



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Preparación y evaluación *in vitro* e *in vivo* de
nanocápsulas de rHDL marcadas con $^{225}\text{AcCl}_3$:
comparación con nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ para
radioterapia dirigida

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS

Presenta:

M.en C. y T.F. Tania Hernández Jiménez

Dirigida por:

Dra. en C. Guillermina Ferro Flores

Dra. en C. Keila Isaac Olivé

Dr. en C. Enrique Morales Ávila



Toluca de Lerdo, Estado de México, enero 2023

AGRADECIMIENTOS



ININ

La investigación del presente trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos adscrito a la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).

El desarrollo de esta tesis doctoral se realizó con financiamiento CONACyT, proyecto: CB2017-2018-A1-S-36841

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	12
1. ANTECEDENTES	14
1.1 Introducción	14
1.2 Microambiente tumoral.....	15
1.3 Hepatocarcinomas	19
1.4 Epidemiología de hepatocarcinomas	19
1.5 Terapia para HCC.....	20
1.6 Agentes de terapia molecular específica	22
Nanopartículas de rHDL como nanoacarreadores	22
Nanopartículas de óxidos de lantánidos	25
1.7 Terapia con radionuclidos receptores de péptidos (PRRT)	29
Emisores Beta y alfa	29
Emisores alfa	30
Emisores beta.....	31
1.8 Radiofármacos.....	32
1.9 Producción de Radiofármacos bajo BPF.....	34
2. JUSTIFICACIÓN.....	38
3. OBJETIVO	40
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4. HIPÓTESIS	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
5.1 Reactivos	42
5.2 Materiales.....	43
5.3 Equipo.....	44
5.4 Métodos Parte I.....	45
Caracterización de rHDL.....	47

Preparación de ^{225}Ac -DOTA-Benceno- <i>p</i> -SCN para su incorporación en rHDL.....	48
Determinación de la pureza radioquímica de ^{225}Ac -DOTA-benceno- <i>p</i> -SCN	49
Preparación de ^{225}Ac -rHDL	49
Estabilidad en suero del sistema ^{225}Ac -rHDL.....	50
Estudios <i>in vitro</i>	51
Calculo de dosis absorbida de radiación	52
Estudios de biodistribución	53
5.5 Métodos Parte II.....	55
6. RESULTADOS PARTE I	63
7. RESULTADOS PARTE II	81
8. Evidencia de Artículo publicado	102
9. Evidencia de Artículo enviado	105
.....	107
10. Colaboración en artículo publicado	108
11. Participación en congreso internacional.....	111
12. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO	112
13. REFERENCIAS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proteína FAP sobreexpresada en los fibroblastos asociados al cáncer en el microambiente tumoral.	16
Figura 2. Incidencia de mortalidad de cáncer en México en ambos sexos en 2020, de acuerdo con Globocan 2021.	20
Figura 3. Proceso de radioembolización transarterial con Ytrio-90 en pacientes con enfermedades gastrointestinales.	22
Figura 4. Composición de rHDL discoidal y esférica como sistemas de liberación de fármacos.	24
Figura 5. (A) Estructura de un radiofármaco. (B) Interacción del radiofármaco con un blanco específico.	33
Figura 6. Preparación de micelas lipídicas por el método de microfluidos.	46
Figura 7. Obtención de micelas lipídicas en solución coloidal. Microchip de 5 vías y microscopio digital de alta velocidad para el monitoreo de las soluciones durante la formación del flujo laminar.	46
Figura 8. Etapas para la incorporación de ^{225}Ac dentro de las nanocápsulas rHDL (^{225}Ac -rHDL).	50
Figura 9. Estructura química de DOTA-iFAP.	57
Figura 10. Estructura química de DOTA-iPSMA.	57
Figura 11. Preparación de ^{177}Lu]Lu ₂ O ₃ -iFAP/iPSMA.	58
Figura 12. Gráfica de efectos principales de FRR y TFR sobre el tamaño de las micelas.	64
Figura 13. Relación entre el radio de la velocidad de flujo FRR y el tamaño de partícula, a mayor FRR el tamaño disminuye.	65
Figura 14. (a) Distribución del tamaño de las micelas lipídicas y (b) Distribución de las rHDL por DLS.	66
Figura 15. Curva estándar para la cuantificación de proteína en las rHDL por el método de BCA. ...	67
Figura 16. Espectro FT-IR de micelas y rHDL.	68
Figura 17. Espectro UV-Vis de las micelas lipídicas (azul) y de las rDHL (rojo).	70
Figura 18. (a) Porcentaje de viabilidad celular para las líneas celulares: Fibroblastos, PC-3 y HEP-G2 con el tratamiento ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN. (b) Porcentaje de internalización en las líneas celulares con el tratamiento ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN.	72
Figura 19. (a) Porcentaje de viabilidad celular para las líneas celulares: Fibroblastos, PC-3 y HEP-G2 con el tratamiento ^{225}Ac -rHDL, (b) Porcentaje de actividad total internalizada en las líneas celulares con el tratamiento ^{225}Ac -rHDL.	73
Figura 20. Perfil biocinético de: (a) Sistema ^{225}Ac -rHDL y (b) ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN después de la administración intratumoral en ratones con tumores inducidos con células HEP-G2.	76
Figura 21. Análisis de Lu (OH)(CO ₂) por termogravimetría- calorimetría diferencial de barrido.	81
Figura 22. (a) Análisis de nanopartículas de Lu ₂ O ₃ por difracción de rayos X (XRD), (b) Análisis de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido.	82
Figura 23. Caracterización química de las nanopartículas ^{177}Lu]Lu ₂ O ₃ -iFAP/iPSMA formuladas bajo condiciones de buenas prácticas de fabricación (evaluación después del decaimiento total de ^{177}Lu): (a) Espectro FT-IR: (a1) nanopartículas de Lu ₂ O ₃ , (a2) iFAP, (a3) iPSMA y (a4) Lu-iFAP/iPSMA; (b) distribución de tamaño de Lu-iFAP/iPSMA por TEM, (c) micrografía de TEM de Lu-iFAP/iPSMA; (d) distribución del tamaño de Lu-iFAP/iPSMA por DLS (diámetro hidrodinámico).	84
Figura 24. Estructura esquemática de los complejos producidos Lu-DOTA-iPSMA/iFAP en la superficie de las nanopartículas de sesquióxido de lutecio.	86
Figura 25. Viabilidad celular de: (a) macrófagos U-937 y (b) Células de cáncer colorrectal HCT116 expuestas a las nanopartículas de ^{177}Lu]Lu ₂ O ₃ -iFAP/iPSMA por 24, 48 y 120 h (barra naranja). Las	

células no tratadas fueron consideradas como grupo control (barra gris). (c) Micrografías de fluorescencia representativas (400x) de cocultivo de células de cáncer colorrectal y células inmunitarias de macrófagos. El cocultivo se trató con nanopartículas de [¹⁷⁷Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA durante 1.3 y 24 h..... 89

Figura 26. (a)Efecto del tratamiento con [¹⁷⁷Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA en tumores de xenoinjerto de cáncer colorrectal HCT116 en ratones nu/un. (b) Micrografías de luz representativas (aumento 400x) de tinción inmunohistoquímica (color marrón oscuro) para marcadores de proliferación celular Ki67 y Pegfr en tumores de xenoinjerto de cáncer colorrectal 90

Figura 27. Análisis histológico (tinción H&E). Micrografías ópticas de secciones representativas con un aumento de 400 x de tejidos de cerebro, pulmón, riñón y ovario de ratones tratados con [¹⁷⁷Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA y sin tratar (control)..... 92

Figura 28. Análisis histológico (tinción H&E)(micrografías de luz): (a) Secciones representativas con aumentos de 400x y 1000x de hígado de ratones tratados con [¹⁷⁷Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA y de control; (b) Secciones representativas con un aumento de 400x y 1000x del bazo de ratones tratados con [¹⁷⁷Lu]Lu₂O₃/iPSMA y de control. 93

Figura 29. Análisis histopatológico (tinción H&E) de secciones representativas con un aumento de 400x y 1000x de tumores HCT1116 de ratones tratados con de [¹⁷⁷Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA y no tratados (control)..... 95

Figura 30. (a) Micrografías ópticas de células de médula ósea de ratones sanos a diferentes tiempos después del tratamiento con nanopartículas de [¹⁷⁷Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA, colchicina y sin tratamiento (control). (b) Valores de recuento de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea a diferentes tiempos. 96

Figura 31.(a) Progresión del tamaño del tumor para los grupos ¹⁷⁷Lu₂O₃-iPSMA, ¹⁷⁷Lu₂O₃-iFAP y ¹⁷⁷Lu₂O₃ en diferentes días del tratamiento, (b) Dosis media de radiación absorbida de ¹⁷⁷Lu₂O₃-iPSMA, ¹⁷⁷Lu₂O₃-iPSMA y ¹⁷⁷Lu₂O₃ administradas a los tumores HCT116..... 99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades de las rHDL como sistemas de liberación..... 24

Tabla 2. Métodos de síntesis más comunes para la preparación de nanopartículas de lantánidos.... 27

Tabla 3. Requerimientos de Buenas Prácticas de Fabricación de Radiofármacos. 35

Tabla 4. Reactivos para la preparación de ²²⁵Ac-rHDL y nanopartículas de [¹⁷⁷Lu] Lu-iFAP/iPSMA. 42

Tabla 5. Materiales para la preparación de ²²⁵Ac-rHDL y nanopartículas de [¹⁷⁷Lu] Lu-iFAP/iPSMA. 43

Tabla 6. Materiales para la preparación de ²²⁵Ac-rHDL y nanopartículas de [¹⁷⁷Lu] Lu-iFAP/iPSMA. 44

Tabla 7 .Diseño de experimentos para la obtención de micelas lipídicas poel método de microfluidos..... 45

Tabla 8. Preparación de estándar BSA para la cuantificación de proteínas en las rHDL obtenidas. .. 47

Tabla 9. Datos obtenidos del ajuste del FRR y TFR para obtener el tamaño óptimo de las micelas lipídicas..... 63

Tabla 10. Características físicas de las micelas y las rHDL ensambladas..... 67

Tabla 11. Resumen de las bandas principales de las rHDL..... 69

Tabla 12. Dosis media de radiación absorbida (Gy) desde el citoplasma al núcleo celular (n), considerando la actividad internalizada (Bq/Célula) respecto a la actividad total inicial administrada como tratamiento de ²²⁵Ac-rHDL..... 74

Tabla 13. Biodistribución del sistema ^{225}Ac -rHDL en ratones sanos (Balb-c) después de la administración intravenosa.	75
Tabla 14. Modelos biocinéticos y dosis absorbida en diferentes órganos de ratones después de la administración intratumoral con ^{225}Ac -rHDL (1MBq).....	77
Tabla 15. Resumen de las bandas principales observadas en los espectros FT-IR de Lu_2O_3 DOTA-iFAP, DOTA-iPSMA y Lu-iFAP/iPSMA	83
Tabla 16. Resultados analíticos de las pruebas de control de calidad de las nanopartículas del sistema [^{177}Lu] Lu_2O_3 iFAP/iPSMA producidas bajo buenas prácticas de fabricación (resultados de 3 lotes).	87

ABREVIATURAS

$^{99\text{m}}\text{Tc}$: Tecnecio-99 metaestable

^{177}Lu : Lutecio-177

^{225}Ac : Actinio-225

BFCA: Agente quelante Bifuncional

Bq: Bequerel

CaP: Cáncer de próstata

p-SCN-Bn-DOTA: Macrocielo S2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane acid, DOTA-benceno-p-SCN.

$T_{1/2}$: Tiempo de vida media

T_R : Tiempo de retención

HPLC: High performance liquid chromatography

CAF: Fibroblastos asociados a cáncer

EPR: Efecto de permeabilidad y retención mejorada

FAP: Proteína activadora de fibroblastos

iFAP: inhibidor de la proteína activadora de fibroblastos

BPF: Buenas Prácticas de manufactura

NP: Nanopartículas

HEP-G2: Línea celular de Hepatocarcinoma

PC-3: Línea celular de cáncer de próstata humano

SRBI: Receptor Scavenger clase II tipo I

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

rHDL: Lipoproteínas sintéticas de alta densidad

PET: Tomografía de emisión de positrones

PRRT: Terapia con radionúclidos para receptores de péptidos

SPECT: Tomografía de emisión de fotón único

XTT: (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-carboxanilide)

RESUMEN

El actinio-225 y otros radionúclidos emisores de partículas alfa han mostrado un gran potencial para el tratamiento del cáncer. Las lipoproteínas de alta densidad reconstituidas (rHDL) reconocen específicamente el receptor eliminador B tipo I (SR-BI) sobreexpresado en varios tipos de células cancerosas. Además, después del reconocimiento de rHDL-SR-BI, el contenido de rHDL se inyecta en el citoplasma celular. Esta investigación tuvo como objetivo preparar un nanosistema específico que suministre ^{225}Ac mediante la encapsulación del radionúclido en nanopartículas de rHDL. La síntesis de rHDL se realizó en dos pasos utilizando el método de síntesis por microfluidos para la posterior encapsulación de ^{225}Ac , previamente complejo a una molécula lipofílica (^{225}Ac -DOTA-benceno-*p*-SCN, CLog P = 3.42). El nanosistema (tamaño de partícula de 13 nm) mostró una pureza radioquímica superior al 99% y estabilidad en suero humano. Los estudios *in vitro* en células cancerosas HEP-G2 y PC-3 (SR-BI positivo) indicaron que el ^{225}Ac se internalizó con éxito en el citoplasma de las células, administrando altas dosis de radiación a los núcleos celulares (107 Gy a PC-3 y 161 Gy a HEP -G2 núcleos a las 24 h), dando como resultado una disminución significativa en la viabilidad celular hasta el 3.22 ± 0.72 % para PC-3 y hasta el 1.79 ± 0.23 % para HEP-G2 a las 192 h después del tratamiento con ^{225}Ac -rHDL. Tras la administración intratumoral de ^{225}Ac -rHDL en ratones portadores de tumores HEP-G2, el perfil biocinético mostró una retención significativa de radiactividad en las masas tumorales ($90.16 \pm 2.52\%$ de la actividad inyectada), lo que generó dosis de radiación ablativa (649 Gy/MBq). Los resultados demostraron propiedades adecuadas de rHDL como vehículo estable para la deposición selectiva de ^{225}Ac dentro de células cancerosas que sobreexpresan SR-BI. Los resultados obtenidos en esta investigación justifican más estudios preclínicos, diseñados para evaluar la eficacia terapéutica del sistema ^{225}Ac -rHDL para la terapia dirigida con partículas alfa de tumores que sobreexpresan el receptor SR-BI.

La proteína de activación de fibroblastos (FAP) se sobreexpresa en fibroblastos asociados con el microambiente tumoral, mientras que el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) se expresa en la neovasculatura de procesos angiogénicos malignos. Previamente, nuestro grupo de investigación reportó que las nanopartículas de sesquióxido de $[[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}$ ($[[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}$) inhiben la progresión tumoral

HCT116 en modelos murinos. Evaluar la toxicidad de ^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA en tejidos sanos, así como a nivel tisular y celular en entornos patológicos, es esencial para demostrar la seguridad del nanosistema en el tratamiento de pacientes. Es igualmente importante demostrar que ^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA se puede preparar bajo buenas prácticas de fabricación (BPF) con características de calidad de grado farmacéutico reproducibles. Esta investigación tuvo como objetivo preparar ^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA bajo procesos radiofarmacéuticos compatibles con las BPF, así como evaluar su toxicidad en cultivos celulares y sistemas biológicos murinos en entornos patológicos. Para ello, se formularon nanopartículas de ^{177}Lu]Lu₂O₃ como soluciones radiocoloidales con ligandos inhibidores de FAP y PSMA (iFAP e iPSMA), citrato de sodio y gelatina, seguidas de calentamiento a 121°C (presión de 103 kPa) durante 15 min. Se fabricaron tres lotes consecutivos. El producto final se analizó según métodos farmacopeicos convencionales. El contenido de Lu en las formulaciones se determinó mediante fluorescencia de rayos X. La captación del ^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA en células cancerosas se evaluó *in vitro* mediante inmunofluorescencia. La toxicidad histopatológica en tejidos sanos y tumorales se evaluó en ratones portadores de tumores HCT116. Se realizaron ensayos inmunohistoquímicos para corroborar la expresión tumoral de FAP y PSMA. La genotoxicidad aguda se evaluó mediante el ensayo de micronúcleos. Los resultados mostraron que los lotes fabricados bajo condiciones BPF son reproducibles. Las soluciones radiocoloidales fueron estériles y libres de endotoxinas bacterianas, con una pureza radionuclídica y radioquímica superior al 99%. El contenido de lutecio fue de 0.10±0.02 mg/mL (0.9 GBq/mg). Se observó una inhibición significativa de la proliferación celular *in vitro* y en tumores debido a la acumulación de nanopartículas en los fibroblastos (FAP+) y en la neovasculatura (PSMA+) del microambiente tumoral. No se detectó daño histopatológico en tejidos sanos. Los datos obtenidos en esta investigación proporcionan nueva evidencia sobre la toxicidad selectiva para tumores malignos y la ausencia de cambios histológicos en tejidos sanos después de la inyección intravenosa de ^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA en mamíferos. La fácil preparación en condiciones BPF y las características de toxicidad obtenidas, proporcionan el valor añadido necesario para la traslación clínica del nanosistema ^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA.

ABSTRACT

Actinium-225 and other alpha-particle-emitting radionuclides have shown high potential for cancer treatment. Reconstituted high-density lipoproteins (rHDL) specifically recognize the scavenger receptor B type I (SR-BI) overexpressed in several types of cancer cells. Furthermore, after rHDL-SR-BI recognition, the rHDL content is injected into the cell cytoplasm. This research aimed to prepare a targeted ^{225}Ac -delivering nanosystem by encapsulating the radionuclide into rHDL nanoparticles. The synthesis of rHDL was performed in two steps using the microfluidic synthesis method for the subsequent encapsulation of ^{225}Ac , previously complexed to a lipophilic molecule (^{225}Ac -DOTA-benzene-p-SCN, CLog P = 3.42). The nanosystem (13 nm particle size) showed a radiochemical purity higher than 99% and stability in human serum. *In vitro* studies in HEP-G2 and PC-3 cancer cells (SR-BI positive) demonstrated that ^{225}Ac was successfully internalized into the cytoplasm of cells, delivering high radiation doses to cell nuclei (107 Gy to PC-3 and 161 Gy to HEP-G2 nuclei at 24 h), resulting in a significant decrease in cell viability down to $3.22 \pm 0.72\%$ for the PC-3 and to $1.79 \pm 0.23\%$ for HEP-G2 at 192 h after ^{225}Ac -rHDL treatment. After intratumoral ^{225}Ac -rHDL administration in mice bearing HEP-G2 tumors, the biokinetic profile showed significant retention of radioactivity in the tumor masses ($90.16 \pm 2.52\%$ of the injected activity), which generated ablative radiation doses (649 Gy/MBq). The results demonstrated adequate properties of rHDL as a stable carrier for selective deposition of ^{225}Ac within cancer cells overexpressing SR-BI. The results obtained in this research justify further preclinical studies, designed to evaluate the therapeutic efficacy of the ^{225}Ac -rHDL system for targeted alpha-particle therapy of tumors that overexpress the SR-BI receptor.

The fibroblast activation protein (FAP) is heavily expressed in fibroblasts associated with the tumor microenvironment, while the prostate-specific membrane antigen (PSMA) is expressed in the neovasculature of malignant angiogenic processes. Previously, we reported that [^{177}Lu]lutetium sesquioxide-iFAP/iPSMA nanoparticles ([^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA) inhibit HCT116 tumor progression in mice. Understanding the toxicity of [^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA in healthy tissues, as well as at the tissue and cellular level in pathological settings, is essential to demonstrate the nanosystem safety for treating patients. It is equally important to demonstrate that [^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA can be prepared under good manufacturing practices (GMP) with reproducible pharmaceutical-grade quality characteristics. This research aimed to prepare [^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA under GMP-compliant pharmaceutical processes and evaluate its toxicity in cell cultures and murine biological systems under pathological environments. [^{177}Lu]Lu₂O₃ nanoparticles were formulated as radiocolloidal solutions with FAP and PSMA inhibitor ligands

(iFAP and iPSMA), sodium citrate, and gelatin, followed by heating at 121°C (103-kPa pressure) for 15 min. Three consecutive batches were manufactured. The final product was analyzed according to conventional pharmacopeial methods. The Lu content in the formulations was determined by X-ray fluorescence. [^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA performance in cancer cells was evaluated *in vitro* by immunofluorescence. Histopathological toxicity in healthy and tumor tissues was assessed in HCT116 tumor-bearing mice. Immunohistochemical assays were performed to corroborate FAP and PSMA tumor expression. Acute genotoxicity was evaluated using the micronuclei assay. The results showed that the batches manufactured under GMP conditions were reproducible. Radiocolloidal solutions were sterile and free of bacterial endotoxins, with radio-nuclidic and radiochemical purity greater than 99%. The lutetium content was 0.10±0.02 mg/mL (0.9 GBq/mg). Significant inhibition of cell proliferation *in vitro* and in tumors was observed due to the accumulation of nanoparticles in the fibroblasts (FAP+) and neovasculature (PSMA+) of the tumor microenvironment. No histopathological damage was detected in healthy tissues. The data obtained in this research provides new evidence on the selective toxicity to malignant tumors and the absence of histological changes in healthy tissues after intravenous injection of [^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA in mammalian hosts. The easy preparation under GMP conditions and the toxicity features provide the added value needed for [^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA clinical translation.

1. ANTECEDENTES

1.1 Introducción

Las terapias dirigidas contra el cáncer utilizan sustancias que bloquean el crecimiento y la propagación del cáncer al interferir con los blancos moleculares que están involucrados en el crecimiento, progresión y la propagación del cáncer [1]. Actualmente, se han estudiado diferentes tipos de terapias dirigidas para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, incluyendo agentes hormonales, inhibidores de la transducción de señales, nanopartículas, y vehículos nanoacarreadores de fármacos que son dirigidos al blanco molecular específico. Las lipoproteínas de alta densidad (HDL), son micelas lipídicas hidrófobas que debido a sus propiedades generales y al direccionamiento intrínseco que presentan por medio de la interacción con receptores (ABCA1, ABCG1 y SR-BI), han sido utilizadas como transportadores de fármacos hidrofóbicos, promoviendo la investigación de nanopartículas HDL reconstituidas (rHDL) como vehículos de administración de agentes quimioterapéuticos [2,3]. El receptor eliminador de Clase B Tipo I (SR-BI) se encuentra sobreexpresado por la mayoría de las células tumorales y es un receptor selectivo y específico de HDL ya que funciona como blanco para la administración de agentes terapéuticos [3,4]. Por otra parte, la proteína de activación de fibroblastos (FAP) es una serina proteasa de tipo II que escinde los péptidos después de los residuos de prolina con actividades de endopeptidasa y dipeptidil-peptidasa. La FAP se expresa principalmente en el fibroblasto del estroma activado presente en la mayoría de los tumores epiteliales humanos. Los fibroblastos asociados al cáncer contribuyen hasta un 90 % a la masa tumoral bruta, por lo cual los inhibidores de FAP específicos se desarrollaron inicialmente como posibles fármacos contra el cáncer [5,6].

La radioterapia de blancos moleculares es utilizada en la medicina nuclear como una alternativa óptima para la terapia contra el cáncer, ya que utiliza portadores moleculares de radionúclidos con alta afinidad a receptores superficiales de células tumorales, donde los emisores α , como Actinio-225 (^{225}Ac) o emisores β como lutecio-177 (^{177}Lu), exhiben la mayor eficacia terapéutica con dosis ablativas de radiación. Los emisores α tienen un gran potencial para aplicaciones terapéuticas, sin embargo, es necesario llevar a cabo su encapsulación en un nanotransportador (liposoma, nanopartícula, etc.), a fin de mantener confinado al radionúclido y mejorar el perfil de liberación de la dosis de radiación impartida a las células de cáncer [7,8]. El objetivo de este proyecto de investigación es preparar y caracterizar nanocápsulas de rHDL marcadas con $^{225}\text{AcCl}_3$ y comparar su potencial terapéutico con nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ como sistemas de radioterapia dirigida en células de cáncer de próstata y hepatocarcinomas.

1.2 Microambiente tumoral

Los tumores son tejidos muy complejos compuestos por células neoplásicas y, en el caso de los carcinomas, compartimentos de células estromales que contienen una variedad de células mesenquimales, en particular fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, pericitos y una variedad de células inflamatorias asociadas con el sistema inmunitario [9-11]. Por otra parte, el estroma tumoral (TME) comprende múltiples tipos de células, incluidos fibroblastos, células inmunitarias, células endoteliales, adipocitos, así como proteínas de la matriz extracelular y factores tumorales (por ejemplo, citoquinas, factores de crecimiento, etc.). En los últimos años, el microambiente tumoral ha ganado interés como diana terapéutica en el tratamiento del cáncer ya que forma hasta el 80% de la masa tumoral. Al comienzo del crecimiento tumoral, se desarrolla una relación dinámica y recíproca entre las células cáncerosas y los componentes del microambiente tumoral que respalda la supervivencia de las células cáncerosas, la invasión local y la diseminación metastásica. [9, 10]

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) son una población crítica de células que afectan la homeostasis del TME. Por definición, los CAF comprenden todos los fibroblastos dentro de una masa tumoral, que interactúan estrechamente con las células cáncerosas. Aunque los CAF pueden tener múltiples células de origen, los fibroblastos residentes se consideran la fuente más importante de CAF. [9,12]. Vale la pena señalar que la activación de los fibroblastos residentes no es un evento específico del cáncer, sino que también ocurre en condiciones fisiológicas (p. ej., cicatrización de heridas, reparación aguda de órganos, etc.) y no malignas (p. ej., infección crónica, fibrosis de órganos y enfermedad autoinmune).

Una de las funciones más importantes de los CAF en el metabolismo tumoral ha llevado a la propuesta de un nuevo modelo de Pavlides et al. denominado "El Efecto Warburg Inverso" el cual representa una simbiosis metabólica de células tumorales y CAF. Al iniciar este proceso de dos compartimentos, las células tumorales secretan peróxido de hidrógeno (H_2O_2), induciendo oxidación. Posteriormente los CAF comienzan el proceso de "glucólisis aeróbica": glucólisis y fermentación en presencia de cantidades adecuadas de oxígeno, lo que resulta en una mayor producción de combustible metabólico rico en energía (piruvato, lactato, cuerpos cetónicos y ácidos grasos). Las mitocondrias de las células tumorales pueden utilizar estos sustratos para la producción eficiente de ATP a través de la fosforilación oxidativa, lo cual representa una fuente de energía crítica para las células tumorales. [10-11]

La proteína activadora de fibroblastos FAP, se sobreexpresa en los fibroblastos asociados al cáncer (CAF), en más del 90 % de los tumores epiteliales, como los adenocarcinomas de mama, colorrectales, de pulmón, de ovario y de páncreas, pero no en los fibroblastos normales. La FAP es

una serina proteinasa de tipo II que escinde péptidos después de los residuos de prolina con actividades de endopeptidasa y dipeptidilpeptidasa, por lo cual se ha identificado como un posible blanco para el tratamiento potencial del cáncer (13).

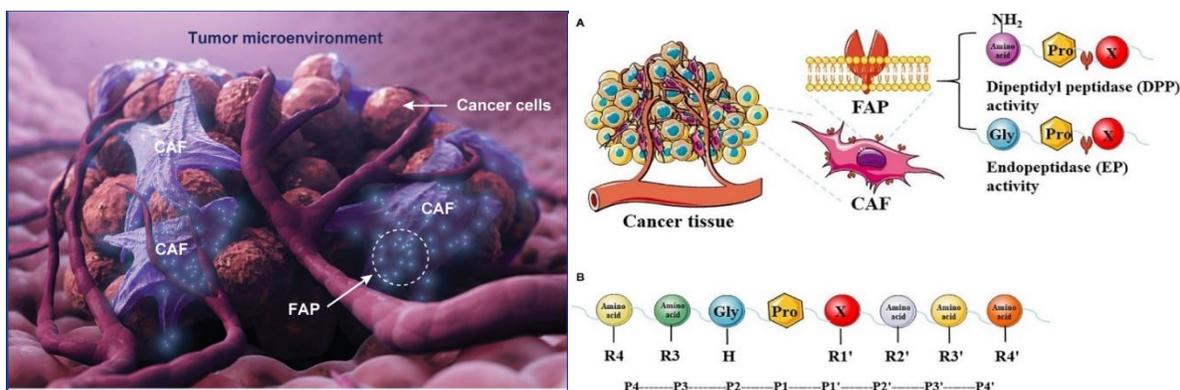


Figura 1. Proteína FAP sobreexpresada en los fibroblastos asociados al cáncer en el microambiente tumoral.

El primer enfoque hacia el uso de FAP como diana en el tratamiento del cáncer utilizó el anticuerpo monoclonal sibrotuzumab no conjugado y conjugado con ^{131}I para el cáncer colorrectal (13,14). Actualmente se están buscando otros enfoques dirigidos a la FAP, incluidos los anticuerpos biespecíficos o de fragmentos de anticuerpos, células T receptoras de antígenos quimérico, conjugados de anticuerpos y fármacos, la mayoría de los cuales se encuentran en desarrollo preclínico o ensayos clínicos de fase 1 (13,15). Los inhibidores específicos de FAP de molécula pequeña (FAPi) también han sido estudiados (16), sin embargo, se han conjugado con radionúclidos para producir excelentes agentes de formación de imágenes adecuados para una variedad de tipos de cáncer (17-19). Los más relevantes son dos grupos de compuestos altamente selectivos, uno basado en una estructura de quino-lina-cianopirrolidina y otro basado en pirrolidina-ácido borónico o también conocido como prolina-ácido borónico (boroPro). En cuanto al primer grupo, Jansen et al. informó la síntesis de 39 nuevos inhibidores de FAP para estudiar la relación estructura-actividad de la estructura 4-quinolinoil-Gly-cianopirrolidina [13]. Los autores informaron que FAP forma enlaces covalentes con el grupo nitrilo presente en estas moléculas [14]. También informaron que los derivados que contienen N-piridinas dan lugar a inhibidores de FAP con alta selectividad hacia otras enzimas de escisión posterior a la prolina, como la prolil-oligopeptidasa (PREP) y las dipeptidil-peptidasas (DPP); mientras que las moléculas que contienen el fragmento de quinolinoilo muestran una mayor afinidad por FAP. Los autores identificaron el andamio N-(4-quinolinoil)-glicil-(2-cianopirrolidina) como el mejor inhibidor de FAP. Los estudios farmacocinéticos en ratones del inhibidor de FAP seleccionado mostraron una alta

biodisponibilidad después de la administración oral, con una vida media plasmática corta y una inhibición de FAP *in vivo*.

Al mismo tiempo, Poplawsky et al. diseñó y caracterizó más de 20 inhibidores de boroPro para FAP y PREP [14]. Los autores informaron que la afinidad por FAP podría incrementarse usando un átomo de nitrógeno de piridina protonado, porque forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno carbonílico del ácido glutámico (Glu-204) presente en FAP, pero ausente en PREP, por lo cual, Poplawski et al. establecieron que N-(piridin-4-carbonil)-D-Ala-boroPro era el mejor inhibidor de la proteína de activación de fibroblastos encontrado.

En 2018, Lindner y Loktev informaron de la conjugación del ácido 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) al 4-quinolinoil-Gly-cianopirrolidina, con el objetivo de marcarlo con radionúclidos adecuados para diagnóstico por imagen o con fines terapéuticos [15,16]. Los autores desarrollaron quince derivados inhibidores de FAP (FAPI). Las diferentes moléculas de FAPI fueron radiomarcadas con ^{177}Lu , ^{90}Y o ^{68}Ga . ^{68}Ga -FAPI-02 y ^{68}Ga -FAPI-04 demostraron ser los agentes más adecuados para aplicaciones de diagnóstico. Los primeros inhibidores de FAP que se usaron en humanos para exploraciones PET fueron ^{68}Ga -FAPI-02 y ^{68}Ga -FAPI-04 [17-19].

Los radiofármacos de diagnóstico que inhiben la FAP hasta ahora desarrollados y aplicados en estudios clínicos utilizan ^{68}Ga y ^{18}F unidos a derivados de 4-quinolinoil-Gly-cianopirrolidina, que son radiofármacos para PET, y solo un estudio ha utilizado un derivado de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, también unido a quinolina-cianopirrolidina. Sin embargo, los estudios de tomografía por emisión de fotón único (SPECT) siguen representando más del 70% del total en medicina nuclear debido a su menor coste y mayor disponibilidad de equipos. Para las imágenes SPECT, el radionúclido más utilizado es el $^{99\text{m}}\text{Tc}$, para lo cual recientemente en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, se ha diseñado, sintetizado y evaluado preclínicamente un nuevo radiofármaco inhibidor de FAP basado en el ácido borónico $^{99\text{m}}\text{Tc}-((\text{R})-1-((6\text{-hidrazinilnicotinoil})\text{-D-alanil})\text{ pirrolidin-2-il})$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -iFAP) para imágenes SPECT. Sin embargo hasta el momento no se ha reportado el empleo de nanopartículas radiomarcadas y funcionalizadas para el tratamiento de cáncer con éste inhibidor de FAP que ha mostrado un alto reconocimiento específico de FAP, alta captación tumoral y eliminación renal rápida.

Por otra parte, la enzima glutamato carboxipeptidasa II, también conocida como antígeno prostático específico de membrana (PSMA), está expresada en las células epiteliales de la próstata y altamente sobre-expresada en el 95 % de los cánceres de próstata. La glucoproteína transmembranal II es altamente expresada en células de cáncer de próstata y en neovasculatura de tumor sólido no prostático [28] y se expresa en niveles más bajos en otros tejidos [28,29], incluyendo próstata,

riñón, hígado, intestino delgado y cerebro, por lo cual el PSMA es un blanco molecular prometedor asociado con la agresividad tumoral en el CaP.

