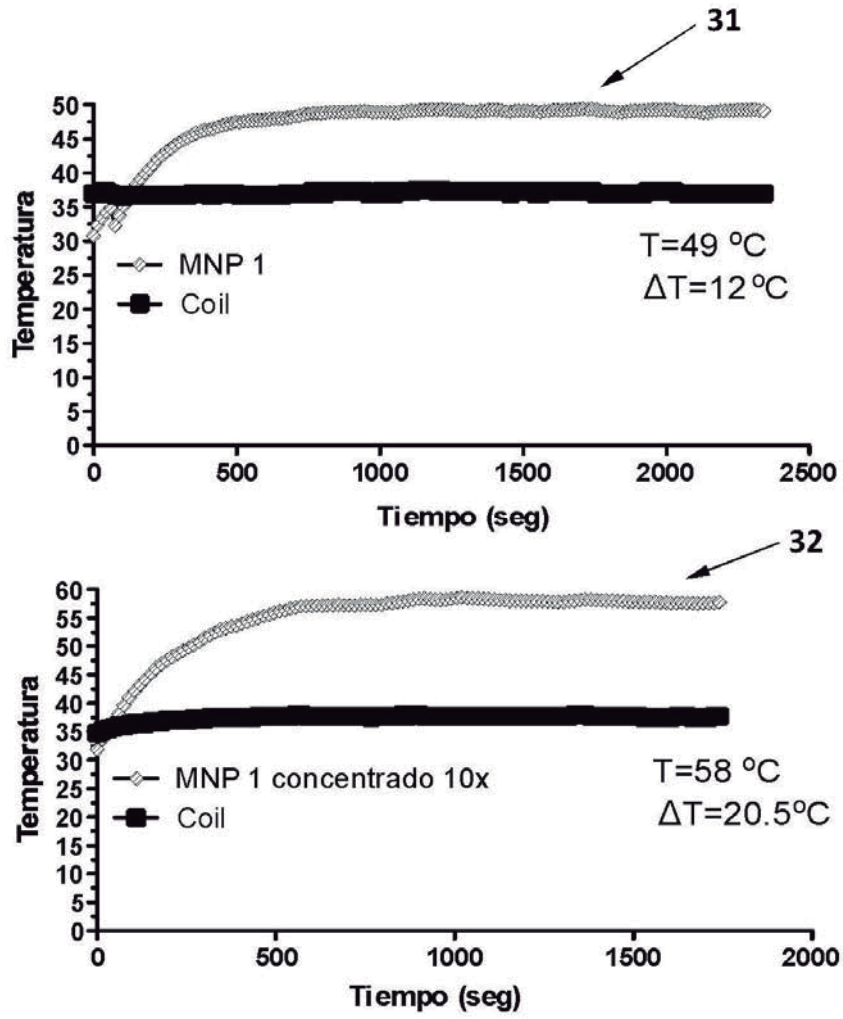


FIG. 3A

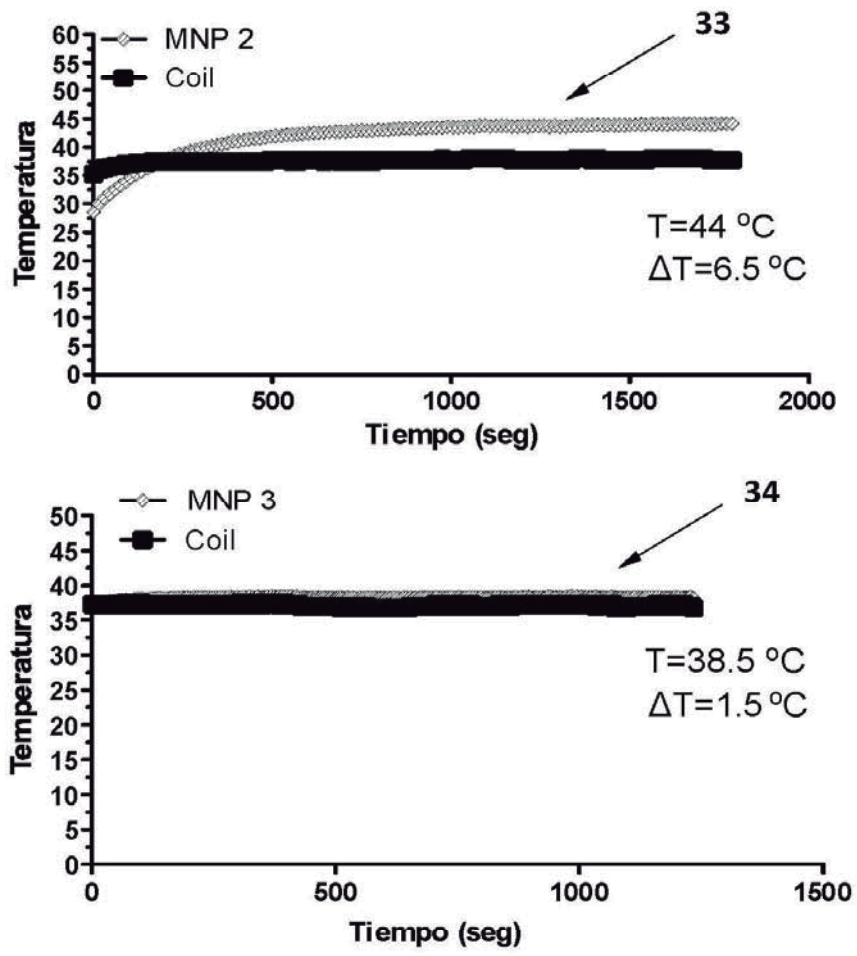