La glutamato carboxipeptidasa II unida a membrana (GCP II) es una metaloenzima de zinc que cataliza la hidrólisis del neurotransmisor N-acetil-L-aspartil-L-glutamato (NAAG) a N-acetil-L-aspartato y L-glutamato (que es en sí mismo) un neurotransmisor). Recientemente la enzima PSMA, se ha descrito como un blanco molecular para una variedad de inhibidores de moléculas pequeñas y anticuerpos. Para mejorar esta interacción de los inhibidores con la enzima PSMA, se describió un fragmento de unión lipofílico a una distancia del centro activo de la enzima, lo cual induce un incremento de hasta 60 veces la afinidad por los inhibidores de PSMA.

Los inhibidores forman un grupo dinitrofenilo para unirse a este fragmento lipofílico, por ejemplo, el inhibidor de la PSMA ^{68}Ga -HBED-CC-Ahx-KuE (PSMA-11) demostró con éxito el potencial de diagnóstico de imágenes moleculares específicas de PSMA con PET. El cáncer de próstata y sus metástasis también se han tratado con ^{68}Ga -PSMA I&T PET y ^{177}Lu -PSMA I&T como radioligando para terapia, respectivamente. El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-iPSMA ha demostrado una alta afinidad y captación en tumores de cáncer de próstata y sus metástasis en pacientes, posibilitando la obtención de imágenes diagnósticas moleculares con alta resolución y sensibilidad. Recientemente, el ININ desarrolló un radiofármaco para imagen del inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (iPSMA) que contiene hidrazinonicotinamida (HYNIC) como un grupo químico crítico en el incremento de la lipofilia de la molécula para el acoplamiento a los sitios hidrófobos del PSMA, aunado al uso convencional del HYNIC como un agente quelante para el radiometal $^{99\text{m}}\text{Tc}$, donde el ácido etilendiaminodiacético (EDDA) es usado para completar la esfera de coordinación del radiometal ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-Lys(Nal)-Urea-Glu = $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-iPSMA). El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-iPSMA ha demostrado una alta afinidad y captación en tumores de cáncer de próstata y sus metástasis en pacientes, posibilitando la obtención de imágenes diagnósticas moleculares con alta resolución y sensibilidad.

Teniendo en cuenta que la teranóstica combina el potencial de los radionúclidos terapéuticos y diagnóstico en el mismo ligando o sensor molecular, se ha desarrollado el radiofármaco ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-Lys(Nal)-Urea-Glu, donde el DOTA como un agente quelante para el ^{177}Lu a la fracción HYNIC-Lys(Nal)-Urea-Glu, actuando como par teranóstico del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDDA/HYNIC-Lys(Nal)-Urea-Glu al conservar las mismas propiedades de afinidad y reconocimiento biológico por la enzima PSMA sobre-expresada en células de cáncer de próstata y sus metástasis.

1.3 Hepatocarcinomas

El carcinoma hepatocelular (CHC) que se origina en el hígado representa alrededor del 80% al 90% de todos los cánceres hepáticos primarios [21]. Las tasas de incidencia y mortalidad de CHC han ido en aumento durante décadas, con casi 800 000 nuevos casos cada año.

El CHC generalmente se diagnostica en una etapa avanzada, cuando se emplean terapias paliativas con una mediana de supervivencia de 6 a 12 meses después del diagnóstico [21,22]. Las opciones de tratamiento curativo para el CHC en etapa temprana incluyen: resección quirúrgica, ablación por radiofrecuencia/microondas, quimioembolización transarterial, trasplante de hígado y, en raras ocasiones, quimioterapia sistémica. No obstante, los principales inconvenientes del tratamiento curativo son la recurrencia del CHC, que conduce a una incidencia de más del 70 % a los cinco años, y la falta de disponibilidad de donantes compatibles para el trasplante de hígado [23].

Por lo tanto, existe una mayor necesidad de estrategias de tratamiento alternativas efectivas en pacientes con CHC avanzado o metastásico. La terapia molecular dirigida basada en las vías moleculares que conducen a los mecanismos carcinogénicos del CHC es un enfoque de tratamiento novedoso y prometedor. Una comprensión adecuada de los mecanismos moleculares de la hepatocarcinogénesis y la identificación de las moléculas diana apropiadas y las vías de señalización responsables del fenotipo tumoral es crucial para desarrollar tratamientos dirigidos efectivos.

1.4 Epidemiología de hepatocarcinomas

El cáncer primario de hígado es el sexto cáncer más comúnmente diagnosticado y la tercera causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo en 2020, con aproximadamente 906 000 casos nuevos y 830 000 muertes. Las tasas de incidencia y mortalidad son de 2 a 3 veces más altas entre los hombres que entre las mujeres en la mayoría de las regiones, y el cáncer de hígado ocupa el quinto lugar en términos de incidencia global y el segundo en términos de mortalidad para los hombres. El cáncer de hígado primario incluye el carcinoma hepatocelular (HCC) (comprende el 75%-85% de los casos) y colangiocarcinoma intrahepático (10%-15%), así como otros tipos raros.

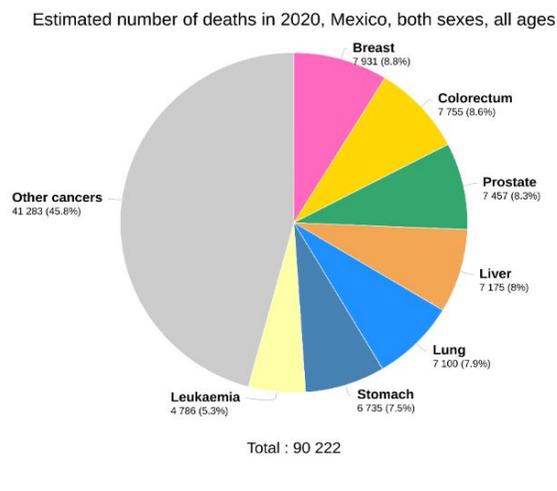


Figura 2. Incidencia de mortalidad de cáncer en México en ambos sexos en 2020, de acuerdo con Globocan 2021.

En la mayoría de los casos, la cirrosis hepática precede al desarrollo de CHC [24]. Se han asociado varios factores de riesgo (tanto ambientales como genéticos) con el CHC, incluida la infección crónica por los virus de la hepatitis B (VHB) y la hepatitis C (VHC), exceso de ingesta de alcohol, consumo de alimentos infectados con toxina fúngica-aflatoxina B1 (AFB1), enfermedad del hígado graso no alcohólico, diabetes, obesidad, tabaquismo y hemocromatosis hereditaria [23,24]. La enfermedad metastásica al hígado es la forma más común de malignidad hepática. Los tumores comunes que metastatizan al hígado incluyen el carcinoma colorrectal, el carcinoma de mama y los tumores neuroendocrinos. Las intervenciones quirúrgicas (resección/trasplante hepático) brindan opciones curativas para pacientes seleccionados, pero muchos pacientes no pueden recibir este tratamiento

1.5 Terapia para HCC

El avance en la biología celular molecular ha permitido el desarrollo de nuevos agentes dirigidos a moléculas, que restringen las anomalías moleculares, como intervenciones terapéuticas prometedoras para el cáncer [25,26]. En la actualidad, se realizan ensayos clínicos para encontrar agentes que actúen sobre los receptores del factor de crecimiento y las vías de señalización intracelular.

La angiogénesis juega un papel central en cada paso de la hepatocarcinogénesis, y esta es la razón por la cual una estrategia terapéutica actual dirigida a moléculas para el CHC se dirige principalmente al Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), entre otras vías angiogénicas, para desarrollar potentes agentes antiangiogénicos. Algunos de los agentes antiangiogénicos aprobados que han sido utilizados como agentes de terapia sistémica son Sorafenib que funciona

como inhibidor multitirosina quinasa de los factores de crecimiento VEGF, PDGF, y c-Kit, Levantinib: inhibidor multicinasa de los receptores 1-3 VEGF, PDGF, RET y KIT mostrando actividad clínica y perfil de seguridad satisfactorio en CHC.

Sin embargo, en la actualidad se han investigado nuevas terapias locorreregionales dirigidas al hígado para el tratamiento de cánceres hepáticos primarios y metastásicos. Entre estos se encuentran las terapias endovasculares guiadas por imágenes, incluidas la quimioembolización y la radioembolización. La radioembolización se define como la inyección de partículas embólicas del tamaño de una micra cargadas con un radioisótopo mediante el uso de técnicas transarteriales percutáneas para administrar altas dosis focales de radiación a los cánceres. En el CHC, la quimioembolización y la radioembolización se pueden usar para retrasar la progresión de la enfermedad, reducir el estadio o salvar el CHC para permitir el trasplante de hígado o como terapias paliativas [25].

El procedimiento para la radioembolización consiste en colocar dentro de los vasos sanguíneos que alimentan el tumor, ^{131}I -Lipiodol (aceite natural rico en moléculas de yodo) o microesferas de vidrio/resina (30 μm) marcadas con ^{90}Y infundidas en el hígado mediante un catéter colocado en la arteria hepática, sin embargo, cabe destacar que el ^{131}I -Lipiodol es un emisor de radiación gamma (364 keV, 81%) y la actividad a administrar debe ser muy limitada ya que produce toxicidad hematopoyética así como altas cantidades de ^{131}I libre, por efecto de la radiólisis *in vivo* de la molécula marcada. El ^{90}Y es un radionúclido emisor beta de alto costo y baja disponibilidad [25,26]. Una alternativa para llevar a cabo la radioembolización son las nanopartículas inorgánicas (NP) que son vehículos particularmente atractivos para la radioterapia dirigida ya que pueden empaquetar varios átomos radiactivos en un solo portador. A pesar del corto alcance en tejido de las partículas β - del ^{177}Lu (1.5 mm), es posible lograr que éste penetre de manera homogénea a la neovascularización tumoral por reconocimiento molecular específico, preparado en forma de nanopartículas de Lu_2O_3 de 10 a 100 nm funcionalizadas en su superficie con biomoléculas afines a proteínas sobre-expresadas en los vasos sanguíneos y en las células de las lesiones tumorales.

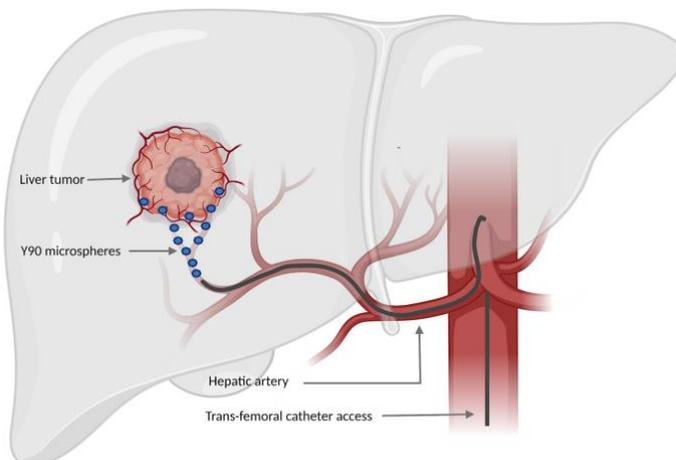


Figura 3. Proceso de radioembolización transarterial con Ytrio-90 en pacientes con enfermedades gastrointestinales.

1.6 Agentes de terapia molecular específica

Nanopartículas de rHDL como nanoacarreadores

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son nanopartículas endógenas involucradas en el transporte y el metabolismo del colesterol, fosfolípidos y triglicéridos [2]. Las HDL presentan propiedades como tamaño, forma y composición química de la superficie que juegan un papel clave en sus múltiples funciones biológicas. En comparación con otras lipoproteínas, tienen una mayor densidad y un tamaño más pequeño que oscila entre 8 y 12 nm de diámetro. El principal constituyente proteico de las HDL es la apolipoproteína A-I (Apo AI) que comprende casi el 70 % de la masa proteica de las HDL y es la principal proteína estructural constituyendo el soporte de fosfolípidos y colesterol que otorgan rigidez a la lipoproteína, además la interacción entre la apoA-I y los lípidos determina la forma y el tamaño final de las HDL con la cara hidrofóbica de la apoA-I mediando las interacciones de los lípidos y la cara polar interactuando con el agua. Apo A-I es una proteína de 28 kDa, contiene ocho dominios helicoidales α anfipáticos de 22 aminoácidos cada uno, siendo un polipéptido monocatenario de 243 residuos de aminoácidos reptidos en tándem que son responsables del andamiaje del tamaño y la forma de las HDL naturales. Las principales funciones que presentan las HDL naturales, son eliminar el colesterol de tejidos periféricos y transportarlo al hígado para su catabolismo o excreción a través del transporte inverso de colesterol (RTC), además poseen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiapoptóticas y antiinfecciosas [4,27].

A diferencia de otros transportadores sintéticos, como liposomas, micelas, nanopartículas inorgánicas y poliméricas, las HDL tiene características únicas que le permiten entregar su contenido a sitios específicos de manera más eficiente, dichas características incluyen; el tamaño (8-

12 nm de diámetro), alta tolerabilidad en humanos (hasta 8 g de proteína por infusión), larga vida media circulante (12-24 horas) y propiedades de direccionamiento intrínseco a diferentes células receptoras [2,3]. Las HDL endógenas también transportan lípidos, péptidos / proteínas y ácidos nucleicos de las células donantes a las células receptoras a través de la interacción con receptores de HDL, incluyendo, ABCA1, ABCG1 y SR-BI [3], éste último, llamado receptor eliminador Clase B tipo I. El SR-BI es un receptor de lipoproteínas de alta densidad que facilita la captación de ésteres de colesterol de las lipoproteínas circulantes y desempeña un papel importante en el metabolismo del colesterol, la señalización, la motilidad y la proliferación de células cancerosas ya que se encuentra sobre-expresado en diversos tipos de cáncer, principalmente en el de ovario y próstata.

Recientemente, se ha explorado ampliamente el potencial del uso de partículas de HDL como vehículos de administración de fármacos. Algunas de las propiedades que presentan para ser utilizadas como nanoacarreadores, es que son partículas completamente biodegradables y tienen una excelente biocompatibilidad, y no desencadenan respuestas inmunológicas, ya que son partículas endógenas. Se sabe que las partículas de HDL que contienen apoA-I se unen a muchos receptores celulares, como el receptor de clase B tipo 1 (SR-B1). Se ha demostrado que los receptores SR-B1 y ABCG1 median la transferencia de colesterol a partículas HDL desde las células periféricas. Desde el punto de vista de la administración dirigida, el receptor SR-B1 abunda en las células hepáticas, los macrófagos y las células cancerosas y se cree que es un receptor crítico para administrar la carga de HDL a esas células. Se ha informado que las HDL endógenas pueden transportar lípidos, proteínas y microARN de las células donantes a las células receptoras, lo que sugiere que la capacidad de orientación intrínseca y funcional de las HDL las convierte en un candidato ideal para la administración de fármacos [27-29].

Actualmente se han realizado estudios para el desarrollo de partículas de rHDL que se sintetizan artificialmente con fosfolípidos y apolipoproteínas/péptidos miméticos de apolipoproteínas como terapias alternativas o plataformas de administración de fármacos. Como los componentes individuales de rHDL (tipo de lípido, elección de apolipoproteína y estequiometría de lípidos/proteínas) se pueden ajustar de manera flexible, las propiedades fisicoquímicas como el tamaño uniforme, el potencial zeta, la carga central y superficial de rHDL se pueden controlar. En términos de carga de fármacos, los fármacos hidrofóbicos se pueden incorporar en el núcleo de rHDL, los fármacos lipofílicos se pueden insertar en la membrana lipídica y las moléculas hidrofílicas se pueden transportar fusionadas con un grupo hidrofóbico para insertarlas en la superficie de rHDL o encapsuladas en el núcleo de rHDL con la ayuda de ciertos componentes hidrofóbicos (Fig. 4).

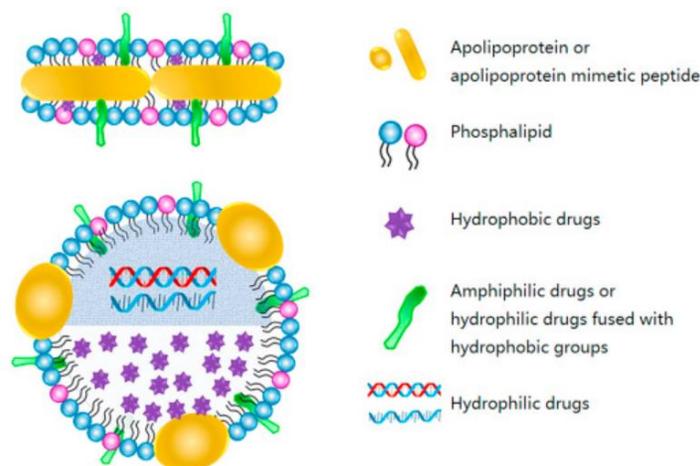


Figura 4. Composición de rHDL discoidal y esférica como sistemas de liberación de fármacos.

Deben tenerse en cuenta los siguientes requisitos para lograr una administración eficaz de fármacos dirigidos contra el tumor. Primero, el nanoportador deseable debe permanecer estable durante la circulación y acumularse de manera eficiente en el tumor. En segundo lugar, debe tener la capacidad de penetrar dentro de las regiones tumorales y ser captado de manera eficaz por las células tumorales. Además, debería liberar el fármaco una vez absorbido por las células tumorales [27].

Algunas de las propiedades de las rHDL como sistemas de liberación se mencionan en la siguiente tabla 1;

Tabla 1. Propiedades de las rHDL como sistemas de liberación.

Propiedad	Descripción
Largo tiempo en circulación y estabilidad relativa	Después de la inyección intravenosa o la absorción en la circulación, las nanopartículas rHDL cargadas con el fármaco se inicia el proceso de opsonización de las rHDL, lo cual implica la adsorción de proteínas plasmáticas, en la superficie de las rHDL circulantes. Tras la opsonización, las rHDL son reconocidas y capturadas por el MPS, lo que conduce a su acumulación en órganos como hígado y bazo con la consiguiente eliminación de la circulación. Por otra parte, Los componentes lipídicos representan aproximadamente la mitad de la masa de las HDL totales y entre el 40 % y el 60 % de los lípidos totales son fosfolípidos, por lo cual influyen en la densidad, el tamaño, la forma, la rigidez y la carga superficial de las partículas de HDL determinando sus propiedades biológicas. El tamaño y la geometría de las nanopartículas son importantes para su flujo, marginación y propiedades adhesivas en los vasos sanguíneos que también juegan un papel clave en la determinación de la estabilidad de rHDL en la circulación.
Blancos y receptores específicos para rHDL	Se sabe que las partículas de rHDL que contienen a la lipoproteína apoA-I se unen principalmente a SR-B1, una proteína de membrana integral que se expresa principalmente en el hígado y los tejidos esteroideogénicos. Como receptor endógeno de HDL, SR-B1 es más conocido por su función de facilitar la absorción de ésteres de colesterol de HDL al hígado y los tejidos esteroideogénicos. Además, el SR-B1 sobreexpresado es un marcador relativamente consistente en tejidos cancerosos. Mientras que SR-B1 normalmente media la transferencia de colesterol entre HDL y células sanas, también facilita la captación selectiva de colesterol en células malignas por lo cual se puede garantizar el depósito del contenido de las rHDL sintéticas directamente en el citoplasma de las células cancerosas de forma natural.

Internalización celular de rHDL mediada por receptor	SR-B1, el principal receptor de HDL, media el transporte de ésteres de colesterol selectivos de HDL al citosol. Las interacciones mediadas por SR-B1 entre rHDL y células diana se han investigado como una estrategia ideal para la administración de fármacos a través de la barrera de la membrana plasmática. Esta estrategia mejora la administración de fármacos a las células sin endocitosis ni degradación. Además de la administración intracelular de terapias moleculares pequeñas, SR-B1 también media la administración transmembrana eficiente de fármacos macromoleculares al citoplasma de las células cancerosas, como los realizados con SiRNA, PTX y DOX.
Internalización celular de rHDL mediada por péptidos de penetración celular.	Además de la internalización celular mediada por SR-B1, los péptidos de penetración celular (CPP) también se han utilizado como una estrategia eficaz para ayudar a las rHDL a superar la membrana plasmática celular, ya que poseen la capacidad de interactuar con varias moléculas de la superficie celular, incluidos los lípidos de membrana y los proteoglicanos. Al aprovechar el gradiente de pH entre el medio tumoral (pH 6,4) y el entorno fisiológico (pH 7,4), las CPP sensibles al pH pueden responder al microambiente ácido del tumor y, por lo tanto, han sido útiles para mediar en el suministro intracelular específico y eficiente a las células tumorales.
rHDL con capacidad de evitación endosomal/lisosomal	Es importante transportar moléculas terapéuticas a los compartimentos citosólicos porque los orgánulos citosólicos suelen ser los sitios de acción. Se ha desarrollado una estrategia de administración dirigida a nivel subcelular basada en el hecho de que los ésteres de colesterol se transportan desde HDL a las células en un proceso mediado por SR-B1 en el que se forma un canal hidrofóbico en la membrana celular. Este transportador se ha utilizado para administrar un fármaco lipofílico, el oleato de paclitaxel, para atenuar su toxicidad en células no diana. La evitación endosomal/lisosomal mediada por SR-B1 también se ha explotado para abordar los obstáculos intracelulares de la entrega de proteínas.

Basado en el diseño biomimético, rHDL mantiene las proporciones adecuadas de fosfolípidos y apolipoproteínas y aprovecha las ventajas de HDL para tener una alta biocompatibilidad y un tiempo de circulación relativamente largo. Dada la alta expresión de SR-B1 y LDLR en los tumores en comparación con los tejidos normales, las células tumorales pueden absorber eficientemente rHDL a través del mecanismo mediado por receptores y luego mediar en la liberación eficiente de la carga, lo que proporciona una excelente plataforma potencial para la terapia contra el cáncer [28]. De acuerdo con estudios recientes, se ha demostrado que las nanopartículas basadas en lípidos y proteínas ApoA1 pueden comportarse como si fueran nanopartículas de HDL e incluso estar dotadas de algunas propiedades nuevas para depositar su contenido en el sitio específico y puedan ser utilizadas en la terapia del cáncer mejorando la biodisponibilidad y reduciendo la toxicidad.

Nanopartículas de óxidos de lantánidos

Recientemente se han desarrollado nuevos materiales nanométricos con propiedades y funcionalidades personalizadas proporcionando importantes contribuciones a la nanomedicina al ofrecer nuevas posibilidades y perspectivas en imagenología, diagnóstico e incluso terapia[30].

Debido a que los tumores sólidos tienen brechas de células vasculares más anchas (200 nm-1,2 µm de tamaño) que los tejidos normales (<10 nm de tamaño), los fármacos que cargan las NP pueden cruzar fácilmente las paredes vasculares del tumor con fugas y luego acumularse en las áreas

tumorales como resultado del efecto de permeabilidad y retención mejoradas (EPR). Más importante aún, la modificación de la superficie de las NP mediante la introducción de moléculas dirigidas que se unen a los receptores o antígenos sobreexpresados en las células diana también favorece el aumento de la acumulación intratumoral de NP. Tanto el enfoque pasivo (el efecto EPR) como el activo (moléculas conjugadas dirigidas) pueden ayudar a disminuir la acumulación de medicamentos de quimioterapia disponibles en sitios no blanco, lo que reduce los efectos secundarios no deseados [31-33]. Por lo tanto, el uso de nanopartículas como vehículos de transporte brinda una vía potencial para eludir las limitaciones de las terapias convencionales contra el cáncer.

Entre los nanomateriales, los sesquióxidos raros, también llamados óxidos de lantánidos (RE_2O_3), son de interés debido a sus propiedades físicas y químicas, como una excelente estabilidad química, una adecuada conductividad térmica y una alta emisión de luz [33-35]. Uno de estos sesquióxidos es el lutecio que es el último miembro de la serie de los lantánidos, siendo un lantánido típico ya que su único estado de oxidación común es +3, de acuerdo con su configuración electrónica ($[\text{Xe}]4f^{14}5d^16s^2$). Debido a las propiedades fisicoquímicas del lutecio, como densidad, baja expansión térmica, punto de fusión, alta estabilidad de fase y amplia banda de separación, entre otras, se ha empleado para diseñar nanomateriales (dopados con Lu^{+3}); que han sido utilizadas en catálisis, codificación óptica, biodetección, bioimagen, aplicaciones energéticas y aplicaciones médicas. Hasta la fecha, muchos micro/nanomateriales luminiscentes de tierras raras se han preparado con éxito a través del método de precipitación, como La_2O_3 Y_2O_3 Gd_2O_3 LnOF ($\text{Ln} = \text{Y}, \text{La}, \text{Pr-Tm}$), NaLuF_4 [33,37].

El óxido de Lutecio (Lu_2O_3) presenta como características fisicoquímicas una alta densidad (9,4 g/cm^3), alto número atómico ($Z = 71$), alto punto de fusión, estabilidad de fase y baja expansión térmica, por lo cual sirve como un excelente candidato para la sustitución de iones lantánidos. Los recientes avances en medicina nuclear se centran en el diseño de radioterapias dirigidas, para las cuales se emplean diferentes biomoléculas radiomarcadas con emisores beta (^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu) en el tratamiento de enfermedades malignas [37]. El Lu-177 es un radioúclido con características adecuadas de desintegración nuclear: vida media de 6.71 días, emisión β max de 497.1 KeV (78%) con menos efectos secundarios en comparación con la radioterapia externa, y una radiación γ de 208 KeV (11%) que pueden utilizarse para gammagrafía y dosimetría. Por lo cual una vez obtenidas y caracterizadas las nanopartículas de lantánido, se puede llevar a cabo la activación neutrónica de nanopartículas de Lu_2O_3 para la obtención de NP de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ [37].

Actualmente, se han reportado diversos métodos para sintetizar NPs dopadas con Ln de manera eficiente y controlada, cada uno con sus ventajas y especificidades para el fin para el cual serán

utilizados. Entre los métodos de síntesis que se mencionan en la tabla 2, se puede decir que las técnicas de coprecipitación, descomposición térmica e hidro(solvo)termal constituyen las tres rutas representativas más actuales para la síntesis de Ln-NPs. En la tabla 2 resume estos métodos, así como algunas de sus principales características y peculiaridades en la síntesis de NPs Ln⁺³ [31].

Tabla 2. Métodos de síntesis más comunes para la preparación de nanopartículas de lantánidos.

Método	Descripción
Coprecipitación	En este tipo de síntesis, los materiales que contienen una proporción adecuada entre los iones dopantes y los componentes de la matriz se agregan al solvente (generalmente agua destilada) inicialmente calentado a temperaturas moderadas (generalmente 70° a 90° C) para inducir tanto la descomposición de los precursores y la formación de cristales (nucleación) de las nanopartículas. El crecimiento de cristales se puede controlar y estabilizar agregando ligandos protectores como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenimina (PEI) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en el solvente. Es necesario un control preciso tanto de la temperatura como del tiempo de reacción para conseguir tamaños y morfologías homogéneas.
Descomposición térmica	Los materiales precursores que contienen una proporción adecuada de los iones dopantes y los componentes de la matriz se mezclan en solventes de alto punto de ebullición (generalmente ácido oleico y octadeceno) y luego se calientan a temperaturas elevadas (generalmente por encima de 280 °C) que inducen la descomposición de los precursores y la formación de cristales (nucleación) de las nanopartículas. Es necesario un control preciso tanto de la temperatura como del tiempo de reacción para conseguir tamaños y morfologías homogéneas.
Hidro(solvo) térmica	Los materiales precursores se mezclan en un recipiente de reacción resistente a la presión (autoclave) en presencia de un solvente de bajo punto de ebullición que genera presión en el recipiente durante la síntesis a temperaturas superiores a su punto de ebullición, pero inferiores a las utilizadas en las descomposiciones térmicas. En el caso del H ₂ O, la reacción se denomina hidrotermal y, a menudo, permite la síntesis directa de NP dispersables en agua, aunque el control del tamaño y la morfología es más difícil de lograr.

En estas síntesis, el método de precipitación ha demostrado ser una técnica eficiente para la preparación de materiales luminiscentes de tierras raras con diversas morfologías y arquitecturas manteniendo un control sobre la nucleación y crecimiento para la formación de la molécula precursora con el posterior proceso de calcinación que considera una reacción de condensación y densificación del precursor cuando se convierte a óxido [31].

Recientemente en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares se ha desarrollado la síntesis de NPs $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA con la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas antes y después de la activación neutrónica evaluando su perfil de biodistribución y potencial *in vitro* para atacar células que sobreexpresan PSMA. El método utilizado en la síntesis de las nanopartículas fue el de

precipitación-calcinación ya que la síntesis puede realizarse en condiciones ambientales (presión, temperatura), con relativa facilidad y en poco tiempo. Además, evita la formación de subproductos no deseados, siendo las especies precipitantes los iones OH^- y el CO_3^{2-} , formando como intermediario de la reacción un doble carbonato previo a la etapa de calcinación. Como resultado, se obtuvieron nanopartículas en un polvo fino y esponjoso, que al ser evaluado por TEM se observaron nanopartículas con una estructura cercana a la forma esférica y distribución homogénea y uniforme con un tamaño de $26.75\text{nm} \pm 6.72\text{ nm}$ con distribución monomodal y monodispersa [37]. El método precipitación-calcinación permite la obtención de nanopartículas adecuadas para su uso potencial como agentes terapéuticos, por lo cual es importante realizar el escalamiento y la posible producción bajo BPF con la finalidad de garantizar su uso potencial como agentes radioterapéuticos una vez que sean activadas por activación neutrónica y funcionalizadas con la biomolécula correspondiente (iFAP) para ejercer su acción de manera pasiva (efecto EPR) y activa (funcionalización a un agente de direccionamiento específico) generando una mayor cantidad de dosis ablativas de radiación dentro de las células tumorales.

1.7 Terapia con radionúclidos receptores de péptidos (PRRT)

La terapia con radionúclidos para receptores de péptidos (PRRT, por sus siglas en inglés) es una estrategia terapéutica dirigida al sitio que utiliza específicamente péptidos radiomarcados como vectores de orientación biológica diseñados para administrar niveles citotóxicos de dosis de radiación a las células cáncerosas, que sobreexpresan receptores específicos. El interés en PRRT ha crecido constantemente debido a las ventajas de dirigirse a los receptores celulares *in vivo* con alta sensibilidad, así como especificidad y tratamiento a nivel molecular. Se han identificado varios péptidos que se dirigen a una variedad de receptores, lo que demuestra su potencial para catalizar avances en PRRT [38,39].

La terapia con radionúclidos es una modalidad de tratamiento que utiliza fuentes radiactivas en forma de un radionúclido terapéutico unido a un vector blanco para administrar dosis terapéuticas de radiación ionizante en sitios específicos de la enfermedad, ya sea con fines curativos o para el control y paliación de la enfermedad. El éxito de la terapia con radionúclidos depende de la especificidad del agente de direccionamiento terapéutico en virtud de su interacción con una especie molecular que está presente o ausente en un tejido enfermo para administrar la radiación y causar un daño a través de emisiones energéticas, como partículas α partículas β o electrones Auger y electrones de conversión [40-41].

La característica de orientación de la terapia con radionúclidos se logra principalmente mediante la conjugación del radionúclido con un vector o molécula portadora/dirigida específica mediante el uso de un quelante bifuncional (BFCA) y el tipo de radionúclido terapéutico.

La elección del tipo de emisión depende del tamaño del tumor a tratar, la distribución intratumoral (es decir, el grado de heterogeneidad del depósito de radionucleidos), la farmacocinética y otros factores. La vida media física del radionúclido debe coincidir bien con la farmacocinética *in vivo* del péptido radiomarcado. El radionúclido debe tener una química adecuada para su unión con un BFC, y la unión debe exhibir alta estabilidad *in vivo* cuando se une al péptido [42].

Emisores Beta y alfa

Los recientes estudios de terapias dirigidas como concepto de medicina personalizada han participado en la promoción de nuevos desarrollos para aplicación de emisores beta y alfa [43]. La radioterapia dirigida, con emisores alfa o beta, en comparación con la radioterapia de haz externo, ofrece la ventaja teórica de limitar la dosis administrada al tumor y su área circundante inmediata y tiene un sentido particular para la radioterapia de la enfermedad micrometastásica, enfermedad

residual mínima (MRD), o enfermedad de pequeño volumen, mientras que la radioterapia de haz externo se adapta a la terapia de tumores sólidos más grandes [43]. Las principales diferencias entre los emisores alfa y beta se originan no solo a partir de la energía de las partículas emitidas, sino también del rango de ambas partículas en el tejido biológico y a la transferencia lineal de energía. Estas características opuestas implican diferencias drásticas en la "calidad de la radiación" entre los emisores beta y alfa, los primeros poseen baja transferencia lineal de energía (LET) (0.1–1.0 keV/mm) mientras que estos últimos poseen alta LET (60–230 keV/mm), por lo que al ser internalizadas al citoplasma celular preservan el entorno de las células tumorales, donde se encuentran las células del sistema inmune, quienes son uno de los principales componentes de la potencial erradicación tumoral [43,44].

Emisores alfa

Los radionúclidos emisores de alfa son un tipo muy prometedor de agentes radioterapéuticos que muestran un gran potencial en el tratamiento de una amplia gama de tumores malignos [44]. Debido a la corta profundidad de penetración de partículas alfa, son capaces de destruir tumores mientras causan un daño muy limitado al tejido sano circundante. De hecho, una partícula alfa emitida no viajará mucho más allá de unos 6 diámetros de las células (es decir, 50–100 μm). Por otro lado, su alta transferencia de energía lineal (LET) les da una mayor eficacia biológica relativa (RBE) [44] en comparación con otras terapias con radionúclidos.

Solo unas pocas partículas alfa a través del núcleo de una célula son suficientes para destruir una célula, ya que la muerte celular debida a la radiación alfa es en gran medida independiente de la oxigenación o de la proliferación celular activa. Cuando los radionúclidos emisores de partículas alfa se dirigen a células tumorales específicas en el cuerpo, pueden ser muy eficaz en la destrucción de metástasis, que son difíciles de tratar con las técnicas actualmente empleadas.

El ^{225}Ac ofrece la perspectiva atractiva para ser utilizado como un generador *in vivo*. Sin embargo, si la transferencia lineal de energía (LET) muy alta de las partículas alfa es extremadamente efectiva para matar células tumorales, también puede provocar un daño dramático en tejidos sanos en casos de inestabilidad química del radiomarcaje. Por esa razón, es necesario mantener confinado el radionúclido dentro del microentorno del tumor a través de técnicas como encapsulamiento dentro de sistemas biológicos como liposomas nanopartículas, etc. Existe un futuro potencial para los radionúclidos con múltiples hijos emisores de alfa como ^{225}Ac ($t_{1/2} = 10,0$ días) o ^{223}Ra ($t_{1/2} = 11,4$ días) [45-47]. Sin embargo, la toxicidad claramente sigue siendo un problema debido a la energía de retroceso que experimentan las hijas tras la desintegración alfa. Esta energía es en la mayoría de los casos de al menos 100 keV, más de 1000 veces mayor que la energía de enlace de cualquier

compuesto químico. Esto simplemente significa que la ruptura del enlace siempre ocurrirá después de la descomposición alfa, lo que implica que las hijas liberadas, que a menudo son emisores alfa, podrían causar un daño considerable. Teniendo en cuenta la presencia de diferentes proteínas en la sangre y su alta capacidad de unión, la probabilidad de que el radionúclido se vuelva a asociar con su ligando original es bastante pequeña [44-45]. Por tanto, la encapsulación de ^{225}Ac en nanopartículas de rHDL (^{225}Ac -rHDL) evitaría la liberación del radionúclido hijo de la biomolécula transportadora por efecto de la energía de retroceso y, al mismo tiempo, el reconocimiento molecular específico de ^{225}Ac -rHDL por parte de las células cancerosas que sobreexpresan la proteína SR-BI permitiría la internalización citoplásmica de ^{225}Ac en células tumorales para producir dosis de radiación ablativas.

Emisores beta

Actualmente, más allá de estos radioisótopos históricos, la radioterapia beta dirigida se beneficia de la producción de radioisótopos con mejores características físicas o químicas para la radioterapia. Debido a sus características físicas, el Lutecio-177 (^{177}Lu) se ha convertido en el radioisótopo clave de la beta-radioterapia dirigida debido al efecto de fuego cruzado. Su emisión beta de baja energía es útil para atacar tumores pequeños y al mismo tiempo, preservar tejidos sanos, mientras que su vida media relativamente larga permite un alto rendimiento de dosis absorbida al tejido diana. El ^{177}Lu decae por emisión de partículas a ^{177}Hf estable con una energía máxima de 497 keV, que es adecuado para una gran cantidad de aplicaciones radioterapéuticas [48]. Este radioisótopo también emite varios fotones gamma acompañantes, y los fotones gamma de 208 keV (11 %) y 113 keV (6,4 %) se utilizan para la evaluación diagnóstica. Por lo tanto, un radiofármaco marcado con ^{177}Lu puede usarse para diagnóstico y dosimetría cuando se inyecta en niveles más bajos de trazador y también para terapia cuando se inyecta en dosis terapéuticas. Este radioisótopo ($T_{1/2} = 6,71$ d) presenta además la ventaja de que puede producir en altos niveles de actividad con una actividad específica suficientemente alta utilizando reactores de investigación de flujo de neutrones térmicos medios, debido a la alta sección transversal de captura de neutrones térmicos de ^{176}Lu . El ^{177}Lu puede producirse directamente por captura de neutrones desde ^{176}Lu o indirectamente, con actividad específica más alta, mediante la captura de neutrones [48-50].

Se pueden seguir las rutas de producción de reactores "directa" e "indirecta" para obtener ^{177}Lu para aplicaciones de medicina nuclear: La ruta de producción directa se basa en la irradiación de neutrones de blancos de ^{176}Lu mediante la reacción de $^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$. La ruta de producción indirecta de $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb} \rightarrow ^{177}\text{Lu}$ requiere una separación química de ^{177}Lu de los átomos blanco de ^{176}Yb , por lo cual la ruta de producción directa ofrece las siguientes ventajas [49]:

- El enfoque menos complejo para la irradiación blanco en un reactor y requiere cambios menores en el diseño de las instalaciones de procesamiento e irradiación del reactor.
- Ofrece la posibilidad de utilizar el blanco $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$, que se mantiene estable en condiciones de irradiación y es compatible con la irradiación del reactor y el procesamiento de objetivos irradiados es fácil, rápido y técnicamente menos exigente. La instalación requerida para el procesamiento de destino es fácil de instalar y mantener.
- Tiene la flexibilidad de escalar los niveles de aumento o disminución de producción en respuesta a los requisitos mediante el ajuste del tamaño del blanco.
- Este método de producción representa la opción más económica para obtener ^{177}Lu de la pureza requerida. A diferencia de otros radionúclidos médicamente útiles, la ruta de producción directa (n, γ) a menudo ofrece la posibilidad de producir ^{177}Lu ya que el ^{176}Lu tiene una sección transversal de captura de neutrones térmicos muy alta ($\sigma=2090$ b, $I_0=1087$ b) para la formación de ^{177}Lu .
- La sección transversal de captura de neutrones de ^{176}Lu no sigue la ley de $1/v$ y hay una fuerte resonancia muy cerca de la región térmica.

En todos los estudios que apuntan a utilizar el potencial del ^{177}Lu como isótopo teranóstico, la larga vida media del radionúclido, además de la presencia de fotones gamma que pueden generar imágenes, es una clara ventaja [48]. Esta propiedad nuclear ayuda al seguimiento clínico del radiofármaco *in vivo*, mucho tiempo después de su administración. A partir de esta observación, se pueden evaluar pistas sobre la localización *in vivo*, así como la estabilidad farmacocinética. Por lo tanto, el ^{177}Lu ofrece ventajas como radionúclido de elección para la teranóstica en la medicina nuclear. Sin embargo, mediante el uso de un blanco de $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$ en forma de nanopartículas, es posible obtener una mayor actividad específica e internalizar de manera más eficiente la actividad dentro de las células tumorales debido al efecto EPR como se mencionó anteriormente.

1.8 Radiofármacos

Radiofármaco es toda sustancia conteniendo un radionúclido dentro de su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación se administra en seres humanos con fines diagnósticos y terapéuticos [51].

En general, un radiofármaco está formado por una molécula soporte que actúa como vehículo o sitio de reconocimiento específico y un radionúclido que emite radiación permitiendo así la detección externa de energía en los sitios de diagnóstico o tratamiento, sin embargo, las moléculas utilizadas

en los radiofármacos normalmente no tienen ningún efecto farmacológico, es decir, no muestran relación dosis-respuesta [51].

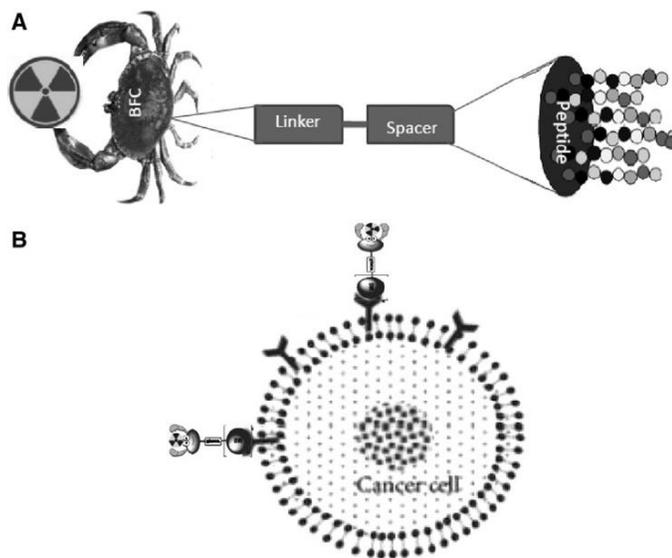


Figura 5. (A) Estructura de un radiofármaco. (B) Interacción del radiofármaco con un blanco específico.

Los radiofármacos diagnósticos de tercera generación se utilizan en medicina nuclear para obtener imágenes de blancos moleculares específicos, y son únicos en su capacidad para detectar en el tiempo y en el espacio procesos moleculares a nivel celular [52-53]. El BFC se encuentra ubicado entre el radionúclido y la molécula blanco, este coordina firmemente al ión metálico y está covalentemente enlazado con la molécula de reconocimiento específico por el receptor. El fragmento bioactivo sirve como un transportador que lleva al radionúclido al sitio receptor en las células o moléculas blanco [53,54], las cuales pueden ser fracciones de anticuerpos, péptidos, péptidomiméticos, análogos de ADN, oligonucleótidos antisentido y ligantes no peptídicos.

Los radiofármacos se clasifican de acuerdo con sus aplicaciones médicas en radiofármacos para uso diagnóstico y terapéutico [54].

Los radiofármacos para uso diagnóstico permiten realizar estudios funcionales, metabólicos y/o morfológicos del órgano. Son radiofármacos que tienen en su estructura un radioisótopo que puede ser emisor gamma o de positrones, por tanto, pueden ser detectados por medio de sistemas SPECT o equipos PET para la obtención de imágenes *in vivo* de procesos fisiológicos y metabólicos [52-54].

Con el uso de radiofármacos de diagnóstico, pueden obtenerse estudios "dinámicos", lo que no puede lograrse con el ultrasonido o la tomografía convencional. El radionúclido más comúnmente usado para la obtención de imágenes por SPECT es el $^{99\text{m}}\text{Tc}$, mientras que el más común para PET es el ^{18}F , con gran utilidad en el diagnóstico y seguimiento de tratamientos en oncología.

Los radiofármacos para uso terapéutico son la conjunción química entre una molécula acarreadora, altamente selectiva, y un radionúclido terapéutico diseñados en una forma farmacéutica con el empleo de radionúclidos emisores de partículas alfa y/o beta.

Muchos factores fisiológicos y bioquímicos influyen en la localización *in vivo* de ello dependerá la dosimetría de la radiación y la respuesta biológica de las células blanco respecto a los demás tejidos o sistemas corporales.

La terapia que emplea radiofármacos se conoce como radioterapia dirigida. Cuando en una radioterapia dirigida se utiliza como radiofármaco a una biomolécula radiomarcada selectiva para un receptor biológico específico, se llama entonces radioterapia de blancos moleculares. Entre los radionúclidos terapéuticos más utilizados se encuentran: yodo-131, samario-153, renio-186, renio-188, lutecio-177, holmio-166, disprosio-165, ytrio-90, estroncio- 89 y disprosio-166, entre otros. Las moléculas acarreadoras más utilizadas son los fosfonatos y diversas biomoléculas como péptidos y anticuerpos monoclonales [54].

Actualmente los radiofármacos se encuentran clasificados como dispositivos médicos, por lo cual la garantía de calidad es importante en la fabricación de radiofármacos debido a sus características particulares volúmenes bajos y, en algunas circunstancias, la necesidad de distribuir o administrar el producto antes de que se completen las pruebas de control de calidad para su liberación y uso [55].

1.9 Producción de Radiofármacos bajo BPF

La fabricación de productos radiofarmacéuticos se debe realizar de acuerdo con los principios básicos de las buenas prácticas de fabricación (BPF). Los puntos cubiertos por estos deben considerarse complementarias de los requisitos generales establecidos en "Buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos" [55, 56], que se relacionan específicamente con la producción y el control de productos radiofarmacéuticos.

La forma en que se producen, controlan y administran los productos radiofarmacéuticos hace necesarias algunas precauciones particulares. Los productos radiofarmacéuticos casi siempre se utilizan, debido a su corta vida útil, antes de que se completen todas las pruebas de control de calidad, por lo que es de suma importancia contar con un buen sistema de garantía de calidad.

Estas directrices pretenden complementar las proporcionadas en "Buenas prácticas de fabricación de productos farmacéuticos", así como las BPF para productos farmacéuticos estériles [56].

Los procedimientos reglamentarios necesarios para controlar los productos radiofarmacéuticos están determinados en gran parte por las fuentes de los productos y los métodos de fabricación.

Los radiofármacos se clasifican en cuatro categorías:

- productos radiactivos listos para su uso
- Generadores de radionucleidos
- Componentes no radiactivos ("kits") para la preparación de compuestos marcados con componentes radiactivos (generalmente el eluato de un generador de radionúclidos) [56].

El fabricante final del radiofármaco debe describir y justificar en una Gestión de Riesgos los pasos para la fabricación de la sustancia activa y del producto final en los cuales aplican las BPF en las etapas específicas de proceso/fabricación. La preparación de radiofármacos implica el cumplimiento de la normativa aplicable a la protección radiológica, del Reglamento General de Seguridad Radiológica y demás disposiciones aplicables. Los radiofármacos que se administren por vía parenteral deben cumplir los requisitos de esterilidad para las vías parentales y, en su caso, las condiciones asépticas de trabajo para la fabricación de formulados estériles. Algunos de los parámetros que deben tomarse en cuenta para la fabricación de radiofármacos bajo BPF son las siguientes, de acuerdo con las guías de BPF y la NOM 241 SSA1-2021 "Fabricación de dispositivos médicos" [55-58]

Tabla 3. Requerimientos de Buenas Prácticas de Fabricación de Radiofármacos.

Personal	<p>El personal del establecimiento de fabricación de radiofármacos debe estar calificado y debe tener conocimientos basados en la fabricación del producto y en seguridad radiológica, así como en buenas prácticas de fabricación. El personal involucrado en la producción, control analítico y liberación de radiofármacos debe estar debidamente capacitado en aspectos específicos de radiofármacos del Sistema de Gestión de Calidad. La persona autorizada debe tener la completa responsabilidad para la liberación de los productos.</p> <p>El personal debe tener formación que incluya protocolos para trabajar en áreas radiactivas, limpias y asépticas, no debe tener alguna enfermedad o condición que pueda comprometer la integridad del producto.</p> <p>Todo el personal involucrado en producción, mantenimiento y pruebas a seguir debe seguir las instrucciones correspondientes para el manejo de productos y desechos radiactivos, así como se monitoreados de contaminación y exposición.</p>
Equipos e Instalaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Los productos radiactivos deben ser fabricados en Áreas controladas (ambientales y radiactivas). Todas las etapas de fabricación deben llevarse a cabo en instalaciones dedicadas a radiofármacos y auto contenidas. Las superficies interiores (paredes, pisos y techos) deben ser lisos y libres de grietas; permitiendo una fácil limpieza y descontaminación. • Deben establecerse y aplicarse medidas para evitar la contaminación cruzada por parte del personal, los materiales, los radionucleidos, etc. La evaluación del riesgo debe demostrar que el nivel propuesto de limpieza ambiental es adecuado para el tipo de producto que se fabrica.

	<ul style="list-style-type: none"> • Las estaciones de trabajo y su entorno deben ser controlados con respecto a radiactividad, partículas y calidad microbiológica. • Los programas de mantenimiento preventivo, calibración y calificación deben ser realizados para asegurar que todas las instalaciones y equipos utilizados en la fabricación de radiofármacos sean adecuados y calificados. • El equipo debe estar construido de manera que las superficies que entran en contacto con el producto no sean reactivas, aditivas o de absorción, a fin de no alterar la calidad del radiofármaco. • La re-circulación de aire extraído de la zona donde los productos radioactivos se manejan debe evitarse a menos que sea justificada. Las salidas de aire deben estar diseñadas para minimizar la contaminación ambiental por partículas radiactivas. • Con el fin de contener partículas radiactivas, puede ser necesario que la presión de aire donde los productos están expuestos sea más baja en comparación con las zonas circundantes. Sin embargo, todavía es necesario proteger el producto de la contaminación ambiental.
Producción	<ul style="list-style-type: none"> • Los radiofármacos estériles se pueden dividir en aquellos que son fabricados asépticamente, y los que se esterilizan terminalmente. La instalación debe mantener el nivel de limpieza del medio ambiente para el tipo de la operación que se realiza. • La liberación del producto terminado está condicionada con la obtención de resultados satisfactorios. • Para la fabricación de radiofármacos una valoración del riesgo se puede aplicar para determinar las diferenciales de presión adecuadas, dirección del flujo de aire y la calidad del aire. • En el caso de uso de sistemas cerrados y automatizados (síntesis química, purificación, en línea filtración estéril) un entorno de grado C será adecuado (por lo general "cámaras de contención de radiación") las cuales deben cumplir con un alto grado de limpieza de aire, con aire de alimentación filtrado. Las actividades asépticas deben realizarse en un área de grado A. • Antes del comienzo de la fabricación, el montaje de equipo esterilizado y consumible debe realizarse en condiciones asépticas.
Control de calidad	<p>Igunos radiofármacos podrán ser distribuidos y utilizados con base a una evaluación de la documentación del lote, aunque no se hayan concluido todas las pruebas químicas y microbiológicas. La liberación del radiofármaco puede llevarse a cabo en dos o más etapas, antes y después de la prueba analítica completa.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La evaluación de los registros de producción y pruebas analíticas del lote deben ser revisados por una persona designada por el responsable sanitario, antes de permitir el transporte del radiofármaco en estatus de cuarentena al departamento clínico. • La evaluación de los datos analíticos finales, asegurando que todas las desviaciones de los procedimientos regulares están documentados, justificados y debidamente liberados antes de la certificación documentada por el responsable sanitario. Donde ciertos resultados de las pruebas no están disponibles antes del uso del producto, el responsable sanitario debe condicionalmente certificar el producto antes de su uso y, finalmente, debe certificar el producto después de que se obtienen todos los resultados de las pruebas. • La mayoría de los radiofármacos son para uso dentro de un corto tiempo y el período de validez con respecto a la vida útil radiactiva, deberá indicarse claramente. • Los radiofármacos con radionucleidos con vidas medias largas deben ser probados para mostrar, que cumplen todos los criterios de aceptación pertinentes antes de la

	<p>liberación y certificación por la persona autorizada.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antes de que las pruebas se realicen, las muestras se pueden almacenar para permitir que la radiactividad decaiga lo suficiente. Todas las pruebas, incluyendo la prueba de esterilidad deben realizarse en el tiempo que determine la unidad de calidad, que garantice que las muestras no representan un riesgo para el personal que las manipula. • Debe establecerse un procedimiento por escrito en el que se detalle la evaluación de los datos de producción y analíticos, que deben tenerse en cuenta antes de la liberación del lote. • Los productos que no cumplan con los criterios de aceptación deben ser rechazados. Si el material es reprocesado, se deben seguir procedimientos preestablecidos y el producto terminado debe cumplir con los criterios de aceptación antes de la liberación. • Un procedimiento debe describir también las medidas que debe tomar la persona autorizada (responsable sanitario) si se obtienen resultados insatisfactorios (fuera de la especificación) después de haber surtido el producto y antes de la expiración. • La distribución del producto terminado debe realizarse en condiciones controladas para asegurar la calidad del producto, así como para evitar cualquier tipo de contaminación.
Sistemas de documentación	<p>Debe existir un sistema de gestión de documentos para garantizar la trazabilidad de todos los procedimientos. La documentación puede ser en papel, electrónica o una combinación de ambos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Todos los documentos relacionados con la fabricación de radiofármacos deben ser preparados, revisados, aprobados y distribuidos de acuerdo a procedimientos escritos. • Se deben establecer y documentar las especificaciones de las materias primas, los materiales de etiquetado y embalaje, los productos intermedios críticos y el radiofármaco terminado. Las especificaciones también deben estar en el sitio para cualquier otro elemento crítico utilizado en el proceso de fabricación, tales como auxiliares de proceso, juntas, kits de filtrado estéril, que podrían tener un impacto crítico en la calidad. • Se deben establecer criterios de aceptación para el radiofármaco incluyendo criterios para la liberación, así como las especificaciones de la vida media (ejemplos: identidad química del radionucleído, concentración radiactiva, pureza y actividad específica). • Los registros del equipo principal utilizado, la limpieza, desinfección, esterilización y mantenimiento deben mostrar el nombre del producto y número de lote, además de la fecha, hora y la firma de las personas involucradas en estas actividades. • Los registros deben conservarse durante al menos 3 años.

Al igual que con todos los productos farmacéuticos, los productos deben estar bien protegidos contra la contaminación y la contaminación cruzada. Sin embargo, el medio ambiente y los operadores también deben estar protegidos contra la radiación. Esto significa que el papel de un sistema eficaz de garantía de calidad es de suma importancia.

Para establecer el alcance de calificación/validación en la fabricación de radiofármacos debe efectuarse la Gestión de Riesgos, centrándose en una combinación de BPF y protección radiológica [55,59].

La validación es la acción de comprobar que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema conduce efectivamente a los resultados esperados, con el objetivo

de contribuir a garantizar la calidad de un (radio) fármaco. La validación puede ser definida como la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un dispositivo médico que cumple consistentemente y es reproducible con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados. La calificación puede ser considerada como parte de la validación. Otro tema importante relacionado con el concepto de validación es la validación de los métodos analíticos, cuyos principios generales se describen en ICH Q(2) R1 que define el tipo de métodos analíticos para ser validados y establecer parámetros de preocupación y criterios de aceptación para ser considerados [59].

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la quimioterapia adyuvante para el cáncer ha sido durante mucho tiempo la estrategia aceptada para el tratamiento de varios tipos de tumores malignos, especialmente aquellos que involucran metástasis [1-2]. Sin embargo, la mayoría de los quimioterapéuticos producen efectos secundarios graves e incluso promueven la resistencia gradual desarrollada por los tumores. Por ello, se requiere desarrollar nuevos sistemas de administración más eficientes capaces de reducir la toxicidad asociada con la quimioterapia del cáncer, al tiempo que se preserven la eficacia terapéutica. Para ello, se han utilizado múltiples agentes, tales como nanopartículas funcionalizadas con un sensor molecular, así como nanoacarreadores sintéticos de rHDL reconstituidas utilizadas como vehículos transportadores de entrega de fármacos mediada por receptores que presentan propiedades funcionales y estructurales similares a las HDL endógenas [2-4].

Por otra parte, los métodos de terapia dirigida con radionúclidos portadores moleculares con alta afinidad a receptores de superficie en células tumorales, con emisiones α , como ^{225}Ac , y emisiones β como ^{177}Lu , exhiben la mayor eficacia terapéutica, ya que son capaces de depositar dosis ablativas de radiación en las células malignas [43]. Es importante mencionar, que los emisores α tienen un gran potencial para aplicaciones terapéuticas, debido a que presentan una alta energía de transferencia lineal y una trayectoria más corta (100 μm , LET 60–230 keV/mm), a diferencia de los emisores beta (12 mm, LET 0.1–1.0 keV/mm), depositando toda la radiactividad en el sitio blanco. Sin embargo, es necesario llevar a cabo su encapsulación en un nanotransportador (liposoma, nanopartícula, etc.), a fin de mantener confinado al radionúclido y mejorar el perfil de liberación de la dosis de radiación impartida a las células de cáncer, evitando biodistribuciones no deseadas en tejidos sanos. Como alternativa, las nanopartículas

rHDL pueden ser utilizadas para encapsular radionúclidos emisores alfa y ser utilizados como vehículos de administración debido a sus propiedades específicas como el tamaño (8-12 nm de diámetro), alta tolerabilidad, larga vida media circulante, así como el direccionamiento intrínseco dirigido a las células tumorales, depositando todo su contenido directamente en el citoplasma mediante la interacción con el receptor SR-BI que se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer, principalmente de ovario y próstata [2-3].

Por otra parte, las nanopartículas inorgánicas son vehículos particularmente adecuados para la radioterapia dirigida, ya que pueden empaquetar varios átomos radiactivos, como el ^{177}Lu , en un solo portador nanoparticulado, mejorando su actividad específica al ser irradiadas para su activación neutrónica. Además, al ser funcionalizadas con péptidos inhibidores de la proteína activadora de fibroblastos (iFAP) y del antígeno prostático específico de membrana (iPSMA) como sensores moleculares de direccionamiento específico, sería posible realizar procedimientos radioterapéuticos con alta eficacia en diferentes tipos de tumores cancerosos. Asimismo, las nanopartículas de $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}]$ podrían ser empleadas como un tratamiento alternativo a la radioembolización que utiliza microesferas de ^{90}Y , las cuales son altamente costosas y carecen de selectividad molecular. Por otra parte, la disponibilidad del lutecio estable en forma de nanopartículas de sesquióxido de lutecio (con una masa del lantánido abundante), permitiría obtener radionanopartículas para uso médico terapéutico en el reactor Triga Mark III instalado en México generando tecnología propia.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente proyecto es preparar y caracterizar física y químicamente lipoproteínas rHDL cargadas con $^{225}\text{AcCl}_3$ y comparar su potencial terapéutico con nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ como sistemas de radioterapia dirigida en células de cáncer de próstata y hepatocarcinomas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Preparar y caracterizar* lipoproteínas de alta densidad (rHDL)
 - II. Preparar y caracterizar* lipoproteínas de alta densidad ^{225}Ac -rHDL
- *Caracterización por TEM, SEM, tamaño de partícula y potencial zeta (DSL), UV-Vis, FT-IR, etc.
- VI. Realizar la encapsulación de la solución de $^{225}\text{AcCl}_3$ en rHDL.
 - VII. Formular farmacéuticamente (soluciones estériles) las lipoproteínas de rHDL cargadas de $^{225}\text{AcCl}_3$.
 - VIII. Evaluar la estabilidad en suero humano y la unión a proteínas séricas mediante radio-HPLC de exclusión molecular de las nanocápsulas de rHDL cargadas con $^{225}\text{AcCl}_3$
 - IX. Evaluar la captación específica de las nanocápsulas de ^{225}Ac -rHDL en células humanas de cáncer de próstata PC-3 (SR-BI-Positivas), de hepatocarcinoma HEP-G2 (SR-BI-Positivas) y fibroblastos humanos (SR-BI -Negativas).
 - X. Evaluar la internalización celular de las nanocápsulas de rHDL cargadas con $^{225}\text{AcCl}_3$ a células humanas de cáncer de próstata PC3 (SR-BI-Positivas), de hepatocarcinoma HEP-G2 (SR-BI-Positivas) y fibroblastos humanos (SR-BI -Negativas).
 - XI. Evaluar el efecto sobre la viabilidad celular de las nanocápsulas de rHDL cargadas con $^{225}\text{AcCl}_3$ a células humanas de cáncer de próstata PC3 (SR-BI-Positivas) y fibroblastos humanos (SR-BI -Negativas).
 - XII. Obtener los modelos radiofarmacocinéticos de la biodistribución de las nanocápsulas de rHDL cargadas con $^{225}\text{AcCl}_3$ en ratones atímicos con tumores inducidos PC3 (SR-BI-Positivas).
- III. Preparar y caracterizar* nanopartículas de Lu_2O_3
 - IV. Preparar y caracterizar nanopartículas de Lu_2O_3 -iFAP/iPSMA
- *Caracterización por TEM, SEM, tamaño de partícula y potencial zeta (DSL), UV-Vis, FT-IR, XRD, etc.
- V. Irradiar en el Reactor Triga Mark III a un flujo de 3×10^{13} , 40 h, a fin de producir las nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$.
 - VI. Fabricar bajo buenas prácticas de fabricación 3 lotes de nanopartículas de ^{177}Lu Lu_2O_3 -iFAP/iPSMA y evaluar su estabilidad como suspensión coloidal.

- VII. Realizar la formulación de nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA
- VIII. Evaluar la biodistribución de las nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA en ratones atómicos por su administración intravenosa
- IX. Evaluar el efecto citotóxico *in vitro* de las nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA
- X. Evaluar la actividad metabólica *in vitro* de las nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA

4. HIPÓTESIS

Las lipoproteínas de alta densidad (rHDL) que encapsulan $^{225}\text{AcCl}_3$, presentarán reconocimiento molecular específico *in vitro* e *in vivo* por células de cáncer mediados por los receptores SR-B1, lo cual permitirá la internalización citoplasmática del radionúclido ^{225}Ac en las células tumorales con la consecuente muerte celular, presentando un mayor daño a tejidos tumorales respecto a las nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ funcionalizadas con péptidos de reconocimiento molecular específico debido al depósito de alta energía a nivel celular por la internalización citoplasmática de partículas alfa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Tabla 4. Reactivos para la preparación de ^{225}Ac -rHDL y nanopartículas de ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA.

Sistema ^{225}Ac -rHDL	Nanopartículas ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA
Colesterol libre FC	$^{\text{nat}}\text{LuCl}_3$ (sigma aldrich)
Fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC)	2M NH_4OH : $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
Colesterol Oleato CE	Agua Inyectable
Colato de sodio	Citrato de sodio 19 mM
Metanol	Péptido DOTA-HYNIC-iFAP
Cloroformo	Péptido DOTA-HYNIC-iPSMA
PBS	
Apolipoproteína Apo A-I	
Buffer Tris-EDTA	
Kit para cuantificación de proteína BCA	
Kit para cuantificación de fosfolípidos	
DOTA-benzene-pSCN	
$^{225}\text{AcCl}_3$ ITM	
Línea celular PC-3	
Línea celular HEP-G2	
Fibroblastos humanos	
RPMI suplementado con penicilina y streptomocina y suero fetal bovino.	
Kit de XTT	
Ácido acético 0.5 M NaCl	

5.2 Materiales

Tabla 5. Materiales para la preparación de ^{225}Ac -rHDL y nanopartículas de ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA.

Sistema ^{225}Ac -rHDL	Nanopartículas ^{177}Lu Lu ₂ O ₃ -iFAP/iPSMA.
Chip 3D de 5 vias, 150 um (22mm largo, 15 mm ancho, y 4mm de alto)	Vaso de precipitados de 1000 mL
4 conectores lineales	Vaso de precipitados de 500 mL
Sello de conector	Unidad de filtración MWCO de 30 kDa
Microscopio digital de alta velocidad	Baño seco a 60 °C
Dos bombas de presión	Mortero con mano
Filtros de 0.22 um de PVDF	Espátula
Membrana 14000-kDa (MEMBRA CEL)	Frascos de 14 mL
Jeringas de 1 mL	Cápsulas de vidrio
Frascos estériles de 14 mL	Crisol de platino
Vaso de precipitados 250 mL	Balanza analítica
Parrilla de agitación	Filtro de 0.22 um
Hielo seco	Rejilla de cobre recubierta con carbon
Filtro de 30,000KDa	Celda de cuarzo
Solución de fosfotungstato de sodio al 2%	Pipetas de volumen variable 100-1000 uL
Celda de cuarzo	Tubos de medio de soya tripticaseína y tioglicolato
Pipeta 100-1000 uL	Tubos con reactivo LAL
Placas de microtitulación de 96 pozos	

5.3 Equipo

Tabla 6. Materiales para la preparación de ^{225}Ac -rHDL y nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA.

Sistema ^{225}Ac -rHDL	Nanopartículas ^{177}Lu Lu ₂ O ₃ -iFAP/iPSMA.
Sistema de microfluidos Dolomite	Baño seco a 60 °C
Microscopio digital de alta velocidad	Parrilla de agitación
2 bombas de presión	Centrifuga
DLS (Nanotracs Wave Modelo MN401)	Mufla
Microscopio de transmisión eléctrica JEOL JEM2010HT	Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM2010HT
Activímetro calibrado	Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6510LV
Detector de centelleo de NaI(Tl)	Equipo TGA-DSC (Termogravimetría acoplado a calorimetría diferencial de barrido)
Tubos de ensayo	Equipo para difracción de rayos X (XRD)
Espectrofotómetro Epoch Tm BioTek	Espectrometro Perkin Elmer de infrarrojo (FR-IR)
Balanza analítica	Espectrómetro Perkin Elmer Lambda Bio para determinación de absorción de luz UV-Vis

5.4 Métodos Parte I

Preparación de Micelas lipídicas y rHDL por el método de microfluidos con enfoque hidrodinámico (MFH)

Preparación de soluciones para la síntesis de micelas

La síntesis de las micelas se realizó por el método de microfluidos. Se prepararon dos soluciones (una orgánica A y una acuosa B). La orgánica (A) se preparó utilizando 2 mL de metanol: cloroformo (1:0.02 v/v) y se agregó una mezcla de los siguientes lípidos: 300 µL de fosfatidilcolina de yema de huevo (10 mg/mL en metanol), 7 µL de colesterol libre (10 mg/mL en metanol) y 7,5 µL de éster de colesterol (4 mg/mL en cloroformo).

Para la preparación de la solución B se utilizaron tabletas de solución de buffer de fosfatos (PBS) (0.01mL, pH 7.4) disueltas en agua bidestilada para la preparación de 1 Lt de una solución buffer. Ambas soluciones se filtraron utilizando un filtro de PVDF de 0.22 µm.

Se evaluó la relación del flujo FRR sobre el tamaño de las nanopartículas de rHDL, utilizando una variación en el TFR (Total Flow Ratio, por sus siglas en inglés) y al FRR (Flow rate ratio, por sus siglas en inglés), Tabla 7.

Tabla 7 .Parámetros para la obtención de micelas lipídicas por el método de microfluidos.

F. Lipidos (uL/min)	F. Agua (uL/min)	Cálculo de FRR	TFR (uL/min)
13	537	42	550
20	539	27	559
35	519	15	554
50	500	10	550
61	502	8	563
77	482	6	559

Para la formación de las micelas, se utilizó un chip de 5 vías que presenta un enfoque de flujo hidrodinámico permitiendo la formación de un flujo laminar estable confinado por dos flujos laterales. Las soluciones fueron administradas mediante dos bombas de presión. En la primera bomba del canal central se colocó la solución A que contenía la mezcla de lípidos/etanol/cloroformo (solución orgánica), mientras que en la segunda bomba se colocó la solución de PBS en los canales coaxiales (solución acuosa) utilizando los sensores de flujo correspondientes.