FIG. 3B

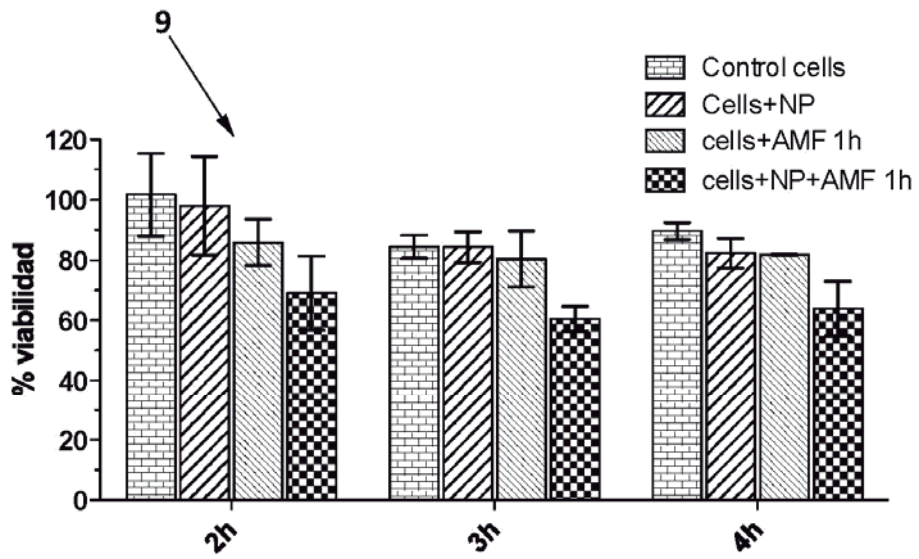
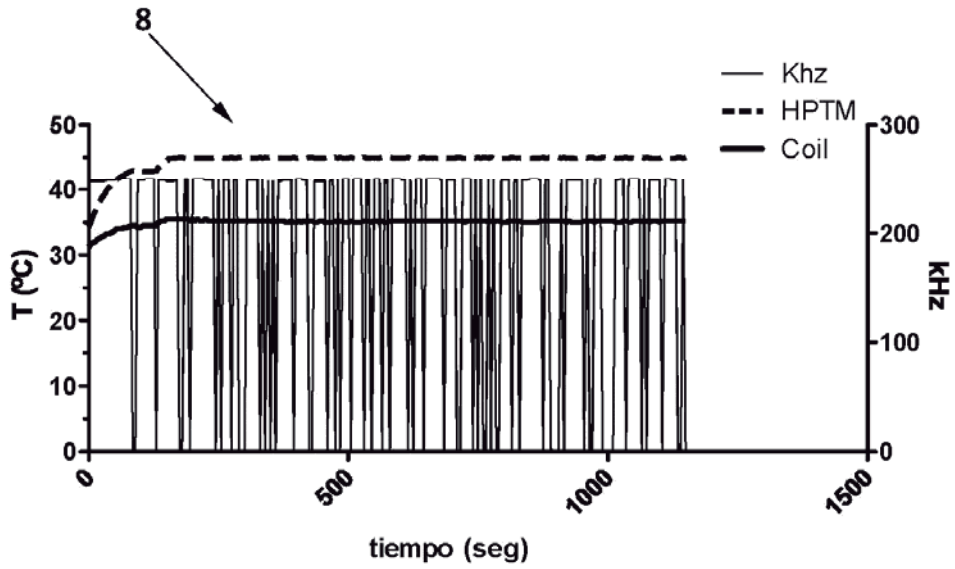