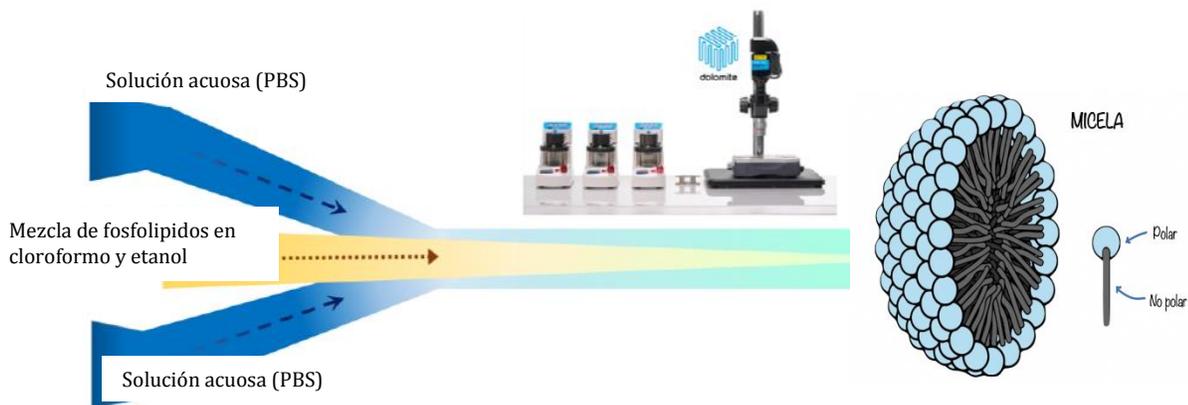


Figura 6. Preparación de micelas lipídicas por el método de microfluidos.

Después de hacer pasar las soluciones por el microchip, el flujo de la solución A fue aumentando lentamente hasta crear un flujo estable en el canal de salida. Se utilizaron diferentes relaciones de FRR entre la solución A y la corriente de la solución B y los tamaños de las micelas obtenidos fueron medidos por DLS para encontrar la combinación de la relación FRR óptima. El trayecto de las soluciones A y B a través del canal central y los coaxiales del microchip fue monitoreado mediante un microscopio digital de alta velocidad como se muestra en la Fig.7 para evitar aglomeraciones y verificar las tasas del flujo de cada una de las soluciones.



Figura 7. Obtención de micelas lipídicas en solución coloidal. Microchip de 5 vías y microscopio digital de alta velocidad para el monitoreo de las soluciones durante la formación del flujo laminar.

Síntesis de rHDL

Una vez obtenidas las micelas, fueron recolectadas en un vial y se realizó la diálisis correspondiente utilizando una membrana MEBRA CEL® (USA) de 14000 kDa con un tampón de PBS pH 7.4 para eliminar cualquier residuo del disolvente. Cuando el solvente fue eliminado se agregaron 4mg/mL de Apo AI y 140 µL de colato de sodio (20 mg/mL) manteniendo una proporción de 1:1.16 de EYPC

con Colato de Sodio y se realizó nuevamente una diálisis manteniendo en agitación la mezcla a 5 °C durante 24 h con 3 cambios de solución de diálisis para eliminar el exceso de surfactante. La solución obtenida fue filtrada utilizando un filtro Millipore de 0.45 µm y las rHDL obtenidas se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Caracterización de rHDL

I. Tamaño de las nanopartículas

El tamaño de las micelas lipídicas y las rHDL se determinó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) (Nanotracs Wave, modelo MN401, Microtract, Montgomeryville, PA, EE. UU.). Se tomaron 100 µL de cada muestra y se llevaron a un volumen de 1 mL con PBS A PH 7.4 para ser colocadas en la celda de lectura. El tamaño también se determinó por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (microscopio JEOL JEM2010 HT operado a 200 kV), con un aumento de 50000x para micelas y 200000x para las rHDL. Las muestras para TEM se tiñeron con una solución de fosfotungstato de sodio al 2% (pH 7.2) y se colocaron en celdas de soporte de cobre de malla 200 revestidas de carbono.

II. Contenido de proteínas

El contenido de proteína rHDL se determinó utilizando un ensayo colorimétrico basado en la formación de complejos de cobre utilizando el kit de proteínas de BCA (ensayo del ácido bicinconónico), mediante una curva estándar midiendo la absorbancia en λ de 562 (Epoch; Bio Tek Instruments, Winooski, Vermont, Estados Unidos).

El procedimiento fue el siguiente:

Realizar la preparación de la curva estándar utilizando micropipetas calibradas considerando el volumen suficiente para todas las 8 diluciones por triplicado y el Standard de BSA de 2mg/mL.

Tabla 8. Preparación de estándar BSA para la cuantificación de proteínas en las rHDL obtenidas.

Vial	µL PBS	µL y vial	Concentración
A	700	100 µL stock	250 µg/mL
B	100	400 µL vial A	200 µg/mL
C	100	300 µL vial B	150 µg/mL
D	100	100 µL vial B	100 µg/mL
E	100	100 µL vial D	50 µg/mL
F	100	100 µL vial E	25 µg/mL

G	400	100 μL vial F	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
H	100	0	0

Después de preparar la curva de calibración, las muestras fueron incubadas a 60°C por 15min. Después de la incubación, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5min. El blanco utilizado fue una solución de PBS para calibrar el espectrometro a una longitud de onda de 562nm. Las muestras fueron medidas a 562nm con una diferencia de 10 minutos entre cada una. Una vez tomadas las lecturas en el equipo Epoch; Bio Tek, se graficó una curva estándar con los datos obtenidos de las diluciones realizadas y se determinaron las concentraciones de las muestras de rHDL por triplicado.

III. Espectros UV-Vis

Los espectros UV-Vis de las micelas lipídicas y rHDL (1 mg/mL) se obtuvieron, utilizando una celda de cuarzo de volumen reducido con 2 caras transparentes y de bajo volumen (0.5 mL de capacidad) y un camino óptico de 1cm con un rango de 200 a 500nm. Las muestras se prepararon con una concentración de 1mg/mL utilizando un espectrómetro Perkin Elmer Lambda Bio.

IV. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de micelas lipídicas y rHDL se obtuvieron a partir de 50 escaneos a 0.4 cm^{-1} , de 400 a 4000 cm^{-1} en un espectrofotómetro PerkinElmer 2000 (Pike Technologies; Madison, WI, EE. UU.).

Preparación de ^{225}Ac -DOTA-Benceno-*p*-SCN para su incorporación en rHDL

Se preparó una solución lipofílica para su posterior incorporación en el nanosistema de rHDL. Se pesó 1mg de DOTA-benceno-*p*-SCN (pDOTA-Bz-SCN), y se agregaron en 50 μL de NaOH 0.01M, ajustando a un volumen final de 2mL con buffer de acetato 1M (pH 5.0) previamente preparado. Posteriormente se realizó el radiomarcado del compuesto con Ac-225. Se tomaron 200 μL de la solución DOTA-benceno-*p*-SCN previamente preparada y se agregaron 50 μL de una solución de $^{225}\text{AcCl}_3$ de una concentración de 18 MBq en 0.01 M HCl obtenido con el proveedor ITM. Finalmente, la mezcla se incubó a 95°C durante 30min. Es importante mencionar que la progenie de ^{225}Ac en la cadena de descomposición tiene emisiones gamma, por lo tanto, para cuantificar la actividad de ^{225}Ac en equilibrio secular, se utilizó un calibrador de radioisótopos CRC-55tR (Capintec Inc., Mirion Technologies, Florham Park, NJ, EE. UU.) (calibración # 775 con un multiplicador de 5x), que considera principalmente la emisión de ^{213}Bi 440keV.

Determinación de la pureza radioquímica de ^{225}Ac -DOTA-benceno-*p*-SCN

La pureza radioquímica del sistema radiomarcado ^{225}Ac -DOTA-benceno-*p*-SCN se determinó utilizando un sistema de cromatografía de fase reversa HPLC. La separación de las muestras se realizó con una columna Waters Bondapak-C18 a un flujo de 1 mL/min. Se utilizó un gradiente lineal del 100% al 10% de A en 20 min, con una solución (A) de H_2O con TFA al 0,1% y una solución (B) de CH_3CN con TFA al 0,1%.

Posteriormente, para determinar la pureza radioquímica se recogieron fracciones del HPLC en un volumen de 0,5 mL (40 fracciones) y se midió la actividad en un detector NaI(Tl) de centelleo tipo pocillo (Auto In-v-tron 4010; NML Inc., Houston, TX, EE. UU.). Una vez recolectadas las fracciones, se determinó la pureza radioquímica y los tiempos de retención del $^{225}\text{Al}^{+3}$ libre y del compuesto radiomarcado.

Preparación de ^{225}Ac -rHDL

Después de realizar el radiomarcado del compuesto ^{225}Ac -DOTA-benceno-*p*-SCN, se realizó su incorporación en las micelas rHDL previamente preparadas. Se colocó 1 mL de la solución de las micelas rHDL y se le añadieron 200 μL de ^{225}Ac -DOTA-benceno-*p*-SCN (12MBq). La mezcla se incubó a 37°C durante 1h para obtener el nanosistema ^{225}Ac -rHDL. En la Figura 8 se observan las etapas de incorporación del $^{225}\text{AcCl}_3$ a las rHDL sintetizadas previamente utilizando como agente quelante el DOTA para la formación del sistema ^{225}Ac -rHDL.

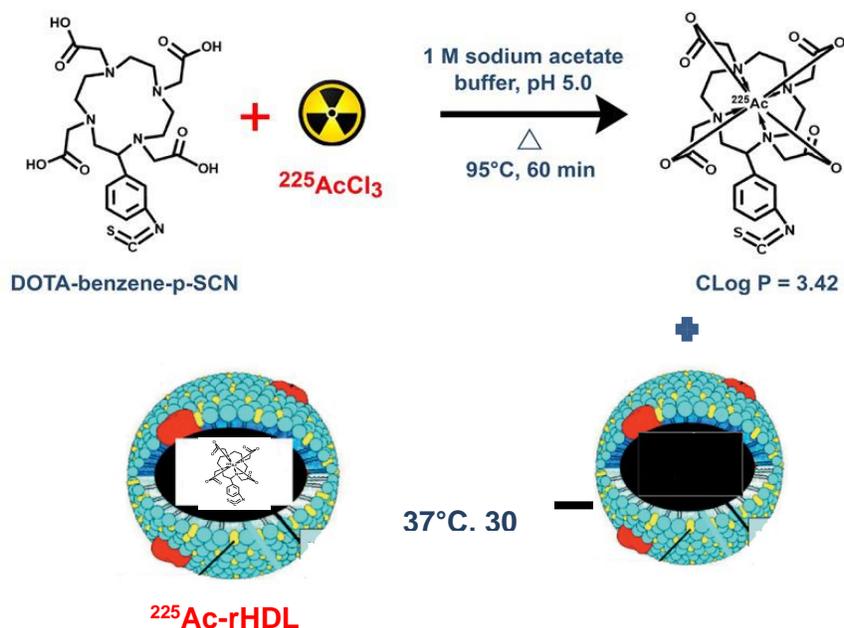


Figura 8. Etapas para la incorporación de ^{225}Ac dentro de las nanocápsulas rHDL (^{225}Ac -rHDL).

Después del tiempo de incubación, se determinó la eficiencia de marcaje del sistema obtenido ^{225}Ac -rHDL. La eficiencia del marcaje se evaluó mediante ultracentrifugación utilizando un filtro MWCO de 30kDa, Amicon Ultra, Millipore, en una centrifuga con 2500 g durante 0.5 hrs. La fracción que no fue retenida en la membrana se consideró como la radiactividad asociada a ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN y $^{225}\text{Ac}^{3+}$ que no se unió a rHDL, mientras que la fracción que permaneció en la membrana representó el nanosistema ^{225}Ac -rHDL. Ambas fracciones se contaron en un detector de NaI(Tl) de centelleo tipo pocillo para evaluar la eficacia del marcaje.

La muestra radiactiva que quedó en la membrana del filtro se resuspendió en 10 mL de tampón acetato (pH 5.0)/ácido ascórbico al 0,1%. Finalmente, una muestra de la solución final se volvió a centrifugar en las mismas condiciones (2500g durante 0,5 h; unidades de filtro MWCO de 30 kDa) para verificar la pureza radioquímica (RP) (RP = (actividad remanente en la membrana del filtro/actividad total X 100).

Estabilidad en suero del sistema ^{225}Ac -rHDL

Para determinar la estabilidad en suero del nanosistema ^{225}Ac -rHDL se tomaron 150uL del sistema marcado y se añadieron a 5mL de suero humano diluido. Las soluciones fueron preparadas por triplicado y se incubaron a 37°C durante 10 días. Posteriormente se tomó 1 mL de cada muestra a las 24, 72, 144 y 240 h y se añadieron 300 μL de TFA a cada una para la precipitación de proteínas. Las muestras preparadas se centrifugaron a 1200g durante 5min cada una. La actividad fue medida

en un detector NaI(Tl) de centelleo tipo pozo, donde la actividad obtenida en el sedimento correspondió al sistema ^{225}Ac -rHDL, y la actividad en el sobrenadante correspondió a la fracción libre de $^{225}\text{Ac}^{3+}$.

Estudios *in vitro*

I. Internalización celular

Para la evaluación del nanosistema *in vitro*, se utilizaron líneas celulares HEP-G2 (carcinoma hepatocelular humano), PC-3 (cáncer de próstata humano) y fibroblastos. Las células se mantuvieron en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% a 37°C. Se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía antibióticos (penicilina y estreptomina; 100g/mL) y suero fetal bovino a una concentración del 15%.

Cada una de las líneas celulares fueron preparadas en PBS pH 7.4 con una concentración de 1×10^5 células/tubo. Se utilizaron dos tratamientos diferentes en cada una de las líneas celulares. El nanosistema ^{225}Ac -rHDL, y ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN sin encapsular en las rHDL, ambos tratamientos fueron preparados con una concentración de 4kBq/200 μL PBS a pH 7,4 por triplicado. Posteriormente se prepararon un total de 27 tubos (9 tubos por cada línea celular) para agregar una suspensión con 1×10^5 células de cada una de las líneas celulares. Se ajustó el volumen a 2 mL con PBS tibio pH 7.4. Posteriormente se agregaron 20 kBq de los tratamientos a cada uno de los tubos por cada línea celular ($n=3$) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos se midieron en un detector de centelleo tipo pocillo NaI(Tl) para determinar la actividad inicial (100%) del tratamiento añadido. Los tubos se centrifugaron a 500 g durante 10 min. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón 2 veces con PBS, pH 7,4. Después, se añadió una mezcla de ácido acético/NaCl 0,5 M al botón obtenido. Esta suspensión fue medida nuevamente en el detector de centelleo NaI(Tl). La fracción obtenida de actividad correspondió a la cantidad de Ac-225 absorbido por célula. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 500g durante 10 min decantando el sobrenadante y lavando el botón dos veces con PBS pH 7.4 para eliminar la fracción de actividad unida a la membrana. Finalmente se añadió 1mL de PBS pH 7.4 y se midió nuevamente la actividad en el detector de centelleo, lo cual correspondía al porcentaje de actividad internalizado en las células respecto a la actividad inicial.

II. Ensayo de viabilidad celular

Se utilizaron dos tratamientos diferentes para evaluar el efecto citotóxico en cada una de las líneas celulares HEP-G2, PC-3 y células de fibroblastos. Los tratamientos con los cuales se realizó la evaluación del efecto citotóxico, fue el nanosistema de ^{225}Ac -rHDL y el sistema ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN sin encapsular.

Las células HEP-G2, PC-3 y fibroblastos (1×10^4 células/pocillo) fueron sembradas en placas de microtitulación de 96 pozos. El medio se eliminó después de la incubación durante 12h y las células se incubaron durante 1h con cada tratamiento (~ 4 kBq/200 μL). Después de retirar los tratamientos, las células se mantuvieron a 37°C, 5% de dióxido de carbono y 85 % de humedad relativa. El ensayo de viabilidad celular fue realizado empleando de deshidrogenasa mitocondrial usando el XTT kit (XTT (2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfopHeny]-2H-tetrazolium-5-carboxiabilida) sal (0.1g/mL), y se evaluó a las 3, 24, 48 y 192 h mediante mediciones espectrofotométricas (lector de absorbancia de microplacas, EpochTM, BioTek) a 450nm. Las células de fibroblastos que no recibieron tratamiento se consideraron como el grupo de control.

Calculo de dosis absorbida de radiación

Considerando la dosis absorbida de radiación como una magnitud para determinar la cantidad de radiación ionizante recibida en un tejido utilizando como unidad el gray (Gy), se realizó una estimación de la dosis absorbida del citoplasma al núcleo en las líneas celulares PC-3, HEP-G2 y Fibroblastos realizando el cálculo del número total de transformaciones nucleares (N)(Bq·s) que ocurrieron en el citoplasma de las células en diferentes tiempos.

El cálculo de la dosis se realizó considerando la integración matemática de la actividad (Ah) en el citoplasma, en función del tiempo:

$$N = \int_{t=1}^{t=2} A_h(t) dt$$

La dosis absorbida se calculó multiplicando N por el valor del factor de dosis (DF)(Gy/Bq·s). El valor de DF del citoplasma al núcleo se calculó utilizando el software MIRDcellV 2.1, considerando células con un diámetro de 20 μm , un radio del núcleo de 3 μm y una densidad de 1mg/mL. Para el cálculo de dosis se consideró la progenie de ^{225}Ac con rendimiento de desintegración significativo (^{225}Ac , ^{221}Fr , ^{217}At , ^{213}Bi , ^{213}Po , ^{209}Tl , ^{209}Pb), tal como se expresa en la Ecuación (1):

$$\bar{D}_{225\text{Ac-rHDL}(n \leftarrow Cy)} = \sum_{j=1} N_{(Cy)} \sum_k b_k DF_k^\alpha(n \leftarrow Cy) + \sum_{j=1} N_{(Cy)} \sum_k b_k DF_k^{e, ph}(n \leftarrow Cy)$$

$\bar{D}_{225\text{Ac-rHDL}(n \leftarrow Cy)}$ = Dosis de radiación absorbida (Gy) al núcleo de la célula

b_k =branching fraction de las hijas k

$DF_k^\alpha(n \leftarrow Cy)$ Dosis absorbida al núcleo de la célula de una emisión α por transformación nuclear (Gy /Bq·s) de la desintegración del radionúclido k originado en el citoplasma.

$DF_k^{e, ph}$ Dosis absorbida en el núcleo de la célula a partir de la emisión de electrones (e) y fotones (ph) por transformación nuclear (/Bq·s) de la desintegración del radionúclido k originado en el citoplasma.

$N_{(cy)}$ = Número total de transformaciones nucleares por cada radionúclido hijo ken el citoplasma.

Estudios de biodistribución

Los estudios *in vivo* con ratones Balb-C (7 semanas de edad, peso de 18 a 20g) se realizaron de acuerdo con las normas éticas correspondientes para el manejo de animales de laboratorio (“Norma Oficial Mexicana” NOM-062-ZOO-1999). Se inyectó un total de sesenta y tres animales en tres grupos: un grupo de ratones sanos (n=21) y dos grupos de ratones con tumores HEP-G2 inducidos (n=42).

Se evaluó la biodistribución del sistema ^{225}Ac -rHDL inyectando 50 μL del sistema con una actividad de 1 MBq en la vena de la cola de los ratones. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados a las 0,5, 1, 3, 24, 48, 96 y 192 h, se extrajeron los órganos del bazo, hígado, riñones, pulmones, intestino y corazón para medir la actividad por órgano en un contador de radiactividad (NaI(Tl)). Con los datos obtenidos de la actividad medida, se realizó el cálculo del porcentaje de dosis inyectada (%ID) por órgano, respecto al total de actividad inyectada del sistema ^{225}Ac -rHDL.

Los modelos biocinéticos ($q_h(t)$) fueron obtenidos utilizando los valores del % ID de cada órgano o tumor y se ajustaron a funciones exponenciales. Los valores obtenidos de %IA de cada órgano o tumor fueron ajustados a una función triexponencial y se consideró a cada uno de los radionúclidos generados en la cadena de desintegración del ^{225}Ac . Las funciones $A_h(t)$ [$A_h(t) = q_h(t)e^{-\lambda_R t}$] fueron corregidas por decaimiento adicionando la constante biológica (λ_B) y la constante radiactiva (λ_R), como sigue (Ecuación 2):

$$A(t) = Be^{-(\lambda_R + \lambda_B)t} + Ce^{-(\lambda_R + \lambda_B)t} + De^{-(\lambda_R + \lambda_B)t}$$

Para obtener el modelo biocinético, el número total de transformaciones nucleares (N) en cada órgano se obtuvo mediante la integración matemática (de $t = 0$ a $t = \infty$) de los modelos biocinéticos. Los valores de DF se obtuvieron mediante el software OLINDA 2.0, considerando una masa tumoral normalizada de 1.0 g y toda la progenie de ^{225}Ac . Las dosis absorbidas fueron obtenidas de acuerdo con la ecuación general:

$$\bar{D}_{(target \leftarrow source)} = \sum_{sources} N_{source} \sum_k b_k DF_k^{\alpha}_{(target \leftarrow source)} \sum_{sources} N_{source} \sum_k b_k DF_k^{e,ph}_{(target \leftarrow source)}$$

$\bar{D}_{(target \leftarrow source)}$, Dosis absorbida de radiación (Gy) de órgano fuente a órgano blanco

b_k , Branching fraction para los hijos k

$DF_{(target \leftarrow source)}$ Fracción de dosis absorbida por emisiones de electron y foton del decaimiento de las hijas k originadas en la región fuente absorbida por el órgano blanco.

$DF_{k(\text{target} \leftarrow \text{source})}^\alpha$ Dosis absorbida del órgano blanco de las emisiones alfa por transformación nuclear (Gy/Bq.s) del decaimiento de las hijas del radionúclido k originadas en los órganos fuente.

$DF_k^{e,\beta\gamma}$ Dosis absorbida del blanco por emisión de electrones y fotones por transformación nuclear (Gy/Bq.s) por desintegración del radionúclido hijo k originado en los órganos fuente.

5.5 Métodos Parte II

Síntesis de nanopartículas de lutecio

La síntesis de las nanopartículas de lutecio se realizó en un área limpia ISO-Clase 6 (de acuerdo con el apéndice normativo A de la NOM 241 SSA1 2012, Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos dedicados a la preparación de dispositivos médicos). Se realizó el escalamiento de 3 lotes para obtener en cada uno, una masa de 1.0 g de nanopartículas de sesquióxido de lutecio.

Para la preparación de cada lote, se utilizaron como reactivos nat LuCl_3 (polvo anhidro, 99.99%, sigma aldrich MO, USA), carbonato de amonio, Solución de Hidróxido de amonio y Agua inyectable. Para la preparación de las nanopartículas, se pesaron 2g de LuCl_3 en 5 mL de agua tipo I para obtener una solución 5M y se mantuvo en agitación durante 30 min. Después del tiempo de agitación, se agregó por goteo una solución previamente preparada de $\text{NH}_4\text{OH}/(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 1:1 (v/v) 2M hasta que la solución alcanzó un pH de 9 con una apariencia lechosa (precipitado blanco). La solución se mantuvo en agitación durante 1 hora y se centrifugó utilizando tubos cónicos de 50 mL. Posteriormente, el residuo sólido obtenido se lavó 5 veces por centrifugación (2500g/10 min) con agua tipo I con volúmenes de 15 mL por lavado. Posteriormente, el residuo precipitado obtenido se secó a 60°C durante 24h, transcurrido el tiempo, se pulverizó mecánicamente utilizando un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino. Finalmente, el polvo se calcinó a 1100 °C durante 24h en una mufla y después de calcinar, la masa obtenida se trituró mecánicamente en un mortero de porcelana para obtener un polvo fino.

Caracterización de nanopartículas de Lu_2O_3

Las nanopartículas obtenidas de sesquióxido de lutecio fueron caracterizadas por difracción de rayos X (XRD) para obtener el patrón de difracción de las nanopartículas de Lu_2O_3 para la determinación de los parámetros cristalinos, en un difractómetro Bruker D8 discover, y los datos fueron obtenidos mediante Diffrac Plus V4 file utilizando una fuente de rayos X $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0.15406$ nm) operando a 35 kV y una corriente de 25 mA con un rango $2\theta= 15^\circ$ a 80° . Se realizó el análisis termogravimétrico-calorimetría diferencial de barrido (TGA-DSC) del doble carbonato precursor $\text{Lu}(\text{OH})(\text{CO}_3)$ de las nanopartículas de Lu_2O_3 , bajo una atmósfera de nitrógeno, con una rampa de calentamiento de 10°C/min de 0 a 1000°C utilizando el equipo SDT Q600 V20.9 Software Build 20. El producto final se analizó por espectroscopía infrarroja (Fourier transformada infrarroja: plataforma ATR; Mod. 2000; PerkinElmer: Waltham, MA, EE. UU.) y microscopía electrónica de transmisión (JEOL TEM; Mod. JEM 2010-HT: Peabody, MA, EE. UU.). Además, también se utilizó un

analizador de tamaño de nanopartículas (Nanotracs; Mod. Wave I; Montgomeryville, PA, EE. UU.) para evaluar el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas mediante la dispersión dinámica de la luz.

Preparación y control de calidad de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA

Se realizó la manufactura de tres lotes del sistema ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA de manera reproducible. Para la obtención del sistema, previamente se pesaron 12 mg del polvo fino obtenido después de la calcinación (Lu₂O₃ NP) en cápsulas selladas para su irradiación por activación neutrónica. Las nanopartículas fueron irradiadas en el reactor nuclear Triga Mark III del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares con un flujo de neutrones de 1×10^{13} n/s·cm² en la posición SIFCA con 2 ciclos de irradiación de 30 h con un intervalo de 5 d entre ellos (60 h en total) para obtener una mayor actividad específica.

Después de terminar el segundo ciclo de irradiación de las nanopartículas de Lu₂O₃, se esperó un tiempo de 24 h para la preparación del sistema ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA en celdas blindadas automatizadas clase ISO 5, modelo MUSA (COMECER) con un blindaje de lingotes de plomo 98% (98%±2% de Sb) soportados en una estructura de acero. La celda se encontraba equipada con una lámpara UV y un sistema de flujo laminar con filtros terminales HEPA (99.997% de eficiencia) con el flujo laminar vertical 0.3m/s. Se empleó además un calibrador de dosis (CAPINTEC, CRC-55tR) calibrado, para la lectura de la actividad. Después de los dos ciclos de irradiación se obtuvieron un promedio de 3.5×10^{15} nanopartículas con un tamaño promedio de 23.4 nm y una actividad de 0.9 GBq/mg. Las nanopartículas obtenidas, fueron suspendidas en 20mL de una solución de citrato de sodio estéril previamente preparado con una concentración de 5 mg/mL. Posteriormente se agregaron 50 μL (2.8×10^{16} moléculas, 1mM) de 2,2',2'',2'''-(2-(4-(2-(5-(((S)-1-((S)-2-boronopyrrolidin-1-yl)-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)pyridin-2-yl)hydrazine-1-carbothioamido) benzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl) ácido tetracético (DOTA-iFAP:FAP) (Figura 9) y 50 μL (2.8×10^{16} moléculas, 1 mM;) de ((1-carboxy-5-(3-(naphthalen-2-yl)-2-(6-(2-(2-(4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)acetyl)hydrazinyl) nicotinamido) propanamido) pentyl)carbamoyl) glutamic acid (DOTA-iPSMA: ligando conjugado inhibidor de PSMA) (Figura 10). Después de una agitación por 2 min, se agregó 1 mL de gelatina (18mg/m, grado BPF) a la solución.

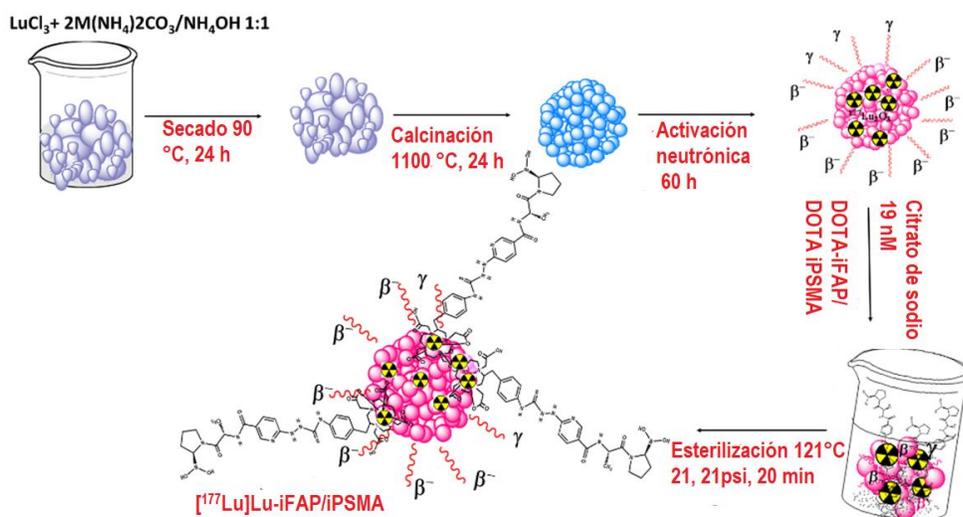


Figura 11. Preparación de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA.

Después de la preparación de los tres lotes de las formulaciones radiocoloidales, se realizó la evaluación del control de calidad de esterilidad, endotoxinas bacterianas, pureza radionucleídica y radioquímica de cada uno de los lotes fabricados. Los métodos empleados para las pruebas de control de calidad se realizaron de acuerdo con los métodos generales de análisis (MGA) descritos en la FEUM versión 13.0 en el apartado de radiofármacos, sin embargo, la evaluación de la pureza radioquímica del sistema radionanocoloidal se verificó mediante el método de ultracentrifugación, en el cual se realizó la cuantificación de la actividad obtenida de las nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA que permanecieron retenidas en el filtro y el ^{177}Lu -óxido de lutecio que no se encontraba en forma de nanopartículas así como el ^{177}Lu -cloruro de lutecio que no pasaron a través del filtro.

Como parte de la evaluación del sistema radionanocoloidal, se determinó la distribución del tamaño de las nanopartículas mediante DLS y TEM, el potencial Z (DLS) después del decaimiento completo del lutecio-177 así como la funcionalización de las nanopartículas mediante espectroscopia IR y el contenido de metales pesados mediante ICP-MS en el cual se realizó una correlación con la actividad radiocoloidal final y se expresaron como $\mu\text{g}/\text{GBq}$.

También se realizó la cuantificación del lutecio en solución coloidal Lu-iFAP/iPSMA mediante un análisis de fluorescencia de rayos X de reflexión total (TXRF). Para este análisis, se utilizó rubidio (1000 mg/L) y lutecio (1000 mg/L) (CRM) como patrones internos. Para la preparación de las muestras, se tomó una alícuota de 0,9 mL de cada muestra de las nanopartículas y se le añadió 0.1 mL de Rb (CRM) con un tiempo de agitación de 2 min. Posteriormente, se depositaron 10 μL de la muestra en un reflector de cuarzo y se secaron en una placa calentando a 60°C. Cada muestra fue preparada y analizada por triplicado.

Viabilidad celular

Para la evaluación de la viabilidad celular, se utilizaron las líneas celulares de cáncer colorrectal humano HCT116 (ATCC® CCL-247™) y macrófagos U-937 (células inmunitarias humanas) (ATCC® CRL-1593.2™), las cuales se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con solución de penicilina/estreptomicina al 1% y suero bovino fetal al 10% bajo una atmósfera de CO_2 (5%) a 37°C .

En el ensayo de citotoxicidad, se evaluó el efecto del nanosistema de $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}]$ sobre la viabilidad de los macrófagos U-937 y las células cáncerosas HCT116 expuestas. Para realizar el experimento, se sembraron 10^4 células/pocillo de macrófagos U937 y líneas celulares de cáncer colorrectal HCT116 en placas de microtitulación de 96 pozos. Se agregaron $60\ \mu\text{L}$ del sistema con una actividad 5 MBq y una masa de 0,01 mg de nanopartículas y se midió la viabilidad a las 24, 48 y 72 h, midiendo la absorbancia en cada pozo mediante un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm, considerando como grupo de control las células no tratadas.

Cocultivo de células cáncerosas y macrófagos

Se realizó la evaluación de la cinética de captación del nanosistema de $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}]$ en cocultivos de macrófagos U937 y células cáncerosas HCT116 mediante microscopía de fluorescencia. Se incubaron cada una de las líneas celulares con $60\ \mu\text{L}$ del sistema $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}]$ con una actividad de 5 MBq, en una masa de 0,01 mg de nanopartículas. Después de la incubación de las células con las nanopartículas de $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}]$ durante 1, 3 y 24 h, se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % durante 20 min, posteriormente se permeabilizaron con paraformaldehído al 0,5 % Tritón X-100; y se utilizó albúmina de suero bovino al 1% para el bloqueo celular. Finalmente, se utilizó DAPI para la tinción de núcleos y microscopía de fluorescencia para la observación de la intensidad de la fluorescencia intracelular.

Administración de $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}]$ en ratones portadores de tumores HCT116

Se utilizaron ratones atímicos (peso de $21 \pm 1\text{g}$; 8 semanas de edad; ratones hembra desnudos) ($n = 10$) a los cuales se les inyectó por vía subcutánea células HCT116 (1×10^6 células suspendidas en 0.2 mL de PBS) para la inducción de tumores. Los estudios se realizaron bajo las normas éticas para el manejo de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999).

A cinco ratones desnudos con tumores visiblemente desarrollados ($0.50 \pm 0.2\ \text{g}$) se les inyectaron por vía intravenosa (vena de la cola) nanopartículas de $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}]$ ($100\ \mu\text{L}$; 15 MBq; 0.017 mg de nanopartículas; $\sim 0.85\ \text{mg}$ de nanopartículas/kg de peso del ratón) en los días 1, 4, 7,

10 y 14 para un total de cinco dosis. Además, se utilizó como control negativo un grupo de cinco ratones portadores de tumores no tratados. El crecimiento del tumor fue monitoreado dos veces por semana utilizando las medidas de longitud (L) y anchura (a) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$V = \pi/6 \times (L) \times (a^2)$$

Después de 28 días (dos semanas después de la última dosis), los ratones se sacrificaron para extraer muestras de sangre para la cuantificación de creatinina y enzimas hepáticas y cardíacas. Los tumores, hígado, bazo, riñón, pulmón, cerebro y ovario fueron disecados y preparados para estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.

Evaluación histopatológica

Los tumores, hígado, bazo, riñón, pulmón, cerebro y ovario de ratones se fijaron con formaldehído al 4 % durante 24 h a temperatura ambiente, se incluyeron en parafina y se seccionaron en secciones de 4-5 μm de espesor con un micrótopo. Las secciones de parafina de muestras de tumores se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en una serie de alcoholes graduados. Las secciones de tejido desparafinado se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Las secciones se evaluaron utilizando un microscopio óptico (aumento de 400x y 1000x) (Zeiss; Mod. Axioscope: Oberkochen, Alemania). Las imágenes se adquirieron con una cámara digital (color de alta velocidad de 5MP; AmScope; Mod. Mu500: Irvine, CA, EE. UU.).

Inmunohistoquímica

Expresión de Ki67 y pEGFR

Las secciones de parafina de muestras de tumores se desparafinizaron en xileno y se rehidrataron en una serie de alcoholes graduados. Los antígenos se recuperaron en tampón EDTA-Tris 0,1 M. Las muestras se incubaron en H_2O_2 al 0,9 % durante 5 min, seguido de un período de bloqueo de una hora en BSA al 1 % en PBS. Los portaobjetos se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con anti-Ki67 (1:100; Biocare Medical: Concord, CA, EE. UU.) y anti-pEGFR (1:100; receptor del factor de crecimiento epidérmico Tyr1068 fosforilado; Biocare Medical: Concord, CA, EE. UU.) se lavaron e incubaron en polímero HRP universal MACH1 (Biocare Medical: Concord, CA, EE. UU.) durante una hora a temperatura ambiente. Luego, las muestras se revelaron con Betazoid DAB Chromogen Kit (Biocare Medical: Concord, CA, EE. UU.), se contrastaron con hematoxilina y se montaron con solución de resina sintética. Las secciones se evaluaron utilizando un microscopio

óptico (aumento de 400x y 1000x) (Zeiss, Mod. Axioscope: Oberkochen, Alemania). Las imágenes se adquirieron con una cámara digital (color de alta velocidad de 5MP; AmScope Mod. Mu500: Irvine, CA, EE. UU.).

Expresión de PSMA y FAP

Las secciones de tumor desparafinadas e hidratadas (teñidas con H&E para identificar áreas representativas) se incubaron en H₂O₂ al 0,9 % durante 5 min, seguido de una hora de bloqueo en BSA al 1 % en PBS. La tinción inmunohistoquímica se realizó con el anticuerpo monoclonal anti-PSMA de ratón (dilución 1:250; GCP-04 GeneTex: Irvine, CA, EE. UU.) o el anticuerpo policlonal anti-FAP de conejo (dilución 1:100; PA5-99458 Invitrogen: Waltham, MA, EE. UU.). Se evaluaron los campos aleatorios para las secciones del tumor utilizando un microscopio óptico (aumento de 400x y 1000x) (Zeiss, Mod. Axioscope: Oberkochen, Alemania). Las imágenes se adquirieron con una cámara digital (color de alta velocidad de 5MP; AmScope Mod. Mu500: Irvine, CA, EE. UU.).

Cuantificación de creatinina y enzimas

Las muestras de sangre de ratones, obtenidas por punción cardíaca, se utilizaron para evaluar la función renal, a través de la cuantificación de creatinina (método del picrato); la función hepática a través de la cuantificación de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST); daño tisular citotóxico (LDH, lactato deshidrogenasa); y la función cardíaca (CK). Las enzimas se cuantificaron utilizando ensayos de diagnóstico *in vitro* convencionales (analizador modular Roche/Hitachi Cobas 8000: Basilea, Suiza).

Ensayo de genotoxicidad

El efecto genotóxico de [^{177}Lu]Lu₂O₃-iFAP/iPSMA se realizó mediante la identificación de micronúcleos (cromosomas dañados no incorporados al núcleo después de la división celular) en eritrocitos inmaduros de médula ósea en ratones BALB/c sanos (ratones macho, peso de 23 ± 1 g; 10 semanas de edad;) tratados con nanopartículas por vía intravenosa (100 µL; 15 MBq; 0.017 mg de nanopartículas; ~0.85 mg de nanopartículas/kg de peso de ratón) (n=12). Los ratones no tratados se usaron como control negativo (n=12). Además, se administró colchicina a 1 mg/kg como control positivo (n=12) para la formación de micronúcleos. En grupos de cuatro, los ratones se sacrificaron a las 24, 48 y 168 h después de cada tratamiento para obtener células de médula ósea, que se tiñeron con Giemsa-Wright (Diff-Quick; Harleco; Gibbstown, NJ, EE. UU.). Se contaron dos mil eritrocitos policromáticos (PCE) por ratón utilizando un microscopio óptico (Zeiss, Mod. Axioscope: Oberkochen, Alemania) con un aumento de 1000x para determinar la frecuencia de eritrocitos policromáticos con micronúcleos.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos en la citotoxicidad, genotoxicidad y evaluación de los ensayos de crecimiento tumoral HCT116 se analizaron utilizando la prueba t de Student ($p < 0.05$ se estableció como significativa).

Biodistribución de nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ y [^{177}Lu]Lu $_2$ O $_3$ -iFAP/iPSMA

Los estudios *in vivo* se realizaron en ratones sanos (ratones CD1 machos; 8 semanas de edad; peso de 40 a 42 g) de acuerdo con las normas y estándares éticos para el manejo de animales de laboratorio (Reglas Oficiales Mexicanas). Norma NOM-062-ZOO-1999). Se inyectaron ratones CD1, a través de la vena de la cola, con nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA o $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP (50 μL ; 13 MBq).

Posteriormente, se obtuvieron imágenes radioluminiscentes de cuerpo completo de tres ratones a través de un sistema equipado con una cámara CCD (XTREME Imaging System; Bruker, Billerica, MA, EE. UU.), en los tiempos posteriores a la inyección: 0,5, 1, 2, 3, 24, 48, 72 y 96 h. Los otros ratones CD1 se sacrificaron a intervalos de tiempo de 3, 48, 72 y 96 h ($n = 3$ para cada tiempo) para cada radionanosistema. Se disecaron los siguientes órganos: hígado, bazo, pulmones, páncreas, corazón y riñones, cuya actividad se midió en un detector de NaI dopado con talio, con el fin de determinar el porcentaje de la dosis inyectada por órgano (%ID) con respecto a la actividad total inicialmente inyectada. A dos grupos de ratones sanos ($n = 3$) (ratones CD1; peso promedio de 40g) se les inyectó por vía intravenosa una dosis única (12 $\mu\text{g}/40\text{g}$, 2MBq) de nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA o $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP.

Se utilizaron ratones atímicos (ratones macho desnudos; 7 semanas de edad; peso de 20 a 22g) para la inducción de tumores mediante inyección subcutánea de células HCT116 (1 millón de células suspendidas en 0.2 ml de PBS) en el músculo de la pierna.

6. RESULTADOS PARTE I

Preparación de Micelas lipídicas y rHDL

Se realizó un diseño de experimentos con varias combinaciones teniendo como variables dependientes el Radio de flujo total (TFR) del sistema utilizando un rango de 300 a 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ y el valor de la relación del flujo (FRR), con los cuales pudieron obtenerse micelas lipídicas en un rango de diámetro hidrodinámico aproximado entre 10 y 230 nm (variable independiente) utilizando este Chip de 5 entradas y controlando la relación de flujo FRR en el sistema Dolomite Microfluidics. En la tabla 9 se observan los datos obtenidos que fueron empleados para determinar el tamaño óptimo de las micelas lipídicas antes de la formación de las rHDL.

Tabla 9. Datos obtenidos del ajuste del FRR y TFR para obtener el tamaño óptimo de las micelas lipídicas.

FRR	TFR	Tamaño nm
42	550	61
42	550	56
42	550	58
27	559	60
27	559	57
27	559	54
15	554	56
15	554	49
15	554	44
10	550	45
10	550	54
10	550	48
8	563	150
8	563	143

De acuerdo con los resultados obtenidos, se realizó un gráfico de efectos principales en Minitab 2019, y anova de 2 vías para verificar la interacción entre los valores obtenidos de TFR y FRR con el tamaño de las micelas (Figura 12). De acuerdo con los valores obtenidos, se encontró que el valor óptimo para un tamaño de las micelas menor a 50 nm era con un valor de Total Flow Ratio (TFR) de

550 $\mu\text{L}/\text{min}$ y de flow rate ratio (FRR) de 1:27 y 1:42 respectivamente ya que no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre estos dos valores.

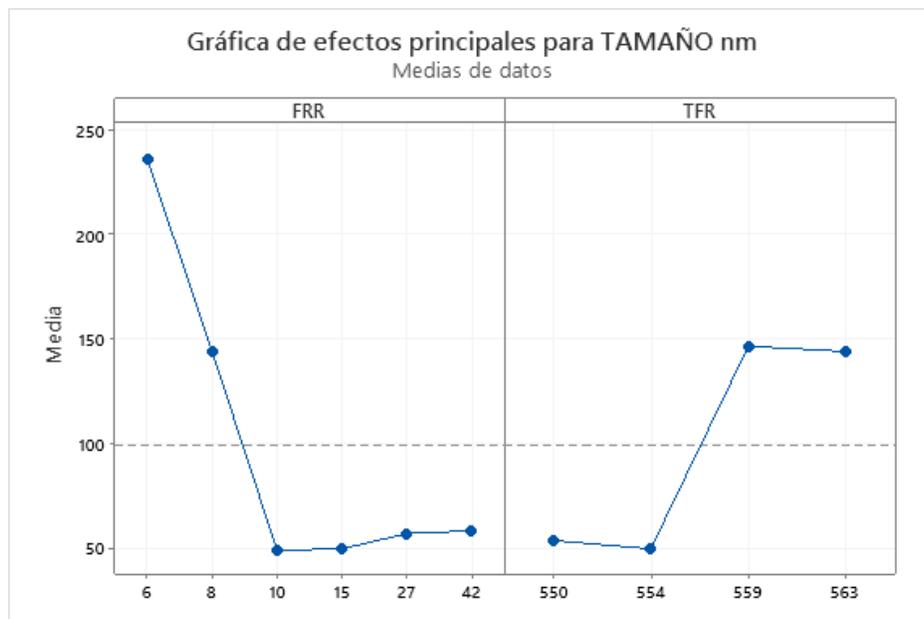


Figura 12. Gráfica de efectos principales de FRR y TFR sobre el tamaño de las micelas.

Los resultados obtenidos corroboran que el efecto del FRR afecta fuertemente el aumento de la polaridad en toda la cámara así como la concentración final del solvente, ya que como ha sido reportado previamente a mayor FRR, la concentración de lípidos para un volumen dado de PBS disminuye [8-10], lo cual permite la rápida difusión y precipitación de las micelas reduciendo así el tamaño de las micelas más grandes, lo cual puede observarse en los resultados obtenidos en la figura 10, ya que con un FRR bajo la concentración de lípidos por un volumen dado de PBS aumenta y se requiere de un mayor tiempo para completar el ensamblaje de las micelas obteniendo tamaños más grandes. Con la síntesis de micelas por este método, se logró tener un control preciso de la uniformidad y el tamaño que no se puede lograr con la síntesis de lotes tradicional.

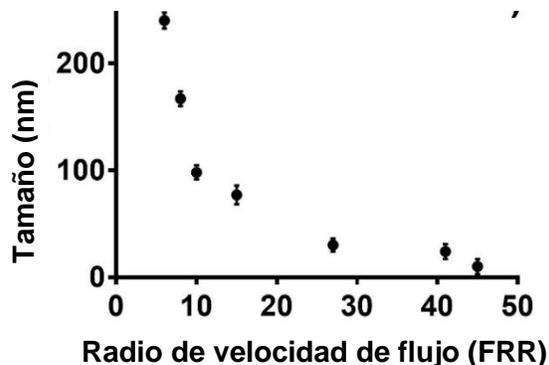


Figura 13. Relación entre el radio de la velocidad de flujo FRR y el tamaño de partícula, a mayor FRR el tamaño disminuye.

Normalmente las vesículas de rHDL son producidas por la formación de una película lipídica que puede ser hidratada por métodos de sonicación, hidratación, o ambos utilizando un tampón que contiene la Apolipoproteína Apo-AI [12-14]. Sin embargo, con el método de microfluidos se pueden controlar diferentes variables de composición y tamaño para un rendimiento óptimo permitiendo la producción continua de micelas lipídicas para la posterior incorporación de la Apo-AI para formar las rHDL y cargarlas con el material radiactivo correspondiente, permitiendo una mejor biodistribución.

Determinación de tamaño de las micelas lipídicas y rHDL por DLS y TEM

Una vez que se llevó a cabo el ensamble de las micelas con la lipoproteína Apo AI y el colato; se midió el tamaño por DLS (Dispersión dinámica de luz) y TEM (Microscopía electrónica de barrido). El diámetro hidrodinámico medio de las lipoproteínas rHDL obtenidas así como el índice de polidispersidad (PDI) fueron determinados por la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) obteniendo un diámetro promedio de 13.14 ± 0.2 nm (Figura 14) y un índice de polidispersidad de 0.176 (Tabla 10), todas las muestras mostraron distribuciones monomodales y monodispersas, con un tamaño homogéneo en las lipoproteínas obtenidas.

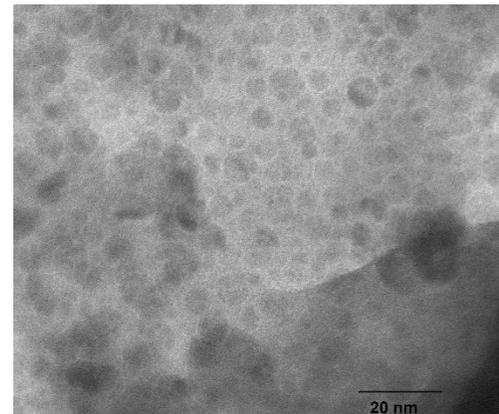
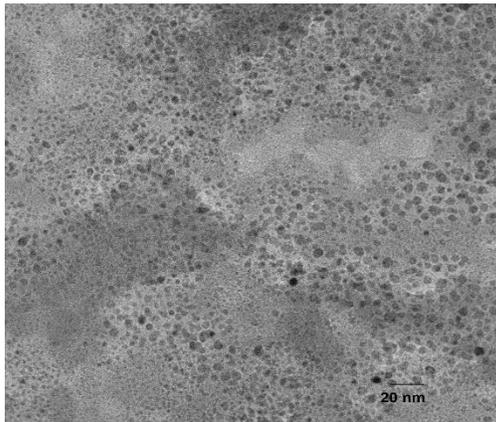
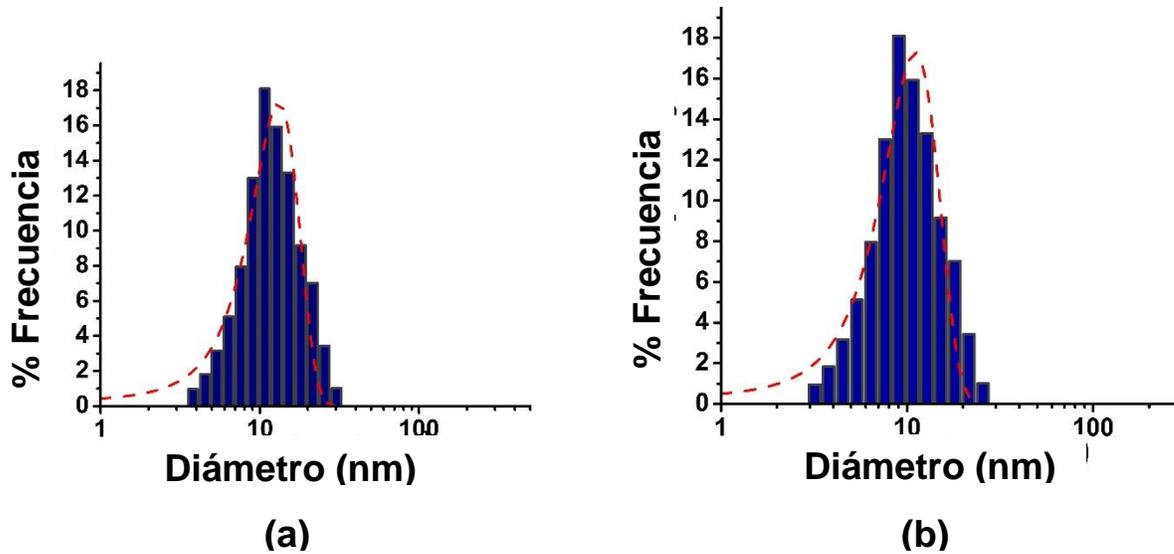


Figura 14. (a) Distribución del tamaño de las micelas lipídicas y (b) Distribución de las rHDL por DLS.

Los estudios realizados por Microscopía electrónica de Transmisión revelaron la presencia de partículas con forma esférica y con distribución homogénea y uniforme, con un diámetro medio de 11.1 ± 0.17 nm como se muestra en la figura 14, ya que las nanopartículas contenían en su estructura la Apo AI a diferencia de las micelas lipídicas con un aumento de tamaño ~ 2 nm, sin embargo, se mantuvo la morfología y la distribución de tamaño homogénea. En la tabla 10 se muestra un resumen con las propiedades obtenidas en las rHDL y las micelas lipídicas.

Tabla 10. Características físicas de las micelas y las rHDL ensambladas.

Parámetro	Micelas lipídicas	rHDL
Diámetro hidrodinámico (nm) por DLS	11.03±0.04	13.14±0.20
Diámetro medio (nm) por TEM	10.20±0.13	11.10±0.17
Índice de polidispersidad	0.121	0.176
Contenido de proteína (mg/mL)	No aplica	0.131

El contenido de proteína en las rHDL obtenido por el ensayo de BCA en la curva estándar fue de 0,131 mg/mL después de agregar la lipoproteína Apo AI a las micelas lipídicas. En la figura 15, se observa la curva estándar obtenida para la cuantificación de proteína.

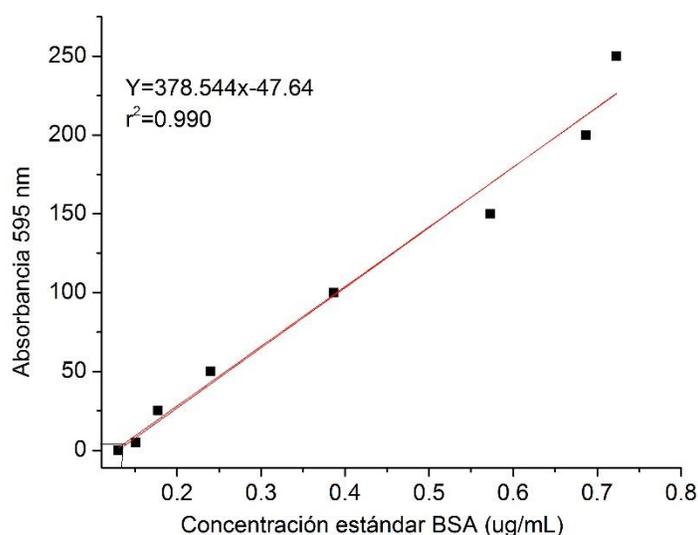


Figura 15. Curva estándar para la cuantificación de proteína en las rHDL por el método de BCA.

Caracterización química de las Micelas lipídicas y rHDL

Análisis por FT-IR y Uv-Vis

Se realizó el análisis FT-IR de las micelas obtenidas por el método de microfluidos y para las rHDL después de incorporar la apolipoproteína Apo-AI. Los espectros se muestran en la Figura 16. La Tabla 11 muestra las bandas características de los componentes de las rHDL (apolipoproteína Apo-AI, fosfolípidos, ésteres de colesterol y colesterol libre).

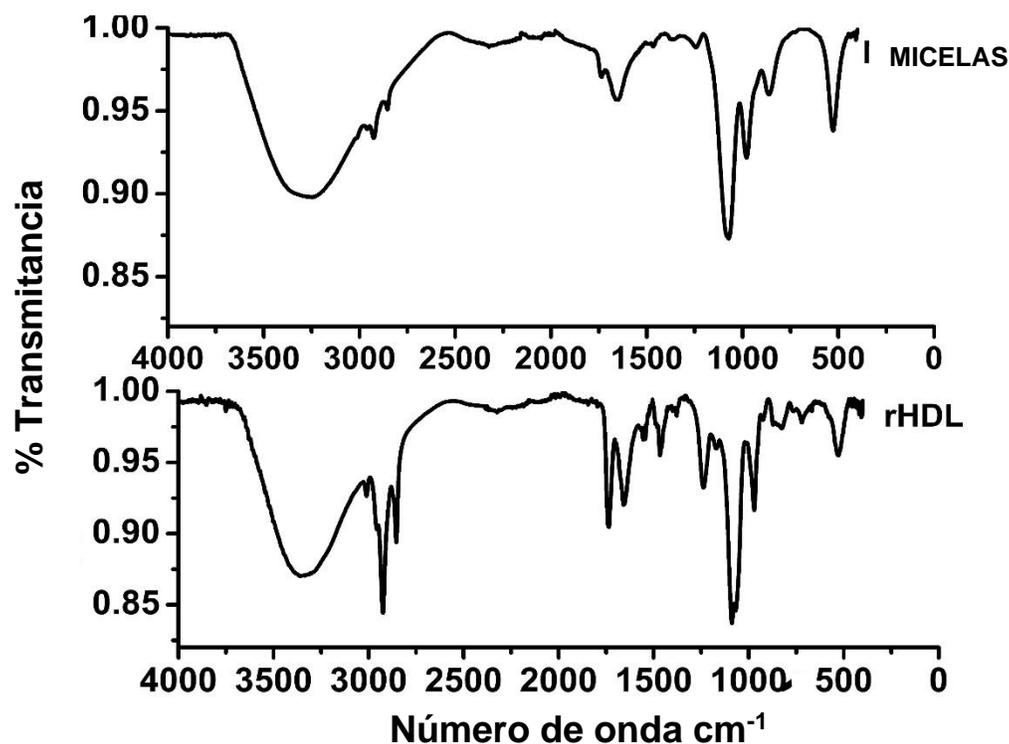


Figura 16. Espectros FT-IR de las micelas sin Apo AI y las rHDL.

La banda en 3400cm^{-1} observada en el espectro de las micelas lipídicas es atribuible a los grupos (O-H) ν presentes en la molécula de colesterol. Sin embargo, se observó un desplazamiento a 3287cm^{-1} después de la adición de Apo AI, que está asociado con la vibración de estiramiento (OH) de las moléculas de agua que permanecen en la interfaz entre la lipoproteína y el colesterol, así como indicativo de la incorporación de Apo AI a las micelas lipídicas debido a las interacciones de los residuos de lisina de la amina primaria con los grupos lipídicos correspondientes. La banda de mayor intensidad en 2955cm^{-1} que corresponde a un estiramiento asimétrico (C-H) ν característico de los grupos metilo presentes en las cadenas de fosfolípidos mientras que la banda en 2854cm^{-1} corresponde al estiramiento simétrico (C-H) ν de los grupos metileno que constituyen las rHDL. Sin embargo, en el espectro obtenido de las micelas lipídicas esas señales pueden estar superpuestas por la banda amplia de la vibración (O-H) ν debido a que no se encuentran interaccionando con la proteína. Otra región importante es la de 1500 a 1800cm^{-1} la cual es característica de las vibraciones correspondientes (C=O) ν de los enlaces éster presentes en las cadenas de fosfolípidos. En la región de 1500 a 1700cm^{-1} también se evidencian las vibraciones características relacionadas a la estructura de la Apolipoproteína Apo-AI, la cual constituye el 50 % de la masa total de las rHDL ya que se encuentra conformada por 4 hélices N-terminal y 2 hélices C-terminal. En esta región, se

encuentra el estiramiento asimétrico (C=O) ν correspondiente a los grupos carbonilo de los enlaces peptídicos de la Apo-AI. En el espectro de las rHDL, se observa una banda importante en 1650 cm^{-1} correspondiente a la Amida I de la α -hélice de la Apo-AI, y en 1538 cm^{-1} una banda que se atribuye a la amida II compuesta por una flexión (N-H) ν y estiramiento (C-N) ν de los enlaces peptídicos correspondientes. Para el caso de las micelas lipídicas se observa una banda de menor intensidad y ancha en 1674 cm^{-1} que se atribuye a la vibración (C=C) ν característico del segundo anillo del colesterol, de igual manera se observa una región en 1300 a 900 cm^{-1} que son menos intensas y se atribuyen a las vibraciones de los grupos CH_2 y CH_3 presentes en el colesterol y en las cadenas de fosfolípidos, sin embargo, no se observa la banda ancha de 1400 cm^{-1} del espectro de las rHDL ya que corresponde a los estiramientos asimétricos de los grupos (COO-) ν de los residuos de Aspartato y Glutamato, los cuales se cree se encuentran involucrados en el acoplamiento de la lipoproteínas con los lípidos.

Tabla 11. Resumen de las bandas principales de las rHDL.

Frecuencias principales (cm^{-1})	Grupo funcional	Bandas asociadas a las rHDL
3287	(O-H) ν str	Interface acuosa proteína-lípido
2955	(C-H ₃) ν asym str	Metilos de cadenas lipídicas
2854	(C-H ₃) ν sym str, (C-H ₂) ν sym str	Metilenos de cadenas lipídicas
1810-1500	(C=O) ν str	Enlaces éster en fosfolípidos
1700-1600	(C=O) ν str, Amide I	Enlaces peptídicos de Apo A-I
1650	Amide I	α -hélice de Apo AI
1538	(N-H) ν , (C-N) ν Amide II	Enlace Peptídico
1500-1300	(C-H ₂) ν δ (scissoring)	-CH ₂ de los grupos acilo de las cadenas lipídicas
1414	(O-C=O) ν sym str	Residuos de Asp y Glu
1378	(C-H ₃) ν sym δ , (C-H ₂) ν	Cadenas de fosfolípidos
1233	(P=O) ν str, (O-P=O) ν asym str	Fosfolípidos
1140	(CO-O) ν str	Enlaces éster del colesterol
1089	(PO ₂ -) ν sym str,	Fosfolípidos
1063	(C-O-C) ν sym str	Ester de colesterol
970	(N+ (CH ₃) ₃) ν assym str	Grupo colina en fosfolípidos

En los espectros obtenidos, se observa la diferencia en la intensidad de las bandas en las micelas lipídicas que contienen bandas características atribuibles a los ésteres de colesterol y colesterol libre que se incorporaron en la mezcla para la formación de micelas, sin embargo, la Apo-AI se

asocia preferentemente con membranas lipídicas ácidas a través de interacciones electrostáticas entre residuos de lisina y grupos de lípidos cargados negativamente. El espectro de micelas lipídicas contiene bandas características atribuibles al colesterol y ésteres de colesterol libre como componente de la mezcla para la formación de micelas, mientras que en el espectro de rHDL se aprecia la asociación de Apo AI con membranas lipídicas ácidas, a través de interacciones entre residuos de lisina y grupos lipídicos cargados negativamente. Las interacciones con los fosfolípidos aniónicos aumentan el contenido de α -hélice de Apo AI, que también es un factor importante en el reconocimiento del blanco molecular específico.

El espectro UV-Vis de las micelas mostró una amplia banda de absorción a 207nm y un hombro a 244nm (Figura 17) en concordancia con lo reportado para compuestos de colesterol. La banda a 244nm está asociada con las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de las cetonas insaturadas α y β presentes en la estructura del colesterol. Después de incorporar Apo AI en las micelas, se observó una banda de absorción a 284nm, lo que indica el acoplamiento correspondiente. Luego de incorporar Apo AI a las micelas, se observó una banda de absorción a 284nm, lo que indica el acoplamiento de las proteínas a las micelas lipídicas. También se observó una ligera banda a 231nm en el espectro de rHDL, que se asocia con la interacción lípido-proteína,

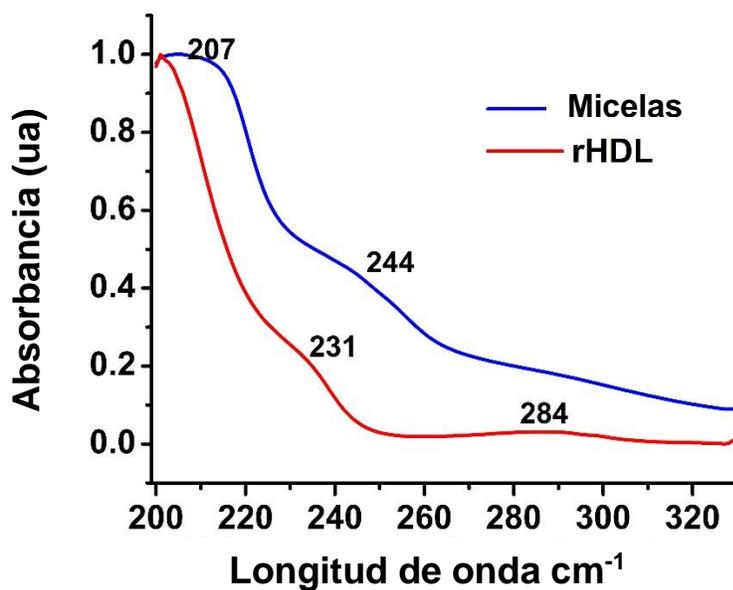


Figura 17. Espectro UV-Vis de las micelas lipídicas (azul) y de las rHDL (rojo).

Preparación del sistema ^{225}Ac -rHDL

La incorporación de Ac-225 en las vesículas de rHDL se llevó a cabo eficientemente por internalización pasiva, utilizando como agente quelante al macrociclo DOTA-benceno-p-SCN para quelar al Ac-225, ya que ha demostrado ser altamente estable para elementos trivalentes. Se realizó primeramente el acomplejamiento del Ac-225 en la molécula altamente lipofílica para formar el compuesto ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN con un CLog P de 3.42 y después se adicionaron las rHDL sintetizadas previamente para formar el sistema ^{225}Ac -rHDL.

Se realizó la determinación de la eficiencia de marcado del sistema ^{225}Ac -rHDL después de llevar a cabo la internalización del Ac-225 en las rHDL obteniendo una eficiencia de marcaje de $85 \pm 3\%$.

La pureza radioquímica fue determinada por ultrafiltración, obteniendo porcentajes de pureza radioquímica del $99 \pm 0.6\%$.

Estudios *in vitro*

Estabilidad en suero del sistema ^{225}Ac -rHDL

El sistema ^{225}Ac -rHDL se incubó en muestras de suero humano fresco por triplicado a 37°C durante 10 días. Durante el análisis de las muestras a las 24, 72, 144 y 240 h, el sistema mostró una estabilidad metabólica en suero mayor al 99 %, es decir, el ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN permaneció atrapado dentro de las rHDL sin fugarse. Es importante mencionar que las hijas del Ac-225 (emisores alfa) pueden escapar de la membrana de los fosfolípidos liposomales para irradiar células no blanco, sin embargo una vez que son emitidas se encuentran cargadas y después de perder su energía de retroceso, no pueden difundirse libremente a través del compartimiento hidrófobo de la bicapa de fosfolípidos, sin embargo, podrán liberarse dentro de la célula tumoral una vez que puedan ser difundidas evitando que escapen a tejidos no deseados. La encapsulación exitosa del ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN en la vesícula hidrofóbica de rHDL permitió la retención del ^{225}Ac y su progenie dentro del nanosistema.

Ensayo de viabilidad celular y dosis a núcleo

Las células que fueron utilizadas para el ensayo de viabilidad celular fueron PC-3 y HEP-G2 (SR-BI positivo) y fibroblastos (control negativo). El ensayo de viabilidad celular se realizó después de colocar los tratamientos a cada una de las líneas celulares. Se emplearon como tratamientos el ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN y ^{225}Ac -rHDL y se incubaron a 37°C durante 1 h. Después del tiempo de incubación, se midió la viabilidad celular en cada una de las líneas celulares. Para el caso de las

líneas celulares PC-3 y HEP-G2 tratadas con ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambas líneas celulares ni con respecto a los fibroblastos ($p > 0.05$, ANOVA de dos vías),

Los resultados de viabilidad celular fueron corroborados con los resultados obtenidos en el ensayo de internalización celular (Figura 18), ya que todas las líneas celulares tratadas con ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN presentaron una baja internalización. Estos resultados indican que el sistema ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN, a pesar de ser un compuesto hidrofóbico, no tiene un mecanismo de interacción con la superficie de la membrana celular que permita la internalización del Ac-225 en el citoplasma celular.