FIG. 4

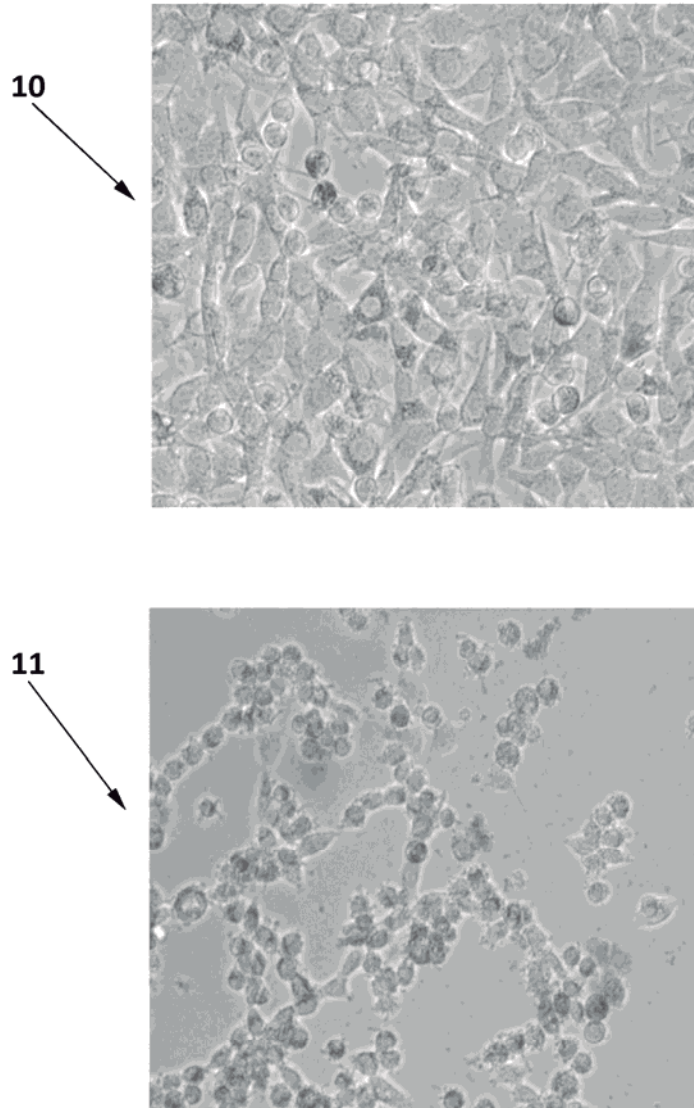


FIG. 5