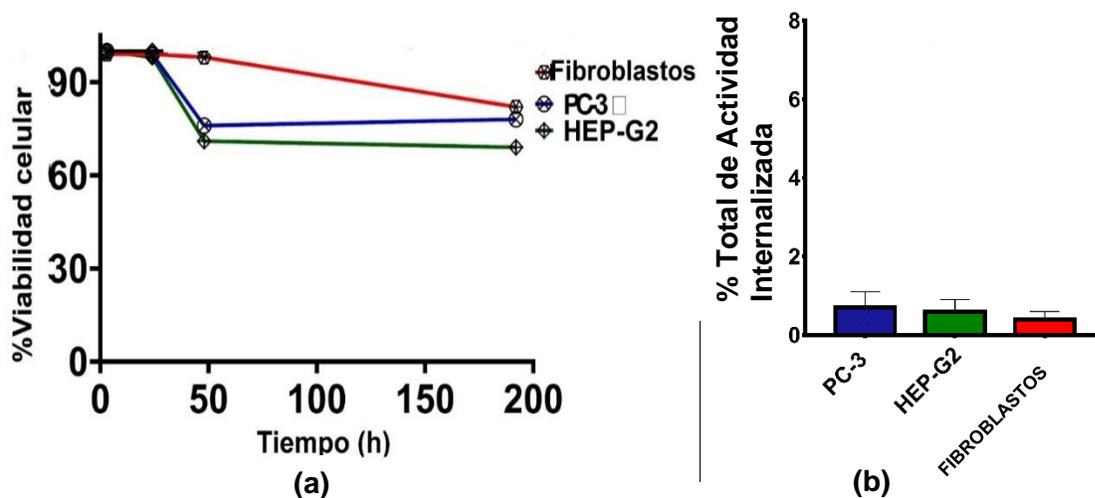


Figura 18. (a) Porcentaje de viabilidad celular para las líneas celulares: Fibroblastos, PC-3 y HEP-G2 con el tratamiento ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN. (b) Porcentaje de internalización en las líneas celulares con el tratamiento ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN.

Por otra parte, en los resultados observados en las líneas celulares PC-3 y HEP-G2 que recibieron tratamiento con el nanosistema ^{225}Ac -rHDL mostraron una viabilidad celular de $54.67 \pm 3.16\%$ y $53.12 \pm 2.93\%$ a las 3 h respectivamente con un ligero aumento a las 24 h ($62.08 \pm 2.44\%$) para PC-3 y $64.32 \pm 3.38\%$ HEP-G2). Una posible explicación podría ser que los mecanismos de reparación celular se estimulan al recibir una dosis inicial de radiación promoviendo la proliferación celular en ambas líneas celulares. Sin embargo, la viabilidad celular disminuyó a $3.22 \pm 0.72\%$ para la línea celular PC-3 a las 192 h después del tratamiento con ^{225}Ac -rHDL y a $1.79 \pm 0.23\%$ para la línea celular HEP-G2, como resultado de la internalización significativa del Ac-225. En el caso de los fibroblastos, se observó una viabilidad celular de $81.2 \pm 7.21\%$ y el índice de internalización más bajo con respecto a las dos líneas celulares (PC-3 y HEP-G2), después del tratamiento con ^{225}Ac -rHDL.

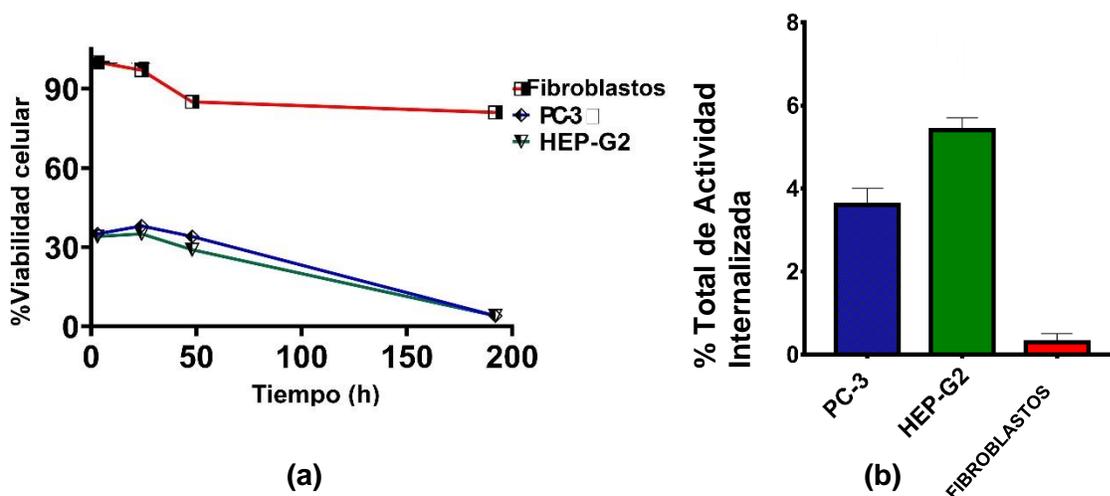


Figura 19. (a) Porcentaje de viabilidad celular para las líneas celulares: Fibroblastos, PC-3 y HEP-G2 con el tratamiento $^{225}\text{Ac-rHDL}$, (b) Porcentaje de actividad total internalizada en las líneas celulares con el tratamiento $^{225}\text{Ac-rHDL}$.

Como es sabido, los fibroblastos expresan pobremente el receptor SR-BI y cuando interactúan con rHDL, también puede ocurrir un mecanismo diferente con una internalización inespecífica. De acuerdo con los resultados, se observa que el sistema de transporte mediado por las rHDL y el mecanismo de interacción para depositar el contenido de $^{225}\text{Ac-DOTA}$ dentro de las células mediado por el receptor SRB-1 es más efectivo que el sistema utilizado sin encapsular, ya que a pesar de que también presenta internalización utilizando un fragmento altamente lipofílico (pBzSCN) en las líneas celulares, es importante internalizar una mayor cantidad del radionúclido Ac-225 para la consecuente producción de efectos citotóxicos dentro de las células tumorales evitando su escape a tejido no deseado.

La tabla 12 muestra el cálculo de la dosis absorbida de citoplasma al núcleo de las diferentes líneas celulares a diferentes tiempos después del tratamiento con el sistema $^{225}\text{Ac-rHDL}$. Se administró el tratamiento de $^{225}\text{Ac-rHDL}$ (4,0 kBq/pozo) (1×10^4 células/pozo) para cada línea celular. El valor utilizado como factor de dosis (DF) para los cálculos de dosis fue (DF α + DF β e, pH) Ac-225 ($n \leftarrow \text{Cy}$) = 8.96×10^{-2} Gy/Bq·s donde se consideraron los cuatro electrones alfa (e) y se consideraron las emisiones de fotones (pH) de los hijos producidos por cada transformación nuclear de Ac-225 (MIRDcell V2.1).

Tabla 12. Dosis media de radiación absorbida (Gy) desde el citoplasma al núcleo celular (n), considerando la actividad internalizada (Bq/Célula) respecto a la actividad total inicial administrada como tratamiento de ^{225}Ac -rHDL.

Tiempo (h)	Fibroblastos	PC-3	HEP-G2
	Dosis de radiación ($n \leftarrow Cy$)	Dosis de radiación ($D(n \leftarrow Cy)$)	Dosis de radiación ($D(n \leftarrow Cy)$)
3	0.5	14.0	20.7
24	3.9	107.3	161.4
48	8.1	208.2	312.2
192	23.8	682.5	1025.5
Actividad internalizada (Bq/célula)	0.0005	0.0144	0.0216

La dosis de radiación absorbida por el núcleo celular a las 192 h después del tratamiento con ^{225}Ac -rHDL fue de 1025.5 Gy (256.4 Gy por kBq administrado en el pozo) para HEP-G2 y 682.5 Gy (170.6 Gy por kBq administrado en el pozo) para PC-3, que es 43 y 29 veces mayor que en el caso de los fibroblastos, respectivamente. Por lo tanto, se demostró que el nanosistema ^{225}Ac -rHDL es capaz de administrar dosis de radiación para causar un efecto citotóxico significativo, como resultado de la capacidad de internalizar ^{225}Ac en la célula y los múltiples radionúclidos hijos emisores alfa generados dentro de la célula; es decir, el receptor SR-BI, expresado en células HEP-G2 y PC-3, interactúa con las lipoproteínas rHDL endógenas, lo que induce el depósito del contenido de rHDL (^{225}Ac) directamente en el citoplasma de las células. Una ventaja del sistema de radioterapia alfa, además de su alta especificidad atribuida a las rHDL, es que el elevado número de ionizaciones de trayectoria corta, que dañan la estructura del ADN, también inhiben los mecanismos de reparación celular. Por otro lado, también se observó una disminución del 20% en la viabilidad celular en fibroblastos con una dosis de 8.1 Gy a las 48 h después del tratamiento, lo que se puede atribuir a la radiosensibilidad que presentan los fibroblastos. De acuerdo con el cálculo de dosis absorbida al núcleo después de administrar el sistema ^{225}Ac -rHDL para el cual se considera de acuerdo con el Sistema MIRD la contribución de los hijos de la partícula alfa, se observa de igual manera una mayor dosis absorbida en las líneas celulares que sobre expresan en mayor proporción el receptor SRB-1 (HEP-G2 y PC-3 respectivamente), teniendo una dosis suficiente, para causar un efecto citotóxico en las células. Los resultados obtenidos se ven reflejados en el porcentaje de viabilidad de las líneas celulares (mencionados anteriormente) ya que en las líneas celulares HEP G-2 y PC-3 se obtuvo un bajo porcentaje de viabilidad celular a diferencia de los fibroblastos y se asocian también con la mayor internalización debida a la interacción de los receptores SR-B1 con el sistema, lo cual refleja que el Sistema ^{225}Ac -rHDL presenta una alta internalización y ejerce un efecto citotóxico

importante con dosis ablativas de radiación dentro de las células debido a las emisiones α producidas. Una ventaja del sistema además de su alta especificidad atribuida a las rHDL, es que al ser el núcleo más radiosensible a la radiación α que el citoplasma, se produce un daño directo a la estructura del DNA debido al mayor número de ionizaciones en las células tumorales en un trayecto más corto inhibiendo los mecanismos de reparación celular ya que la radiación ionizante induce la de-tención del ciclo celular en las fases S y G2/M con lo cual se puede inhibir la proliferación celular.

Estudio de biodistribución

El perfil de biodistribución en ratones sanos, tras la administración intravenosa del nanosistema $^{225}\text{Ac-rHDL}$, mostró una acumulación de actividad, principalmente en el hígado, con un valor de $40.4 \pm 2.12\%$ ID, pero con un aclaramiento relativamente rápido, alcanzando el $6.01 \pm 1.07\%$ ID a las 192 h (Tabla 13). La radiactividad en el hígado se elimina y excreta rápidamente debido a la eliminación metabólica de las HDL. Dado su tamaño nanométrico, la eliminación de $^{225}\text{Ac-rHDL}$ se produce tanto por vía hepatobiliar ($2.88 \pm 0.12\%$ ID a las 0.5 h en intestino) como renal ($4.85 \pm 0.89\%$ ID a las 0.5 h en riñón). La actividad obtenida en sangre a diferentes tiempos fue de $3.91 \pm 0.92\%$ ID/g y $1.97 \pm 0.81\%$ ID /g a las 0.5 h y a las 24 h, respectivamente. Debe tenerse en cuenta que el tiempo de eliminación de las rHDL en el plasma sanguíneo es relativamente prolongado debido a su naturaleza lipoproteica, esperando una circulación sanguínea prolongada de $^{225}\text{Ac-rHDL}$, lo que podría ser una ventaja en aplicaciones terapéuticas dado que el nanosistema puede producir una acumulación tumoral significativa de radiactividad antes de la eliminación del radiofármaco.

Tabla 13. Biodistribución del sistema $^{225}\text{Ac-rHDL}$ en ratones sanos (Balb-c) después de la administración intravenosa.

Tejido	Tiempo (h)						
	0.5	1	3	24	48	96	192
Higado	40.40 ± 2.12	31.87 ± 3.19	23.68 ± 1.13	18.27 ± 2.32	11.12 ± 2.21	8.42 ± 1.32	6.01 ± 1.07
Bazo	1.10 ± 0.20	1.30 ± 0.10	1.74 ± 0.24	1.61 ± 0.21	1.02 ± 0.09	0.92 ± 0.15	0.74 ± 0.08
Pulmón	1.02 ± 0.32	0.87 ± 0.21	0.54 ± 0.11	0.47 ± 0.10	0.21 ± 0.06	0.11 ± 0.08	0.04 ± 0.01
Riñones	4.85 ± 0.89	3.14 ± 0.47	2.63 ± 0.23	1.98 ± 0.82	1.23 ± 0.45	0.81 ± 0.28	0.32 ± 0.12
Intestino	2.88 ± 0.12	1.77 ± 0.92	1.25 ± 0.15	0.84 ± 0.31	0.81 ± 0.12	0.68 ± 0.10	0.42 ± 0.06
Corazón	0.50 ± 0.14	0.34 ± 0.09	0.21 ± 0.05	0.17 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.01

Como era de esperar, el tejido hepático capturó rHDL debido a su alta expresión de SR-BI. Estos resultados confirman la especificidad y el direccionamiento pasivo de los receptores SR-BI, así como su afinidad in vivo por las lipoproteínas rHDL a través de un proceso natural de captación y eliminación selectivas.

Este comportamiento es de particular importancia a la hora de demostrar que es posible minimizar la retención prolongada de ^{225}Ac -rHDL en órganos sanos, ya que, debido a la naturaleza de los radionúclidos hijos emisores alfa, se podría producir un daño elevado en los tejidos sanos.

Se realizó la biodistribución en ratones con tumores HEP-G2 inducidos para evaluar la actividad de captación tumoral en función del tiempo. El perfil de biodistribución del ^{225}Ac -rHDL, tras la administración intratumoral, muestra que la radiactividad del sistema queda retenida dentro de las masas tumorales (Figura 20), con una captación del $90.16 \pm 2.52\%$ a las 0.5 h, respecto a la actividad administrada inicialmente. Estos resultados confirman el potencial de ^{225}Ac -rHDL para producir un efecto citotóxico localizado. Se observó una acumulación baja de ^{225}Ac -rHDL en hígado (0.65 % ID a las 24 h), riñón (0.51 % ID a las 24 h) y bazo (0.34 % ID a las 24 h), lo que indica que el ^{225}Ac no se filtra in vivo desde el nanocápsula de rHDL, porque el actinio no quelado ($^{225}\text{Ac}^{3+}$) se acumula significativamente en el hígado.

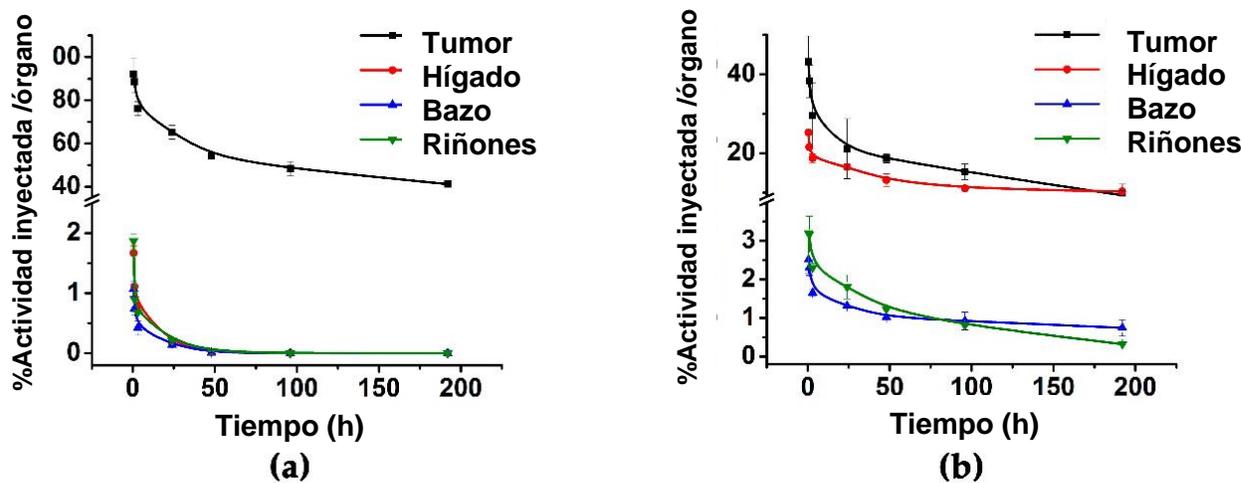


Figura 20. Perfil biocinético de: (a) Sistema ^{225}Ac -rHDL y (b) ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN después de la administración intratumoral en ratones con tumores inducidos con células HEP-G2.

Después de la administración intratumoral del tratamiento ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN en ratones desnudos que tenían tumores HEP-G2, se observó una eliminación muy rápida de la radiactividad del tumor y se observó una captación casi 10 veces mayor en el hígado y bazo respecto al patrón de biodistribución de ^{225}Ac -rHDL. Los resultados obtenidos sugieren que aunque el agente quelante DOTA es altamente estable para los radiometales trivalentes positivos, el ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN no permanece en el tumor debido a que la energía de retroceso de los hijos del ^{225}Ac (1000 veces mayor que la energía de enlace de cualquier compuesto químico) posiblemente pueda causar una ruptura de los enlaces químicos con la consecuente retención del $^{225}\text{Ac}^{3+}$ y su progenie en el hígado como formas iónicas. De acuerdo con los resultados obtenidos en la biodistribución realizada en ratones sanos y con tumores, es posible proponer el sistema ^{225}Ac -rHDL como un

nanoportador natural conveniente para el uso de ^{225}Ac en radioterapia dirigida, de manera segura y eficiente. En la tabla 14 se muestran los modelos biocinéticos del nanosistema ^{225}Ac -rHDL en tumores y órganos blanco.

Tabla 14. Modelos biocinéticos y dosis absorbida en diferentes órganos de ratones después de la administración intratumoral con ^{225}Ac -rHDL (1MBq).

Órgano	Modelo biocinético	$\int_0^{\infty} q_h(t) dt$ Tiempo biológico de residencia	$\int_0^{\infty} A_h(t) dt$ Desintegraciones totales	Dosis absorbida (Gy)
Tumor	$q_h(t) = 26.7e^{-0.542t} + 46.4e^{-0.0088t} + 26.2e^{-0.000039t}$ $A_h(t) = 26.7e^{-0.5449t} + 46.4e^{-0.0117t} + 26.2e^{-0.0029t}$	6772	130	649.20
Hígado	$q_h(t) = 0.979e^{-0.0784t} + 0.929e^{-1.66t} + 3.71e^{-4.88t}$ $A_h(t) = 0.979e^{-0.0813t} + 0.929e^{-1.6629t} + 3.71e^{-4.8829t}$	0.138	0.928	2.17
Riñones	$q_h(t) = 0.619e^{-0.0583t} + 0.193e^{-0.0582t} + 8.68e^{-4.16t}$ $A_h(t) = 0.619e^{-0.0612t} + 0.193e^{-0.0611t} + 8.68e^{-4.1629t}$	0.160	0.153	2.06
Bazo	$q_h(t) = 0.484e^{-0.0588t} + 1.27e^{-1.51t} + 0.884e^{-13.6t}$ $A_h(t) = 0.484e^{-0.0617t} + 1.27e^{-1.5129t} + 0.884e^{-13.6029t}$	0.091	0.087	3.18

Los resultados obtenidos en los modelos biocinéticos, muestran tanto el modelo biológico o farmacocinético ($q_h(t)$) como el modelo radiofarmacocinético ($A_h(t)$), este último asociado al número de transformaciones nucleares ocurridas en cada tejido (N) para el cálculo de la dosis de radiación absorbida.

La dosis más alta se presentó en el tumor (649 Gy), mientras que las dosis fueron bajas en los demás órganos lo que indica que la energía depositada por el ^{225}Ac produce dosis de radiación ablativas sobre las lesiones malignas diana, evitando efectos citotóxicos sobre los tejidos sanos.

Como se sabe, algunas de las propiedades clave del ^{225}Ac como radionúclido para la radioterapia alfa dirigida de micrometástasis son: (1) rango en tejido de unos pocos diámetros celulares, (2) alta transferencia de energía lineal, lo que conduce al daño directo del ADN (LET=100 KeV/ μm), (3) vida media de 10 días, que permite tiempo suficiente para la administración de la dosis y su unión y retención en las masas tumorales, (4) emisión de cuatro partículas alfa por transformación nuclear, por lo cual presenta mayores ventajas (principalmente para las micrometástasis) en comparación con los emisores beta que son los más utilizados actualmente, ya que a diferencia de los alfa (con un rango de 40-100 μm), presentan un rango mayor del orden de 0.05-12mm y un bajo LET de

0.2KeV/ μm , por lo cual en ocasiones se requieren de un mayor número de ciclos de tratamiento principalmente cuando hay una invasión por mi-crometástasis que son de difícil acceso y se requiere de un corto alcance para depositar una mayor cantidad de dosis ablativas. Otro aspecto importante, en estudios realizados es que el Ac-225 que ha sido utilizado en ensayos de citotoxicidad requiere de una dosis mucho más baja para alcanzar la DL_{50} principalmente debido a la emisión de las partículas alfa, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular reduciéndose a un 38 % después de las 24 h en las líneas celulares de hepatocarcinoma y cáncer de próstata.

Sin embargo, una de las principales dificultades que limita el uso del Ac-225 e impide aprovechar su potencial para su uso en la terapia es la inestabilidad que presenta en la energía de retroceso cuando inicia su cascada de decaimiento, ya que tiene la fuerza suficiente que se requiere para romper el enlace covalente del quelante al que se encuentra unido escapando así sus hijas fuera del tejido blanco. Para ello resulta importante la evaluación de un nano generador que permita quelar de forma estable al Ac-225 utilizando el DOTA que ha sido reportado su uso eficiente para ser utilizado con este radionúclido y adicional un vehículo que permita internalizar de manera específica al Ac-225 en la célula diana reteniendo la progenie dentro de la célula y aprovechar su potencial citotóxico en las células tumorales minimizando la citotoxicidad sistémica.

Las lipoproteínas de alta densidad sintéticas (rHDL) tienen características apropiadas que les permiten ser utilizadas como sistemas de entrega de compuestos altamente lipofílicos a un sitio blanco específico de manera eficiente, por lo cual han sido utilizados como vehículos de administración de fármacos y diferentes tipos de moléculas pequeñas como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos, ya que tienen propiedades fisicoquímicas iguales a las HDL nativas, por lo cual han sido utilizados como agentes de terapia y de imagen. Una de las principales funciones de las HDL nativas en el organismo como nanopartículas endógenas es el transporte y metabolismo ya que participa en el transporte inverso de colesterol para transportar el exceso de colesterol acumulado periféricamente al hígado para permitir su excreción o su almacenamiento en órganos como glándulas adrenales, ovarios testículos o para la formación posterior de hormonas esteroideas, además de que transporta eficientemente ésteres de colesterol que llegan de manera segura a su destino. De acuerdo con datos reportados, se ha encontrado que los receptores de las células que interaccionan con las HDL pueden desempeñar un papel importante en la capacidad proliferativa de las células cáncerosas y los tumores, como es el caso del receptor SR-B1 cuya principal función es la captación selectiva y salida de ésteres de colesterol derivados de las HDL endógenas. Este receptor se encuentra de manera normal en hígado, macrófagos, células adrenocorticales, entre otras y se ha

reportado que se encuentra sobreexpresado en varios tipos de células tumorales que utilizan el colesterol para su consecuente proliferación, por lo cual es posible utilizar esta ventaja para el uso de rHDL en diferentes tipos de cáncer donde se encuentra sobreexpresado éste receptor. La naturaleza selectiva del transporte de ésteres de colesterol sugiere la existencia de un “canal” no acuoso en el receptor SRB-1 que puede acomodar los ésteres de colesterol por lo cual el receptor puede unirse a las HDL y captar su contenido por el túnel interno presente. Los ensayos de internalización del sistema ^{225}Ac -rHDL demuestran que la interacción entre el receptor SR-B1 que se encuentra sobreexpresado en la línea celular HEPG-2 y en menor cantidad en la línea celular PC-3 se pudo haber llevado a cabo ya que presentan una alta internalización debido a la alta especificidad obtenida por este mecanismo de entrega a diferencia del sistema que no se encuentra encapsulado. También se ha podido observar en los estudios *in vitro* realizados, que una vez que se lleva a cabo la captación de las rHDL en la superficie de las células que presentan éste receptor, y que contienen en su interior el conjugado ^{225}Ac -DOTA-benceno-p-SCN, una disminución importante en su viabilidad celular después de las 24 horas de la administración del sistema, con lo cual se observa que las ionizaciones producidas por las partículas alfa son eficientes para causar un daño citotóxico con dosis ablativas de radiación adecuadas en el núcleo de la célula. Otro aspecto importante para considerar es que el ^{225}Ac requiere una actividad mucho menor para producir efectos citotóxicos a nivel celular con respecto a los emisores beta, debido a que su energía se deposita de manera extremadamente localizada. Además, las ^{225}Ac -rHDL tienen las propiedades fisicoquímicas y el tamaño apropiados para llegar al tejido tumoral y depositar localmente su contenido (^{225}Ac) dentro del citoplasma de las células tumorales, siendo un vehículo conveniente para la radioterapia dirigida con partículas alfa.

El perfil biocinético del sistema ^{225}Ac -rHDL es comparable a los informados para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-DA-rHDL, con respecto a la absorción y eliminación del tumor porque el mecanismo de administración es el mismo. Además, la acumulación de actividad en órganos que expresan SR-BI (principalmente hígado, bazo y riñones) es comparable.

En este estudio, el sistema ^{225}Ac -rHDL se preparó y evaluó como un posible agente radioterapéutico dirigido. Los resultados mostraron propiedades fisicoquímicas adecuadas del nanoportador rHDL para depositar específicamente ^{225}Ac en el citoplasma de las células cáncerosas HEP-G2 y PC-3 y producir un efecto citotóxico celular significativo. Los estudios de biodistribución de ^{225}Ac -rHDL en ratones sanos mostraron principalmente captación hepática con excreción hepatobiliar y renal sin una acumulación apreciable en otros tejidos, mientras que, en ratones portadores de tumores, el nanosistema ^{225}Ac -rHDL permaneció estable en los tumores y generó dosis de radiación ablativas.

Los resultados obtenidos en esta investigación justifican más estudios preclínicos diseñados para evaluar la eficacia terapéutica de ^{225}Ac -rHDL para la terapia dirigida con partículas alfa de tumores que sobreexpresan el receptor SR-BI.

7. RESULTADOS PARTE II

Síntesis y caracterización química

Se realizó el escalamiento de la síntesis de nanopartículas de sesquióxido de lutecio obteniendo 1 ± 0.3 g que fue utilizado para varios ciclos de irradiación. La ruta de síntesis empleada permitió la obtención de un doble carbonato como un precursor intermedio para la obtención de las nanopartículas de Lu_2O_3 . El análisis termogravimétrico realizado al doble carbonato obtenido en la primera fase de la síntesis previo a la calcinación $\text{Lu}(\text{OH})(\text{CO}_3) / \text{Lu}_2(\text{CO}_3)_3$ (Figura 21) muestra tres etapas principales de descomposición hasta llegar a la formación del óxido. Se observa el proceso de deshidratación, descarboxilación parcial y descarboxilación total del precursor cuando se convierte en óxido. Se obtuvo una pérdida de masa total del 26.98 % que corresponde con lo reportado previamente, donde el proceso de calcinación ocurre por encima de 600°C .

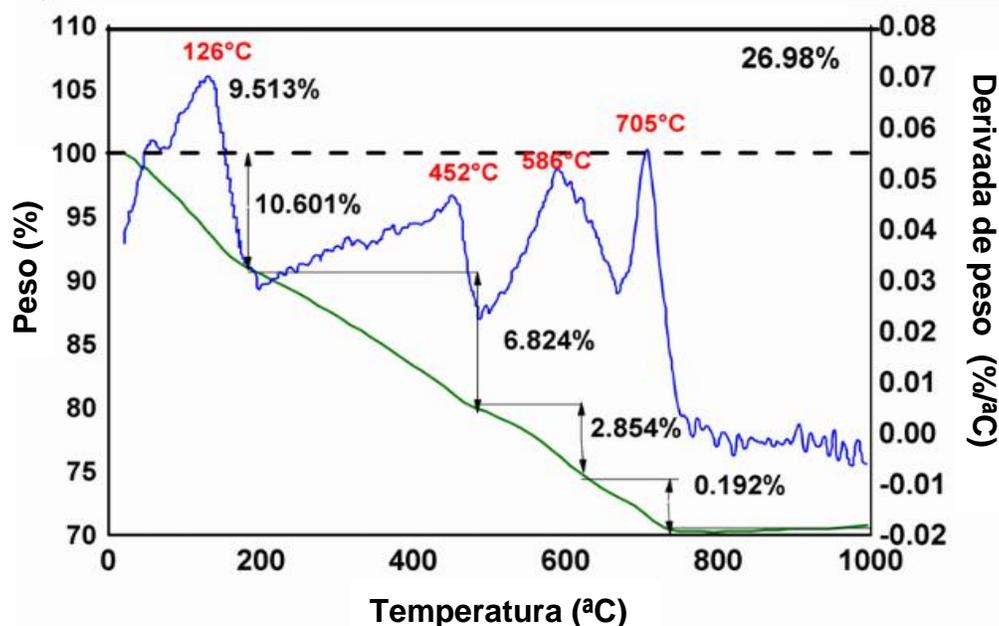


Figura 21. Análisis de $\text{Lu}(\text{OH})(\text{CO}_2)$ por termogravimetría- calorimetría diferencial de barrido.

Por otra parte en la figura 22 se observa el patrón de difracción de la muestra obtenida después del proceso de calcinación a 1000°C . Todos los picos de difracción pueden indicar directamente a la fase cúbica de Lu_2O_3 en el grupo espacial Ia_3 (206) (JCPDS No. 43-1021). Los valores de picos con mayor intensidad para el óxido obtenido a 2θ , fueron de 20.749° (211), 29.925° (222), 32.208°

(123), 34.495° (400), 36.666° (411), 40.701° (332), 44.416° (134), 47.918° (521), 49.593° (440), 51.226° (433), 54.389° (611), 57.433° (145), 58.913° (622), 60.376° (136), 61.813° (444), 72.753° (800), 74.072° (811) y 80.531° (662). El espectro de XRD obtenido muestra picos bien definidos y no se observan impurezas, lo cual indica que la muestra obtenida es de alta pureza y propiedades cristalinas adecuadas. En la imagen obtenida por microscopia electrónica de barrido a 500 nm, se observa una morfología homogénea en la muestra analizada. Las nanopartículas de Lu_2O_3 fueron examinadas mediante microscopia electrónica de transmisión, en la cual se evidenció la presencia de partículas con una distribución uniforme y homogénea (Figura 22).

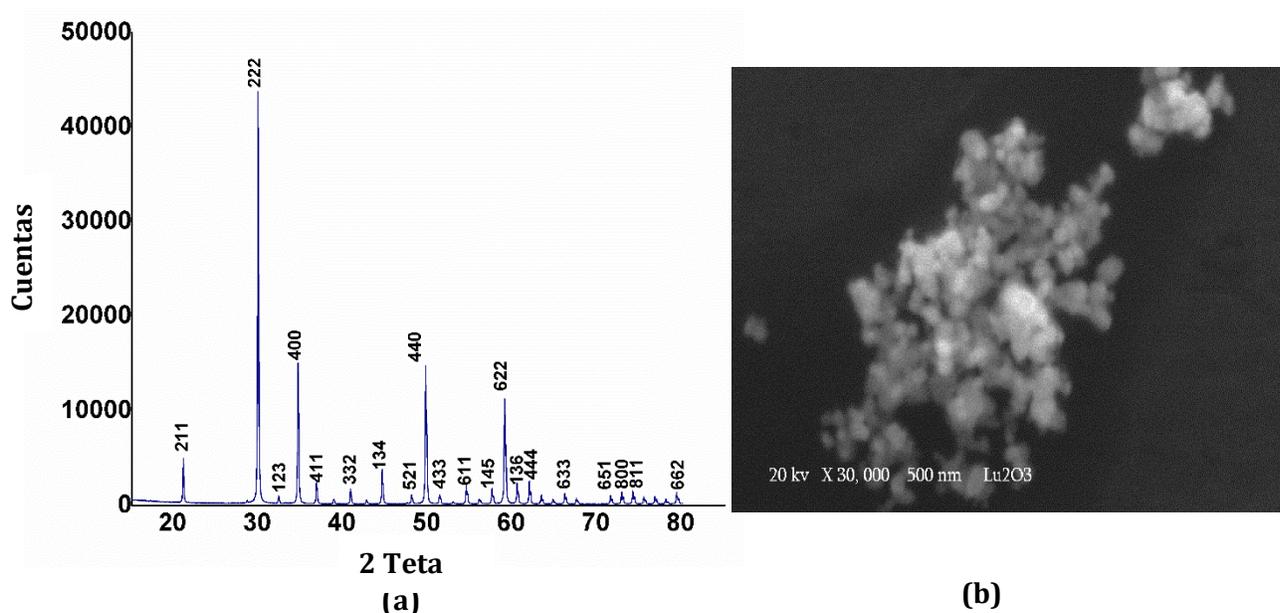


Figura 22. (a) Análisis de nanopartículas de Lu_2O_3 por difracción de rayos X (XRD), (b) Análisis de nanopartículas por microscopia electrónica de barrido.

Los espectros FT-IR, DLS y TEM de las nanopartículas de lutecio analizadas antes y después de ser irradiadas y preparadas en condiciones BPF indicaron que la morfología, el tamaño y la composición química del nanosistema Lu-iFAP/iPSMA permanecieron estables como formulación farmacéutica. La figura 23 muestra las características químicas de las nanopartículas formuladas. La Figura 23a compara el espectro IR del nanosistema Lu-iFAP/iPSMA con respecto a las materias primas empleadas: 1) espectro infrarrojo de nanopartículas de óxido de lutecio (Figura 23-a1), donde una banda estrecha e intensa a 574 cm^{-1} de la vibración Lu-O fue indicativa del tamaño nanométrico, la pureza cristalina y la adecuada cristalización del nanomaterial; y 2) espectros infrarrojos de los ligandos dirigidos iFAP (Figura 23-a2) e iPSMA (Figura 23-a3). En La tabla 15 se presenta un resumen de las bandas principales de los espectros FT-IR.

Tabla 15. Resumen de las bandas principales observadas en los espectros FT-IR de Lu₂O₃ DOTA-iFAP, DOTA-iPSMA y Lu-iFAP/iPSMA

Lu₂O₃	DOTA-HYNIC-iFAP	DOTA-HYNIC-iPSMA	Lu-iFAP/iPSMA
-	3364	3287	3298
-	3252	2938	2982
-	2892	2863	2245
-	2614	2537	-
-	1665	1652	-
-	1553	1551	1569
-	1407	1442-1347	-
-	1347-1201	1321-1133	1392-1263-1139
-	935	967-830	1079-912-896
-	652	720-621	-
574	549	479	574

En el espectro iFAP (Figura 23-a2), la vibración $\nu(-NH)$ del anillo de piridina se observó a 3364 cm^{-1} . La vibración $\nu_s(-OH)$ del ácido borónico se detectó a 3252 cm^{-1} , así como $(-NH)$ de la hidracina. Otra banda de ácido borónico asociada con la vibración B-O se encontró en 1442 cm^{-1} . Las vibraciones asimétricas y simétricas del grupo $-CH(CH_3)$ se asignaron a 2892 cm^{-1} y 2828 cm^{-1} , respectivamente. La banda vibratoria $\nu(C=O)$, presente en los ácidos carboxílicos del DOTA y la amida terciaria, se observó a 1651 cm^{-1} . La vibración de estiramiento del anillo aromático (C-H) se detectó a 3034 cm^{-1} . Las vibraciones fuera del plano para el mismo grupo fueron asignadas en la región de 1206 cm^{-1} a 1142 cm^{-1} y de 923 cm^{-1} a 634 cm^{-1} , respectivamente. Finalmente, los grupos C-N y C-N-H de las amidas II presentaron una banda vibratoria entre 1412 y 1337 cm^{-1} . Con respecto al espectro de ligandos de iPSMA (Figura 23-a3), se asignó una banda ancha de 3284 cm^{-1} a $\nu_s(-NH)$ y $\nu_s(-OH)$. Las vibraciones asimétricas y simétricas de $(-CH_2)$ se observaron a 2987 cm^{-1} y 2923 cm^{-1} , respectivamente. A 2537 cm^{-1} y 1652 cm^{-1} , se encontraron las vibraciones $\nu(-OH)$ y $\nu(C=O)$ de $-COOH$ de DOTA. La banda observada a 1551 cm^{-1} se correlacionó con el $\nu(-CN)$ de la urea de iPSMA y con la vibración $\nu(-NH)$ de las amidas II. Entre 1442 cm^{-1} y 1347 cm^{-1} se encontraron las vibraciones de los grupos $-NH$, $C=CC$ y $C-N$. Además, las vibraciones C-N-C de la estructura DOTA ocurrieron a 1257 cm^{-1} y 1149 cm^{-1} .

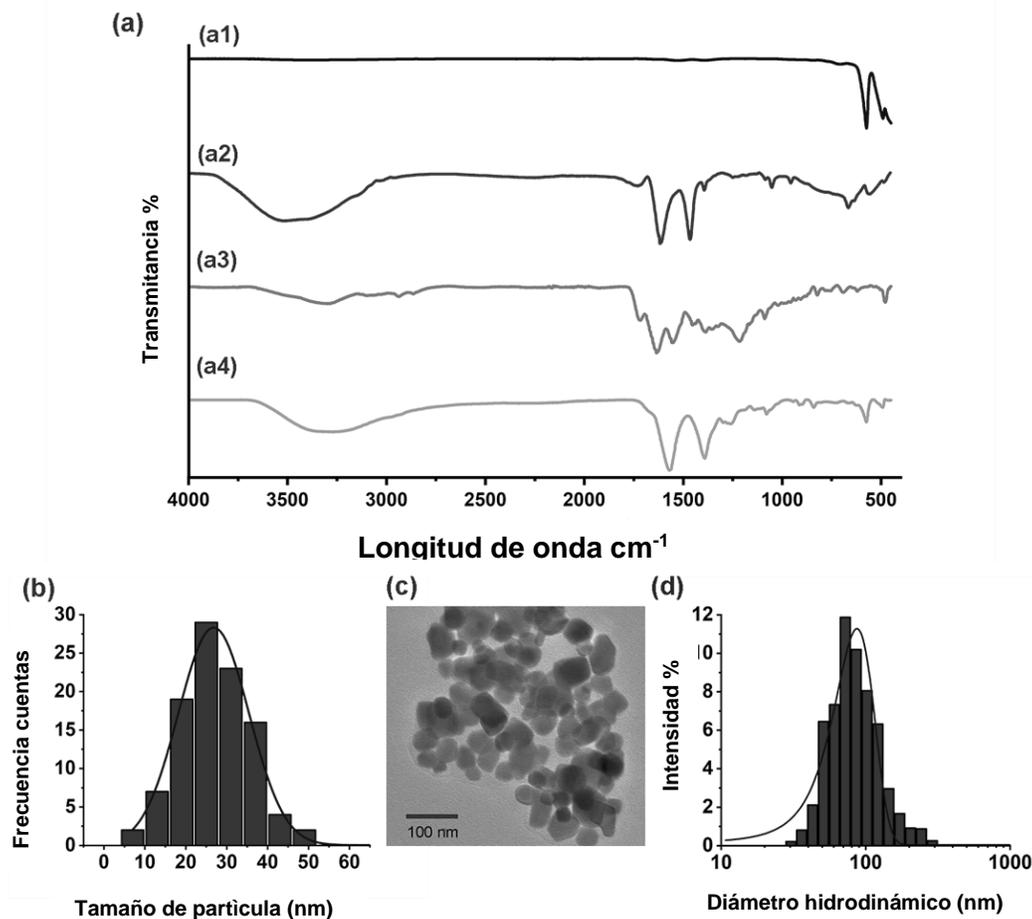


Figura 23. Caracterización química de las nanopartículas $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP/iPSMA formuladas bajo condiciones de buenas prácticas de fabricación (evaluación después del decaimiento total de ^{177}Lu): (a) Espectro FT-IR: (a1) nanopartículas de Lu_2O_3 , (a2) iFAP, (a3) iPSMA y (a4) Lu-iFAP/iPSMA; (b) distribución de tamaño de Lu-iFAP/iPSMA por TEM, (c) micrografía de TEM de Lu-iFAP/iPSMA; (d) distribución del tamaño de Lu-iFAP/iPSMA por DLS (diámetro hidrodinámico).

El espectro infrarrojo de las nanopartículas Lu-iFAP/iPSMA (Figura 23-a4) evidenció los cambios en el ambiente químico debido a la interacción entre las moléculas del ligando y la superficie de las nanopartículas. Primero, a 3284 cm^{-1} , se observó una banda asignada a las vibraciones $\nu_s(-\text{NH})$ y $\nu_s(-\text{OH})$ de iPSMA, así como a la vibración $\nu(-\text{NH})$ del anillo de piridina iFAP. Dicha banda es más ancha con respecto a las bandas presentes en los ligandos iFAP e iPSMA libres. En la región de 2422 cm^{-1} a 2148 cm^{-1} se observó una superposición de bandas de los grupos asignados para ambos ligandos. Las vibraciones asimétricas y simétricas de las cadenas alifáticas de ambas moléculas presentaron bandas en 2978 cm^{-1} y 2923 cm^{-1} . La banda ubicada en 1389 cm^{-1} corroboró la presencia de iFAP en la superficie de las nanopartículas, ya que fue asignada a la vibración B-O del ácido borónico. La presencia de iPSMA se confirmó con la banda de 1570 cm^{-1} , asociada al grupo $\nu(-\text{CN})$ urea.

Además, la funcionalización de nanopartículas con ambos ligandos inhibidores se demostró con los cambios a menor energía ($\sim 80\text{ cm}^{-1}$) de $\nu(\text{-COOH})$ de DOTA debido a su interacción con el catión Lu^{3+} (Figura 23 a3). Asimismo, la interacción Lu-N se encontró en 1257 cm^{-1} , la cual se desplazó con respecto a la banda en 1321 cm^{-1} de las aminas terciarias libres en el resto DOTA de iFAP e iPSMA. Ambos desplazamientos de energía fueron evidencia de la formación coordinada de enlaces covalentes entre los cationes Lu^{3+} en la superficie de las nanopartículas y el quelante DOTA de iFAP e iPSMA (Figura 23 a3). Finalmente, la banda vibracional de estiramiento Lu-O, asociada a la estructura interna de las nanopartículas, se observó a 574 cm^{-1} . La banda vibratoria Lu-O también confirma que la formación del complejo de coordinación final se llevó a cabo por la interacción química entre Lu^{3+} y los pares de electrones de los nitrógenos ($-\text{NH}$) y oxígenos ($-\text{OH}$) de DOTA.

Las micrografías TEM (Figura 23c) mostraron una morfología esférica con distribución uniforme y homogénea de las nanopartículas. El diámetro promedio obtenido de las mediciones de ~ 600 partículas con el programa ImageJ fue de $23.4 \pm 7.9\text{ nm}$ con una distribución monomodal y monodispersa (Figura 23b); estos resultados corroboraron la formación y estabilidad de las nanopartículas de lutecio, de acuerdo con nuestros informes anteriores. Con el valor promedio del tamaño de nanopartícula, y utilizando los parámetros reportados para la celda cristalina del nanomaterial (grupo espacial cúbico centrado en el cuerpo $\text{Ia}\bar{3}$, $a \approx 10.36\text{ \AA}$ y $z = 16$), el número de sitios de unión (Lu^{3+}) en se calculó la superficie de las nanopartículas de Lu_2O_3 . Se consideró que la celda unitaria cúbica está compuesta por 80 iones, de los cuales 48 corresponden al anión O_2^- , mientras que los 32 restantes representan los cationes Lu^{3+} ubicados en sitios posibles C2 y C3i (~ 8 cationes de Lu^{3+} disponibles por cara, considerando que los ubicados en las aristas y vértices cúbicos están disponibles en dos o tres caras).

El volumen de cada celda unitaria cúbica se calculó como 112.48 nm^3 (a^3). El tamaño medio de una nanopartícula de Lu_2O_3 (23.4 nm de diámetro) representa un volumen de 6709 nm^3 , lo que indica que aproximadamente 60 unidades de células (1.33×10^{-22} moléculas de $\text{Lu}_2\text{O}_3/\text{célula}$) forman una nanopartícula de Lu_2O_3 . Asimismo, el área superficial de una nanopartícula se calculó como 1720 nm^2 , donde 159 caras ($\text{a}^2 = 10.8\text{ nm}^2/\text{cara}$) de células unitarias cúbicas podrían ubicarse como sitios disponibles para unir ligandos iFAP e iPSMA a través de su fracción DOTA. Usando el peso molecular de Lu_2O_3 y el número de Avogadro, el valor estimado de la masa de una nanopartícula de Lu_2O_3 fue $5.3 \times 10^{-20}\text{ g}$. Así, se calculó el número total de nanopartículas y cationes Lu^{3+} disponibles en la superficie de las nanopartículas de sesquióxido de lutecio (12 mg), lo que correspondió a 3.5×10^{15} nanopartículas Lu_2O_3 y 4.5×10^{18} cationes Lu^{3+} en las superficies. (1272 cationes de $\text{Lu}^{3+}/\text{superficie}$ de nanopartícula). Estos valores indicaron que cada nanopartícula podría

funcionalizarse fácilmente en su superficie con ocho moléculas iFAP (2.8×10^{16} moléculas agregadas a la formulación que contiene 12 mg de nanopartículas de Lu_2O_3) y ocho moléculas iPSMA (2.8×10^{16} moléculas añadido a la formulación). Por lo tanto, no se produjo ningún impedimento estérico debido al tamaño molecular de iFAP e iPSMA (de 2 a 3 nm). Además, el quelante DOTA de ambas moléculas tiene la misma probabilidad de complejarse con los cationes Lu^{+3} disponibles (Figura 24).

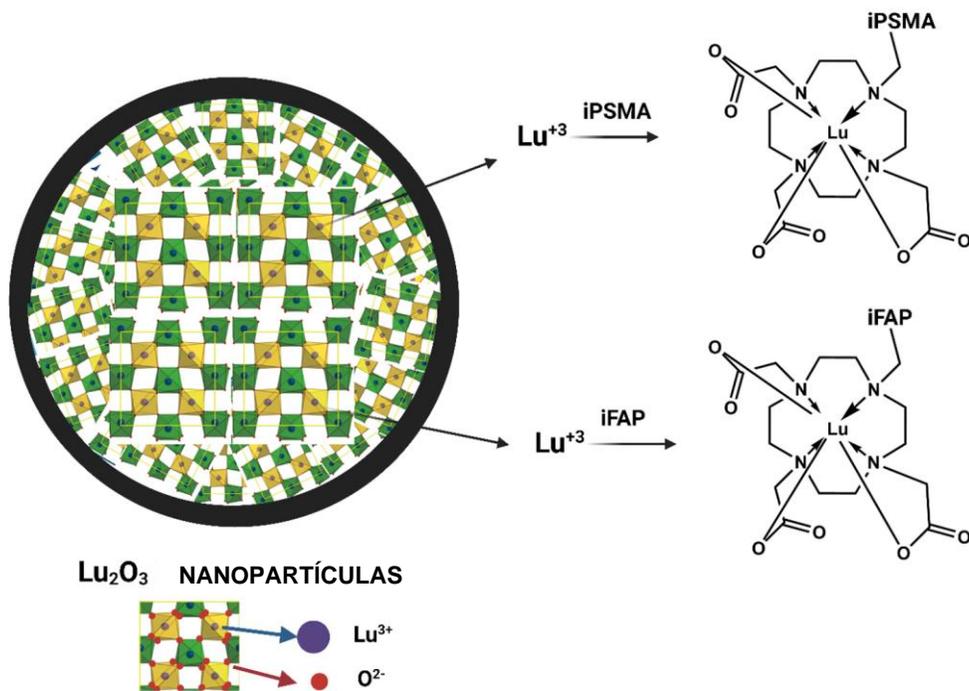


Figura 24. Estructura esquemática de los complejos producidos Lu-DOTA-iPSMA/iFAP en la superficie de las nanopartículas de sesquióxido de lutecio.

Por otro lado, el diámetro hidrodinámico obtenido por DLS fue de $95 \text{ nm} \pm 22 \text{ nm}$, con una distribución monomodal y monodispersa (Fig. 23d) y un valor de potencial Zeta de -29 mV , lo que también indicó una adecuada estabilidad coloidal.

Los resultados del control de calidad de tres lotes indicaron que se produjeron nanopartículas de $^{177}\text{Lu}[\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}]$ con características farmacéuticas apropiadas de manera reproducible (Tabla 16).

Preparación y evaluación in vitro e in vivo de nanocápsulas de rHDL marcadas con $^{225}\text{AcCl}_3$: comparación con nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ para radioterapia dirigida

Tabla 16. Resultados analíticos de las pruebas de control de calidad de las nanopartículas del sistema ^{177}Lu Lu $_2$ O $_3$ -iFAP/iPSMA producidas bajo buenas prácticas de fabricación (resultados de 3 lotes).

Ensayo	Especificación	Método	Resultados
Actividad por vial	3.40 ± 0.20 GBq	Cámara de ionización	3.45 ± 0.10 GBq
Concentración radiactiva	170 ± 8 MBq/mL	Cámara de ionización	170 ± 5 MBq/mL
Actividad específica	≥ 0.8 GBq/mg Lu	Cámara de ionización	0.86 ± 0.4 GBq/mg
Identidad de ^{177}Lu	Picos principales de emission $E_\gamma=113\text{ keV};$ 208 keV	Espectrometría gamma	Complies
Pureza radionuclídica: ^{177m}Lu	≤ 0.02%	Espectrometría gamma	0.009± 0.001%
Otras impurezas	≤ 0.01%		≤ 0.004%
Pureza Química	Co,Ni ≤ 0.1µg/GBq Cu,Pb ≤ 0.5µg/GBq Fe, Zn ≤ 1.0µg/GBq	ICP-MS/ Cámara de ionización	Co, Cu < 0.001 µg/GBq Fe, Ni < 0.003 µg /GBq Pb < 0.004 µg /GBq Zn < 0.028 µg /GBq
Contenido de lutecio	80-120 mg/L	TXRF	102 ± 21 mg/L
Determinación de pH	6 ± 1	Tiras indicadoras de pH	6
Pureza Radioquímica	>98%	Ultracentrifugación	>99%
Esterilidad	Estéril	Ensayo de esterilidad	Estéril
Endotoxinas bacterianas	< 20EU/mL	Ensayo de endotoxinas bacterianas	Cumple

Evaluación histopatológica e inmunohistoquímica

Se evaluó la citotoxicidad de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA en un modelo de macrófagos (células inmunitarias humanas U-937), debido a que las células de Kupfer y los macrófagos esplénicos son entidades celulares que mayoritariamente acumulan nanopartículas tanto en tejidos sanos como en tumores. Debido al alta radiorresistencia de los macrófagos, los resultados revelaron que su viabilidad no se vio afectada de manera irreversible por el tratamiento con radionanopartículas (Figura 25a), en comparación con el comportamiento de las células de cáncer colorrectal HCT116 (Figura 25b). Además, la cinética de la captación de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA por U-937 y células de cáncer colorrectal en un cocultivo también demostró que los macrófagos son los que en su mayoría captan nanopartículas con el tiempo; y que su viabilidad no solo no se vio afectada por procesos celulares líticos o apoptóticos inducidos por radiación o nanopartículas, sino que también se incrementó su proliferación (Figura 25c), las flechas amarillas apuntan a las células de cáncer colorrectal (tendencia a la forma ovalada). Las flechas blancas indican macrófagos (más prominentes y redondos que las células cáncerosas). Cabe destacar la importante presencia de agrupaciones de nanopartículas asociadas al citoplasma de los macrófagos, cuya acumulación aumenta notablemente con el tiempo en paralelo con la proliferación de los macrófagos ($p < 0.05$).

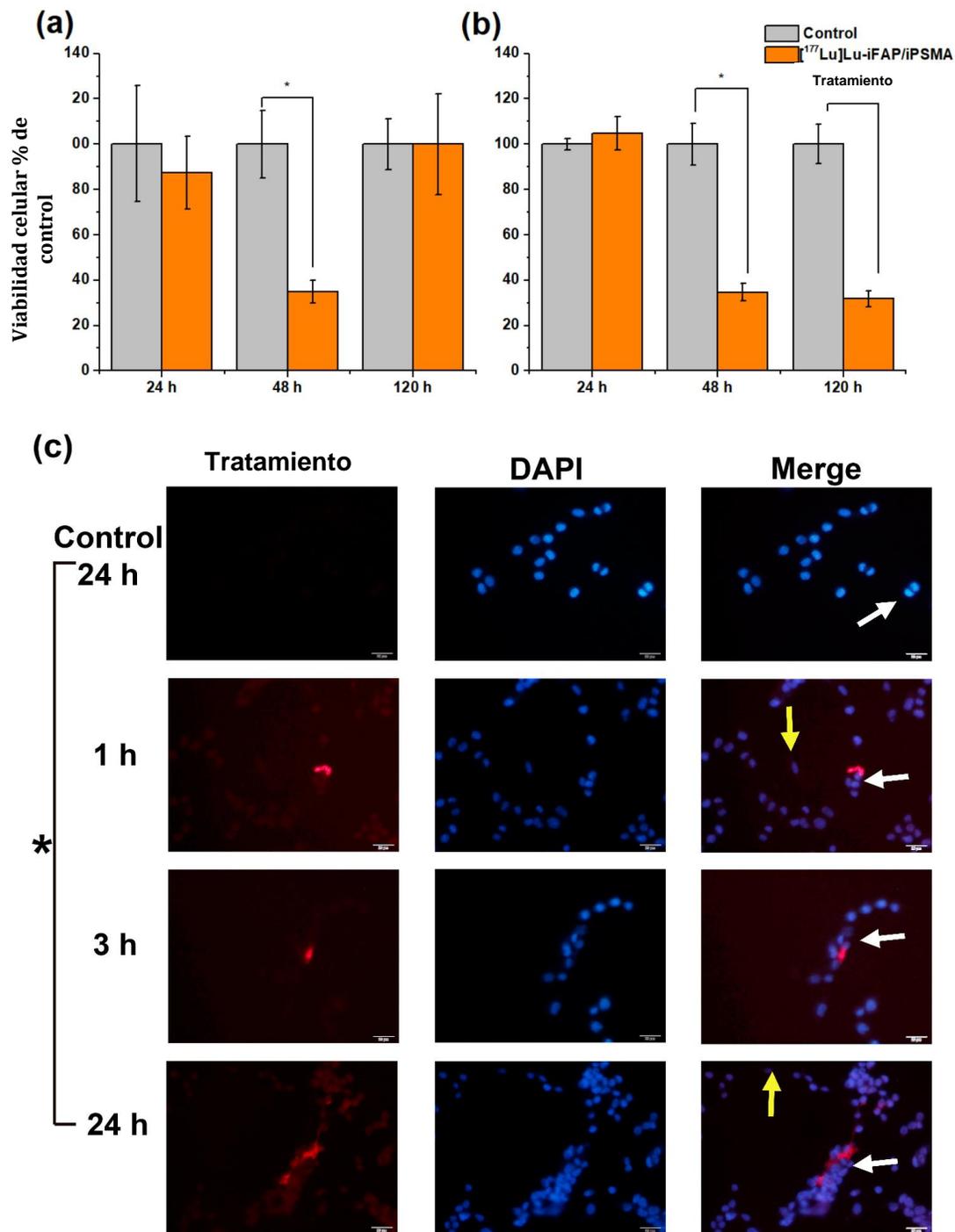


Figura 25. Viabilidad celular de: (a) macrófagos U-937 y (b) Células de cáncer colorrectal HCT116 expuestas a las nanopartículas de ^{177}Lu por 24, 48 y 120 h (barra naranja). Las células no tratadas fueron consideradas como grupo control (barra gris). (c) Micrografías de fluorescencia representativas (400x) de cocultivo de células de cáncer colorrectal y células inmunitarias de macrófagos. El cocultivo se trató con nanopartículas de ^{177}Lu durante 1.3 y 24 h.

La toxicidad de las nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA se evaluó *in vivo* en ratones nu portadores de tumores de xenoinjerto de cáncer colorrectal subcutáneo. La tasa de crecimiento del tumor en los ratones tratados con el sistema ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA fue significativamente menor que en el grupo de control ($p < 0,05$) (Figura 26a). Además, la progresión del tumor se evaluó utilizando biomarcadores de proliferación celular (Ki67) y malignidad (pEGFR). El análisis inmunohistoquímico de la expresión de ambos marcadores mostró que el tratamiento con ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA reduce la proliferación de células tumorales colorrectales (Figura 26b). Por el contrario, ambos biomarcadores aumentaron significativamente en los tumores de control (Figura 26b). En las imágenes se puede observar una disminución significativa en el volumen relativo del tumor en ratones tratados con nanopartículas en comparación con el grupo control, de igual forma se puede observar el efecto significativo del sistema ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA en la disminución de la proliferación de células tumorales con respecto al grupo control (diferencia estadísticamente significativa $p < 0,05$).

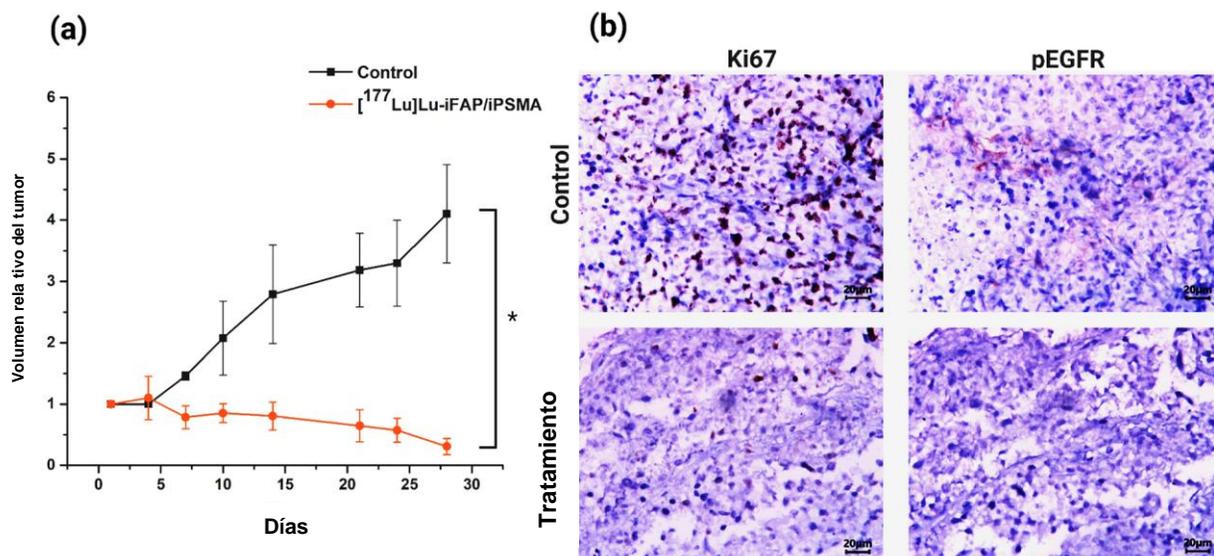


Figura 26. (a) Efecto del tratamiento con ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA en tumores de xenoinjerto de cáncer colorrectal HCT116 en ratones nu/un. (b) Micrografías de luz representativas (aumento 400x) de tinción inmunohistoquímica (color marrón oscuro) para marcadores de proliferación celular Ki67 y Pegfr en tumores de xenoinjerto de cáncer colorrectal.

El análisis histológico (tinción H&E) de tejidos de cerebro, pulmón, riñón y ovario de ratones tratados con ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA y de control no evidenció toxicidad tisular (Figura 27). Como se informó anteriormente, los perfiles biocinéticos de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP y ^{177}Lu Lu₂O₃-iPSMA mostraron que el hígado es el órgano con mayor acumulación de nanopartículas, seguido del bazo, aunque con quince veces menos captación que el hígado. El mismo comportamiento se observó en los resultados histológicos de esta investigación ya que los cúmulos de nanopartículas solo se

observaron en el hígado y el bazo de los ratones tratados, pero sin inducir toxicidad tisular (Figura 27). Un análisis detallado de la histología del hígado mostró que tanto en los grupos tratados como en los de control, los hepatocitos se mostraban en placas, algunos de los cuales tenían signos degenerativos menores. Se apreció el típico vaso sanguíneo hepático que contiene eritrocitos y pequeños leucocitos.

El análisis histológico (tinción H&E) de tejidos de cerebro, pulmón, riñón y ovario de ratones tratados con ^{177}Lu -iFAP/iPSMA y de control no evidenció toxicidad tisular (Figura 27). Como se informó anteriormente, los perfiles biocinéticos de ^{177}Lu -iFAP y ^{177}Lu -iPSMA mostraron que el hígado es el órgano con mayor acumulación de nanopartículas, seguido del bazo, aunque con quince veces menos captación que el hígado. El mismo comportamiento se observó en los resultados histológicos de esta investigación ya que los cúmulos de nanopartículas solo se observaron en el hígado y el bazo de los ratones tratados, pero sin inducir toxicidad tisular (Figura 27). Un análisis detallado de la histología del hígado mostró que tanto en los grupos tratados como en los de control, los hepatocitos se mostraban en placas, algunos de los cuales tenían signos degenerativos menores. Se apreció el vaso sanguíneo hepático normal que contiene eritrocitos y pequeños leucocitos. Es importante mencionar que no se encontró citotoxicidad tisular ni en los ratones tratados ni en los de control.

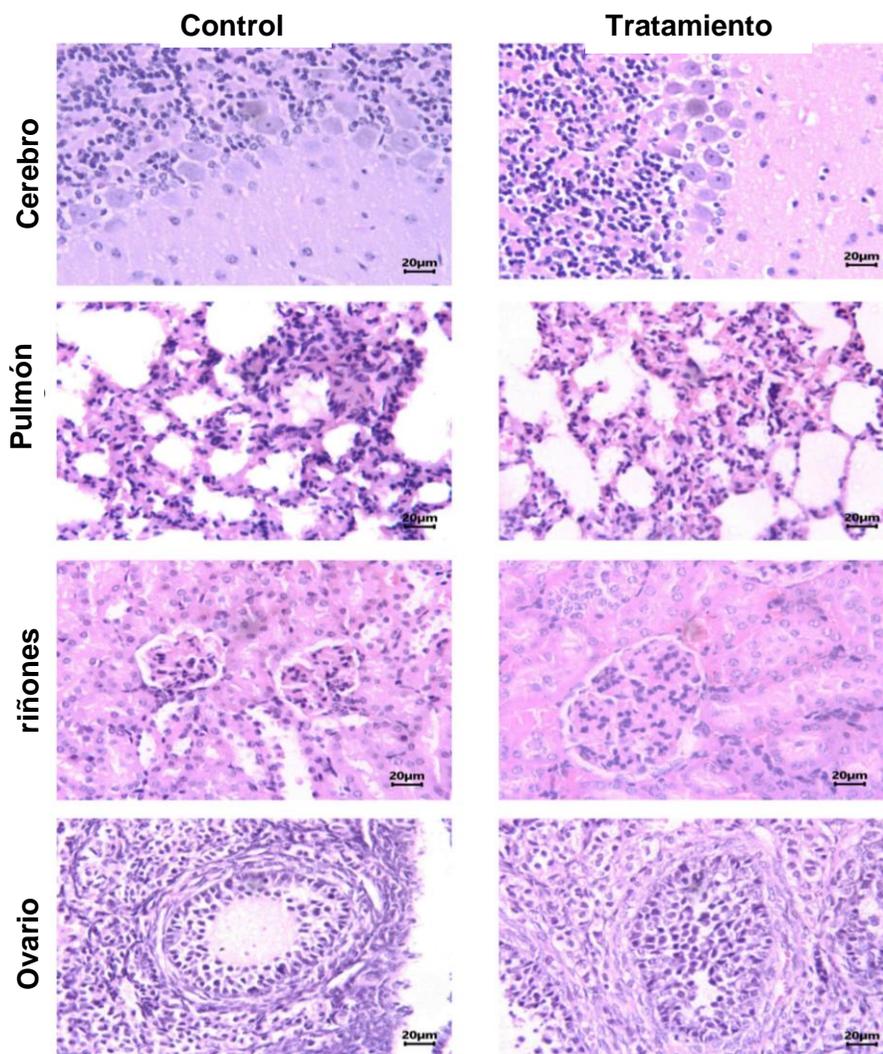


Figura 27. Análisis histológico (tinción H&E). Micrografías ópticas de secciones representativas con un aumento de 400 x de tejidos de cerebro, pulmón, riñón y ovario de ratones tratados con $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP/iPSMA y sin tratar (control).

El hígado de los ratones tratados con nanopartículas de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP/iPSMA no mostró anomalías histopatológicas. No se observaron granulomas ni hemorragias, únicamente se observó una ligera infiltración linfocitaria (principalmente células de Kupffer). Los grupos de nanopartículas en los ratones tratados no se encontraron en las células endoteliales del parénquima hepático, pero se observaron cerca de los vasos sanguíneos y en las células de Kupffer (Figura 28). En las micrografías de bazo no se observaron cúmulos de nanopartículas en la pulpa roja esplénica (eritrocitos y linfocitos) ni células endoteliales pero sí en macrófagos (Figura 28). En las imágenes obtenidas se observa la presencia de nanopartículas, especialmente dentro de los macrófagos (flechas verdes).

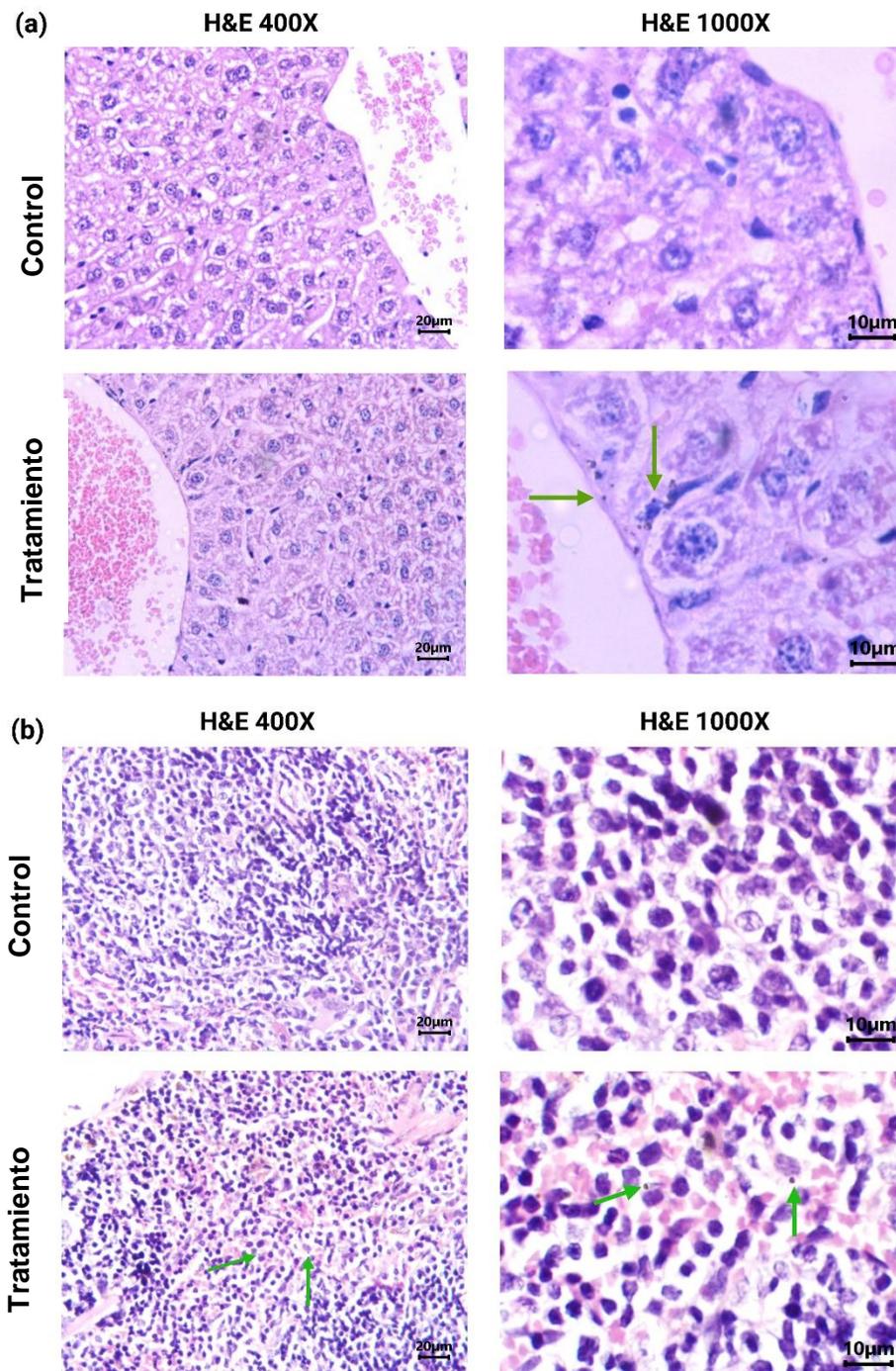


Figura 28. Análisis histológico (tinción H&E) (micrografías de luz): (a) Secciones representativas con aumentos de 400x y 1000x de hígado de ratones tratados con ^{177}Lu Lu $_2$ O $_3$ -iFAP/iPSMA y de control; (b) Secciones representativas con un aumento de 400x y 1000x del bazo de ratones tratados con ^{177}Lu Lu $_2$ O $_3$ -iFAP/iPSMA y de control.

Por el contrario, se observaron abundantemente grupos de nanopartículas de ^{177}Lu Lu $_2$ O $_3$ -iFAP/iPSMA en el estroma tumoral (incluida la neovascularización tumoral), fibroblastos asociados al cáncer y células tumorales, pero no se encontraron en las células endoteliales (Figura 29). Además,

el sistema de nanopartículas de $^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}$ indujo necrosis tumoral. Los resultados obtenidos se pueden correlacionar con los tres principales mecanismos de captación tumoral selectiva asociados a las nanopartículas: 1) alta captación en el estroma tumoral debido al efecto de mayor permeabilidad y retención (EPR) (un mecanismo pasivo), 2) expresión de FAP en fibroblastos, y 3) expresión de PSMA en células cáncerosas y neovascularización tumoral; que involucra mecanismos activos mediados por receptores presentes en el estroma tumoral que reconocen ligandos iFAP e iPSMA unidos a la superficie de las nanopartículas. Estos resultados fueron confirmados por la evaluación inmunohistoquímica, que reveló la expresión de FAP⁺ y PSMA⁺ en células de cáncer colorrectal de tumores de xenoinjerto (Figura 28). En la figura 28 se observan las micrografías de luz que fueron obtenidas de secciones representativas con un aumento de 400x y 1000x de tumores HCT116 de ratones tratados con $^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}$ y no tratados (control). Los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) se pueden observar en el estroma tumoral (TS) (flecha azul). Es importante mencionar que las nanopartículas de $^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3\text{-iFAP/iPSMA}$ fueron observadas en TS (flecha roja), en CAF (flecha verde) y en células tumorales (TC) (flecha negra), pero no se encuentran en las células endoteliales (EC). También se muestra la expresión de PSMA y FAP en tumores HCT116 (color marrón oscuro) (aumento de 200x) (resultados de inmunohistopatología).

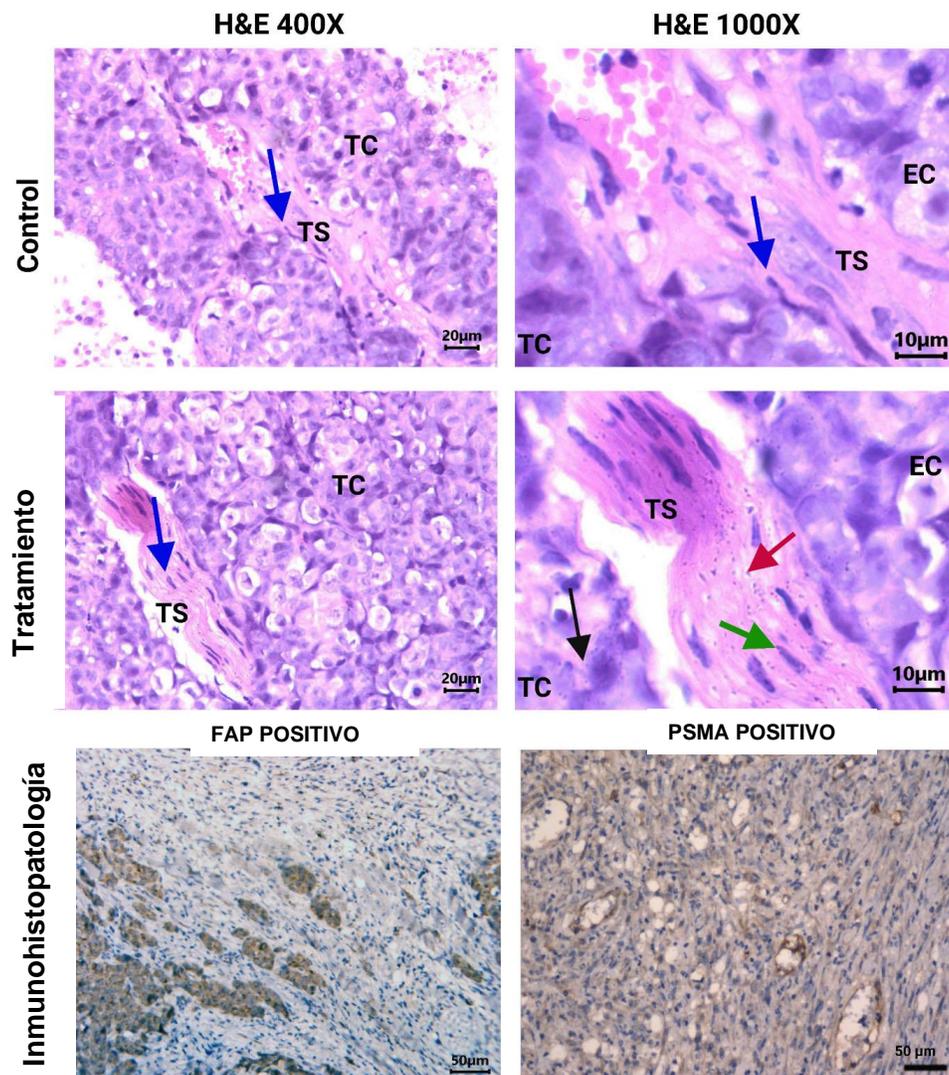


Figura 29. Análisis histopatológico (tinción H&E) de secciones representativas con un aumento de 400x y 1000x de tumores HCT1116 de ratones tratados con de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP/iPSMA y no tratados (control).

Por otra parte, los valores séricos de creatinina, ALT, AST, LDH y CK de 0.19 ± 0.04 mg/dL, 68 ± 7 IU/L, 130 ± 12 IU/L, 291 ± 32 IU/L y 120 ± 13 IU/L, respectivamente, obtenidos después del tratamiento con nanopartículas de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP/iPSMA en ratones (sin diferencias significativas entre los valores en sangre de los ratones de control: $p > 0.05$), también confirmaron la ausencia de lesión en el tejido sano. En la figura 30a se observan micrografías ópticas de células de médula ósea de ratones sanos a las 24, 48 y 168 h después de la administración de nanopartículas de $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP/iPSMA (tratamiento); colchicina (1mg/kg)(control positivo); y ratones no tratados (control negativo). Las flechas verdes muestran eritrocitos policromáticos inmaduros y las flechas rojas indican eritrocitos policromáticos (PCE) con micronúcleos. En la figura 30b se observan los valores de recuento de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea inmadura en 1, 2 y

7 días. Los datos se presentan como media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes ya que no se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre control y tratamiento a los 7 días.

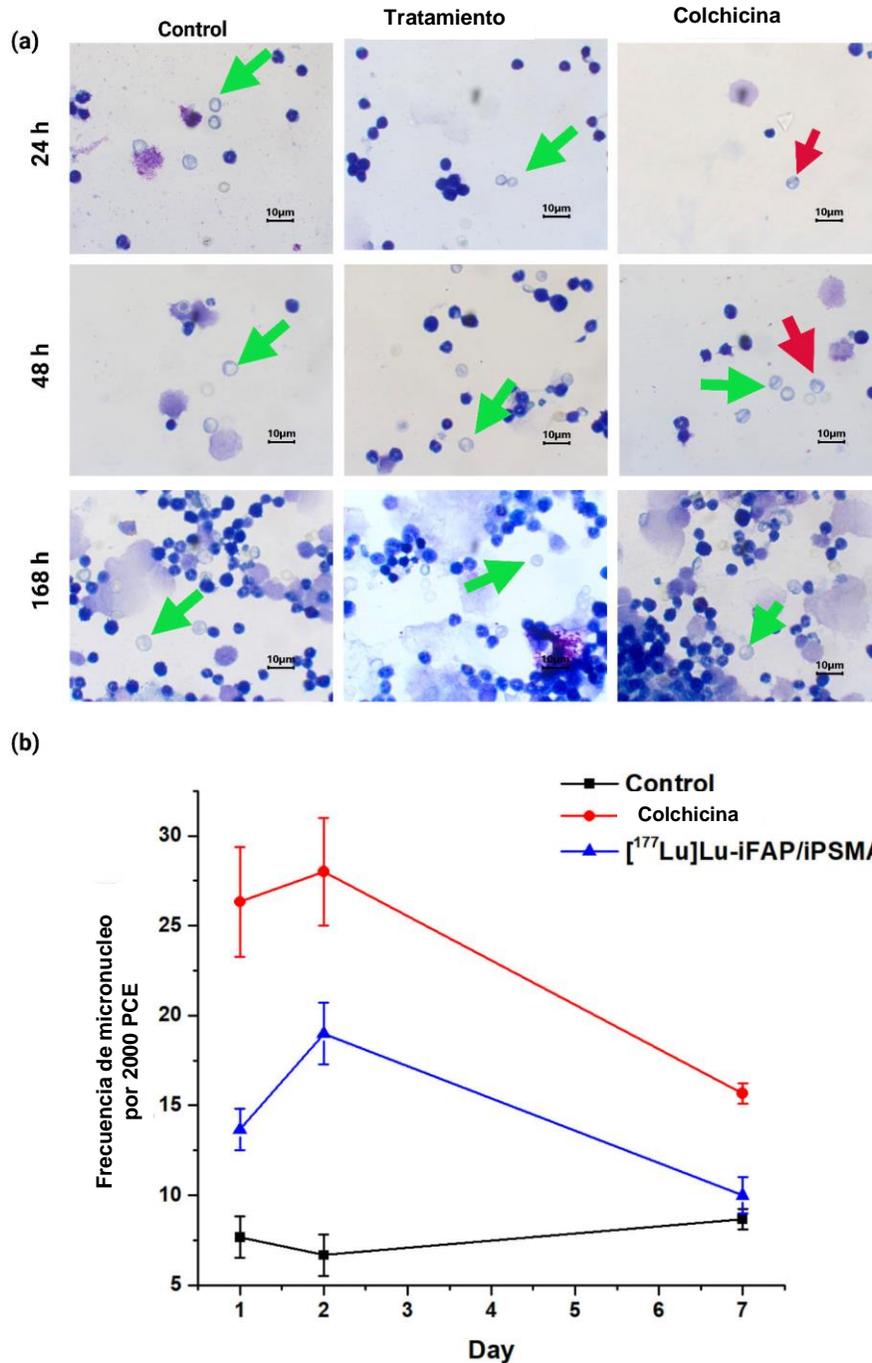


Figura 30. (a) Micrografías ópticas de células de médula ósea de ratones sanos a diferentes tiempos después del tratamiento con nanopartículas de ^{177}Lu]Lu-iFAP/iPSMA, colchicina y sin tratamiento (control). (b) Valores de recuento de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea a diferentes tiempos.

El ensayo de micronúcleos ayudó a evaluar la posibilidad de cualquier inestabilidad genética inducida por las nanopartículas ^{177}Lu]Lu-iFAP/iPSMA. En comparación con el control negativo en 1 y 2 días después del tratamiento, ^{177}Lu]Lu $_2\text{O}_3$ -iFAP/iPSMA aparentemente produjo un efecto genotóxico ($p < 0.05$) (Figura 28). Sin embargo, después de 7 días no se observó diferencia significativa entre el control negativo y el tratamiento con radionanopartículas de lutecio ($p > 0.05$). Por lo tanto, la toxicidad observada se puede atribuir a un efecto tóxico bien conocido y transitorio de la radiación en la médula ósea, pero no a las nanopartículas en sí. Es decir, si la activación de los mecanismos de reparación del ADN no fuera suficientemente eficaz debido al daño severo de las nanopartículas, el comportamiento esperado sería al menos como el del control positivo (colchicina), que no se produjo. Además, es fundamental considerar que la dosis inyectada en ratones fue 60 veces superior (~ 0.850 mg de nanopartículas (740 MBq)/kg) a la recomendada en pacientes (~ 0.014 mg de nanopartículas (12 MBq)/kg) tras una evaluación dosimétrica.

Evaluación biocinética de los sistemas $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA y ^{177}Lu]Lu-iFAP/iPSMA

La evaluación biocinética de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA (Tabla 17a) y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP (Tabla 17b) en ratones desnudos portadores de tumores HCT116 mostró una mayor retención tumoral estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de ambos nanosistemas después de la inyección intratumoral con respecto a las nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ (Tabla 17c).

Tabla 17. Biodistribución a diferentes tiempos de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA y de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP en ratones y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ desnudos después de la inyección intratumoral.

(a)

Tejido	Tiempo (h)			
	3	48	72	96
Corazón	0.28 ± 0.11	0.19 ± 0.07	0.10 ± 0.08	0.07 ± 0.02
Pulmón	0.30 ± 0.10	0.21 ± 0.03	0.15 ± 0.04	0.11 ± 0.07
Hígado	1.05 ± 0.38	0.94 ± 0.21	0.88 ± 0.12	0.84 ± 0.09
Bazo	0.39 ± 0.16	0.34 ± 0.10	0.31 ± 0.09	0.28 ± 0.07
Riñones	0.84 ± 0.19	0.63 ± 0.23	0.58 ± 0.17	0.39 ± 0.21
Tumor (%ID/g)	80.42 ± 5.87	79.32 ± 5.27	77.23 ± 6.01	75.98 ± 5.41

(b)

Tejido	Tiempo (h)			
	3	48	72	96
Corazón	0.22 ± 0.09	0.18 ± 0.09	0.14 ± 0.07	0.05 ± 0.02
Pulmón	0.26 ± 0.11	0.19 ± 0.08	0.16 ± 0.05	0.10 ± 0.04
Hígado	1.18 ± 0.70	1.10 ± 0.42	0.83 ± 0.22	0.81 ± 0.13
Bazo	0.40 ± 0.14	0.35 ± 0.12	0.32 ± 0.11	0.26 ± 0.09
Riñones	0.91 ± 0.17	0.78 ± 0.15	0.62 ± 0.13	0.50 ± 0.18
Tumor (%ID/g)	83.87 ± 5.33	81.21 ± 5.64	78.58 ± 3.81	77.32 ± 4.25

(c)

Tejido	Tiempo (h)			
	3	48	72	96
Corazón	0.27 ± 0.06	0.21 ± 0.08	0.16 ± 0.07	0.11 ± 0.04
Pulmón	0.29 ± 0.13	0.25 ± 0.11	0.20 ± 0.14	0.18 ± 0.05
Hígado	1.69 ± 0.97	1.40 ± 0.52	1.36 ± 0.45	1.29 ± 0.12
Bazo	0.55 ± 0.28	0.49 ± 0.25	0.40 ± 0.21	0.38 ± 0.14
Riñones	0.98 ± 0.31	0.95 ± 0.29	0.88 ± 0.43	0.83 ± 0.34
Tumor (%ID/g)	64.12 ± 4.98	57.25 ± 4.56	53.58 ± 3.25	49.52 ± 3.31

La integración matemática de los datos de ajuste como modelos exponenciales (modelos biocinéticos) hasta el decaimiento completo de ^{177}Lu , mostró valores de transformación nuclear total (N) de 597, 600, 55 y 576 Bq.s para $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA y 586, 800, 49 y 878 Bq.s para $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP, los cuales fueron significativamente ($p < 0.05$) mayores en comparación con los producidos por $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ (339.840 ± 15.632 Bq.s). Las diferencias en el porcentaje de dosis inyectada retenida en los tumores y los valores de N se atribuyen al reconocimiento específico del blanco de los

ligandos iPSMA e iFAP presentes en los nanosistemas funcionalizados. También se produjo cierta captación principalmente en el hígado y, en menor grado, en el bazo y el riñón, con una retención prácticamente insignificante en otros órganos.

La progresión tumoral en todos los ratones tratados con nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ se inhibió significativamente ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (Figura 31). A los 21 días, el tamaño del tumor en los grupos $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP fue 7.5 veces más pequeño que el de los controles y tres veces más pequeño que en el grupo $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ (Figura 31). La progresión del tamaño del tumor se correlacionó con las dosis administradas a los tumores HCT116 en el siguiente orden: Nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP (105 ± 14 Gy), $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA (99 ± 12 Gy) y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ (58 ± 7 Gy), aunque sin diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las nanopartículas funcionalizadas (Figura 31).

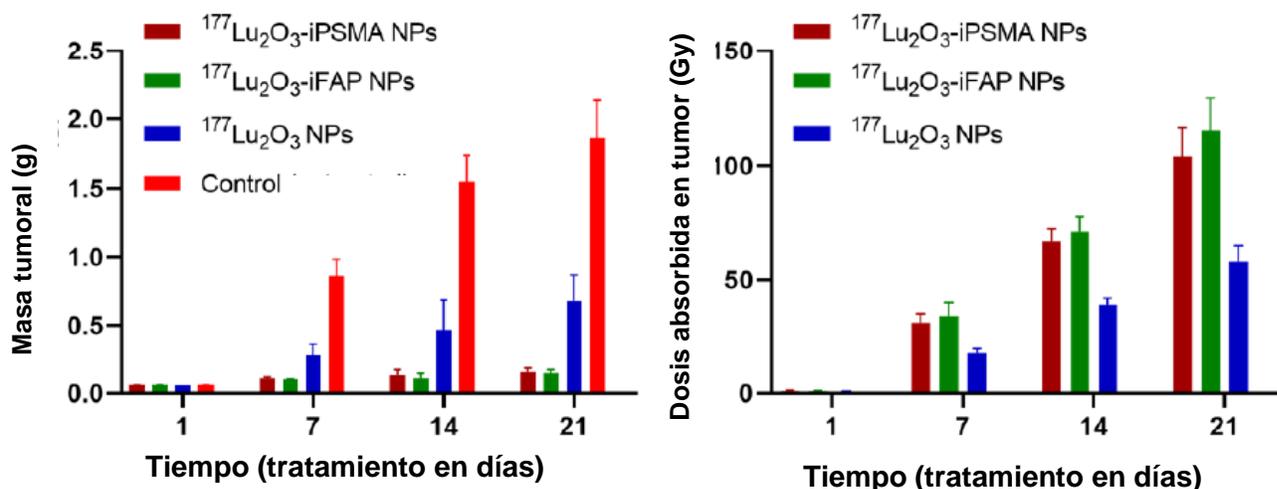


Figura 31. (a) Progresión del tamaño del tumor para los grupos $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA, $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ en diferentes días del tratamiento, (b) Dosis media de radiación absorbida de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA, $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ administradas a los tumores HCT116.

Los efectos tóxicos de las nanopartículas metálicas en los tejidos han sido de los más estudiados. Teniendo en cuenta que la captación primaria se da por el sistema reticuloendotelial liderado por el hígado y el bazo, se ha informado que las nanopartículas inducen cambios hepáticos estructurales y disfuncionales asociados con niveles elevados de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β e IL-6, así como un aumento en fosfatasa alcalina, AST y ALT. Además, la autofagia, la piroptosis, la apoptosis, la necrosis y la peroxidación lipídica (inducida por especies reactivas de oxígeno) son vías de lesión y muerte de los hepatocitos atribuidas a la alta toxicidad de las nanopartículas. Sin embargo, las diferencias específicas hacen que las nanopartículas de [^{177}Lu]Lu $_2$ O $_3$ -iFAP/iPSMA sean una opción segura para su uso potencial en el tratamiento de pacientes. Primero, la funcionalización en su superficie con biomoléculas (ligandos basados en biopéptidos) podría resultar en el no

reconocimiento de las nanopartículas como elementos extraños por parte del sistema inmunológico. En segundo lugar, debido al efecto estérico de los ligandos unidos a la nanopartícula, se minimizan las interacciones químicas que podrían inducir la formación de especies reactivas de oxígeno. De acuerdo con los resultados obtenidos, los tejidos sanos no mostraron signos de inflamación (infiltración linfocítica), formación de granulomas, hemorragia, necrosis o procesos fibróticos. De hecho, el único mecanismo de captación celular del radionanosistema en el bazo y el hígado se encontró a través de los macrófagos. Sin embargo, los macrófagos son altamente radiorresistentes en la medida en que pueden reparar roturas de doble cadena de ADN. Se ha informado que el aumento de la expresión de Bcl-xL y la activación de la transcripción de NF-kappa B son el mecanismo de supervivencia de los macrófagos. Además, los macrófagos irradiados son viables, metabólicamente activos, presentan mayor fagocitosis y tienen un perfil antiinflamatorio reducido (expresión disminuida de CD163, IL-10, VCAN y MRC1). Aunque la fagocitosis de nanopartículas metálicas por parte de los macrófagos induce un mecanismo proinflamatorio en el sistema inmunitario, no se observó en tejidos sanos después del tratamiento con [^{177}Lu]Lu-iFAP/iPSMA, lo que también se puede atribuir a su biocompatibilidad mediada por los ligandos que recubren la superficie de las nanopartículas.

La genotoxicidad asociada con la irradiación de la médula ósea fue transitoria ya que se observó una recuperación en ratones tratados con [^{177}Lu]Lu $_2$ O $_3$ -iFAP/iPSMA después de 7 días. Por tanto, no se observó genotoxicidad como consecuencia de un exceso de radicales libres inducidos a partir de nanopartículas por estrés oxidativo con potencial efecto mutagénico, lo que confirma que la administración sistémica intravenosa es segura.

Llegados a este punto, es fundamental destacar que el primer mecanismo de captación de nanopartículas de lutecio por parte de los tumores es el efecto EPR, que aprovecha el tamaño del espacio intercelular endotelial (de 400nm a 800nm) de los tumores, en contraste con 2 nm entre células endoteliales de tejidos sanos. Además, dentro del tumor, el nanosistema [^{177}Lu]Lu $_2$ O $_3$ -iFAP/iPSMA también se retiene mediante un mecanismo mediado por las proteínas FAP y PSMA. De esta forma, las células no malignas de los órganos sanos normales tienen una oportunidad mínima de estar en contacto con las nanopartículas administradas, lo que reduce la toxicidad potencial del nanosistema. Recientemente, Luna-Gutiérrez et al. demostraron, a través de imágenes moleculares nucleares, que después de la administración intravenosa de nanopartículas de [^{177}Lu]Lu-iPSMA a un paciente con múltiples metástasis hepáticas colorrectales, se produjo una captación altamente selectiva por las lesiones tumorales con una visualización mínima del parénquima hepático. Es decir, las células sanas del parénquima hepático no atraparón nanopartículas de lutecio. Por lo

tanto, las nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iFAP/iPSMA podrían ser una opción segura para futuros protocolos clínicos en el tratamiento de tumores hepáticos, particularmente metástasis hepáticas colorrectales. Además, Los estudios clínicos también podrían llevarse a cabo en combinación con nuevas inmunoterapias contra el cáncer centradas en inhibir la metástasis, la resistencia terapéutica y la progresión del cáncer mediante la reducción de la inmunosupresión y la remodelación del microambiente tumoral.

8. Evidencia de Artículo publicado

Article

^{225}Ac -rHDL Nanoparticles: A Potential Agent for Targeted Alpha-Particle Therapy of Tumors Overexpressing SR-BI Proteins

Tania Hernández-Jiménez ^{1,2}, Guillermina Ferro-Flores ^{1,*}, Enrique Morales-Ávila ^{2,*}, Keila Isaac-Olivé ³, Blanca Ocampo-García ¹, Liliana Aranda-Lara ³, Clara Santos-Cuevas ¹, Myrna Luna-Gutiérrez ¹, Laura De Nardo ⁴, Antonio Rosato ^{5,6} and Laura Meléndez-Alafort ⁶

¹ Department of Radioactive Materials, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico; tania.hernandez@inin.gob.mx (T.H.-J.); blanca.ocampo@inin.gob.mx (B.O.-G.); clara.cuevas@inin.gob.mx (C.S.-C.); myrna.luna@inin.gob.mx (M.L.-G.)

² Faculty of Chemistry, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Mexico

³ Faculty of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Mexico; kisaaco@uaemex.mx (K.I.-O.); larandal@uaemex.mx (L.A.-L.)

⁴ Department of Physics and Astronomy, University of Padua, 35131 Padova, Italy; laura.denardo@unipd.it

⁵ Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology, University of Padova, 35138 Padova, Italy; antonio.rosato@unipd.it

⁶ Veneto Institute of Oncology IOV-IRCCS, 35138 Padova, Italy; laura.melendezalafort@iov.veneto.it

* Correspondence: guillermina.ferro@inin.gob.mx (G.F.-F.); emoralesav@uaemex.mx (E.M.-Á.)



Citation: Hernández-Jiménez, T.; Ferro-Flores, G.; Morales-Ávila, E.; Isaac-Olivé, K.; Ocampo-García, B.; Aranda-Lara, L.; Santos-Cuevas, C.; Luna-Gutiérrez, M.; De Nardo, L.; Rosato, A.; et al. ^{225}Ac -rHDL Nanoparticles: A Potential Agent for Targeted Alpha-Particle Therapy of Tumors Overexpressing SR-BI Proteins. *Molecules* **2022**, *27*, 2156. <https://doi.org/10.3390/molecules27072156>

Academic Editors: Alessandra Boschi and Petra Martini

Received: 15 February 2022

Accepted: 23 March 2022

Published: 27 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article

Abstract Actinium-225 and other alpha-particle-emitting radionuclides have shown high potential for cancer treatment. Reconstituted high-density lipoproteins (rHDL) specifically recognize the scavenger receptor B type I (SR-BI) overexpressed in several types of cancer cells. Furthermore, after rHDL-SR-BI recognition, the rHDL content is injected into the cell cytoplasm. This research aimed to prepare a targeted ^{225}Ac -delivering nanosystem by encapsulating the radionuclide into rHDL nanoparticles. The synthesis of rHDL was performed in two steps using the microfluidic synthesis method for the subsequent encapsulation of ^{225}Ac , previously complexed to a lipophilic molecule (^{225}Ac -DOTA-benzene-*p*-SCN, CLog P = 3.42). The nanosystem (13 nm particle size) showed a radiochemical purity higher than 99% and stability in human serum. In vitro studies in HEP-G2 and PC-3 cancer cells (SR-BI positive) demonstrated that ^{225}Ac was successfully internalized into the cytoplasm of cells, delivering high radiation doses to cell nuclei (107 Gy to PC-3 and 161 Gy to HEP-G2 nuclei at 24 h), resulting in a significant decrease in cell viability down to $3.22 \pm 0.72\%$ for the PC-3 and to $1.79 \pm 0.23\%$ for HEP-G2 at 192 h after ^{225}Ac -rHDL treatment. After intratumoral ^{225}Ac -rHDL administration in mice bearing HEP-G2 tumors, the biokinetic profile showed significant retention of radioactivity in the tumor masses ($90.16 \pm 2.52\%$ of the injected activity), which generated ablative radiation doses (649 Gy/MBq). The results demonstrated adequate properties of rHDL as a stable carrier for selective deposition of ^{225}Ac within cancer cells overexpressing SR-BI. The results obtained in this research justify further preclinical studies, designed to evaluate the therapeutic efficacy of the ^{225}Ac -rHDL system for targeted alpha-particle therapy of tumors that overexpress the SR-BI receptor.

Keywords: scavenger receptor B type I; reconstituted high-density lipoproteins; actinium-225; ^{225}Ac -rHDL; targeted alpha-particle therapy



molecules

Submit to this Journal

Review for this Journal

Edit a Special Issue

Article Menu

Article Overview

Article Versions

Related Info Links

More by Authors Links

Full Article Text

- Introduction
- Results and Discussion
- Materials and Methods
- Conclusions
- Author Contributions
- Funding
- Institutional Review Board Statement

IK

^{225}Ac -rHDL Nanoparticles: A Potential Agent for Targeted Alpha-Particle Therapy of Tumors Overexpressing SR-BI Proteins

by Tania Hernández-Jiménez ^{1,2} , Guillermina Ferro-Flores ^{1,*} , Enrique Morales-Ávila ^{2,*} , Keila Isaac-Olivé ³ , Blanca Ocampo-García ¹ , Liliana Aranda-Lara ³ , Clara Santos-Cuevas ¹ , Myrna Luna-Gutiérrez ¹ , Laura De Nardo ⁴ , Antonio Rosato ^{5,6} and Laura Meléndez-Alafort ⁶

¹ Department of Radioactive Materials, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico

² Faculty of Chemistry, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Mexico

³ Faculty of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Mexico

⁴ Department of Physics and Astronomy, University of Padua, 35131 Padova, Italy

⁵ Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology, University of Padova, 35138 Padova, Italy

⁶ Veneto Institute of Oncology IOV-IRCCS, 35138 Padova, Italy

* Authors to whom correspondence should be addressed.

Academic Editors: Alessandra Boschi and Petra Martini

Molecules **2022**, *27*(7), 2156; <https://doi.org/10.3390/molecules27072156>

Received: 15 February 2022 / Revised: 18 March 2022 / Accepted: 23 March 2022 /

Published: 27 March 2022

(This article belongs to the Special Issue Metal-Based Radiopharmaceuticals in Inorganic Chemistry)

Download PDF

Browse Figures

Citation Export

Back to Top

9. Evidencia de Artículo enviado



nanomaterials



Article

Toxicity assessment of ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA nanoparticles prepared under GMP-compliant radiopharmaceutical processes

Tania Hernández-Jiménez ^{1,2}, Pedro Cruz-Nova ^{1,*}, Alejandra Ancira-Cortez ^{1,*}, Brenda Gibbens-Bandala ¹, Nancy Lara-Almazán ³, Blanca Ocampo-García ¹, Clara Santos-Cuevas ¹, Enrique Morales-Avila ², Guillermina Ferro-Flores ^{1,*}

¹ Department of Radioactive Materials, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Mexico.

² Faculty of Chemistry, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, Mexico.

³ Department of Chemical Analysis, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Mexico.

* Correspondence: guillermina.ferro@inin.gov.mx (G.F.-F.); pedro.cruz.comecyt@inin.gov.mx (P.C.-N.); alejandra.a.servicios@inin.gov.mx (A.A.-C.)

Abstract: The fibroblast activation protein (FAP) is heavily expressed in fibroblasts associated with the tumor microenvironment, while the prostate-specific membrane antigen (PSMA) is expressed in the neovasculature of malignant angiogenic processes. Previously, we reported that ^{177}Lu lutetium sesquioxide-iFAP/iPSMA nanoparticles (^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA) inhibit HCT116 tumor progression in mice. Understanding the toxicity of ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA in healthy tissues, as well as at the tissue and cellular level in pathological settings, is essential to demonstrate the nanosystem safety for treating patients. It is equally important to demonstrate that ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA can be prepared under good manufacturing practices (GMP) with reproducible pharmaceutical-grade quality characteristics. This research aimed to prepare ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA under GMP-compliant radiopharmaceutical processes and evaluate its toxicity in cell cultures and murine biological systems under pathological environments. ^{177}Lu Lu₂O₃ nanoparticles were formulated as radiocolloidal solutions with FAP and PSMA inhibitor ligands (iFAP and iPSMA), sodium citrate, and gelatin, followed by heating at 121°C (103-kPa pressure) for 15 min. Three consecutive batches were manufactured. The final product was analyzed according to conventional pharmacopeial methods. The Lu content in the formulations was determined by X-ray fluorescence. ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA performance in cancer cells was evaluated *in vitro* by immunofluorescence. Histopathological toxicity in healthy and tumor tissues was assessed in HCT116 tumor-bearing mice. Immunohistochemical assays were performed to corroborate FAP and PSMA tumor expression. Acute genotoxicity was evaluated using the micronuclei assay. The results showed that the batches manufactured under GMP conditions were reproducible. Radiocolloidal solutions were sterile and free of bacterial endotoxins, with radionuclidic and radiochemical purity greater than 99%. The lutetium content was 0.10±0.02 mg/mL (0.9 GBq/mg). Significant inhibition of cell proliferation *in vitro* and in tumors was observed due to the accumulation of nanoparticles in the fibroblasts (FAP+) and neovasculature (PSMA+) of the tumor microenvironment. No histopathological damage was detected in healthy tissues. The data obtained in this research provides new evidence on the selective toxicity to malignant tumors and the absence of histological changes in healthy tissues after intravenous injection of ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA in mammalian hosts. The easy preparation under GMP conditions and the toxicity features provide the added value needed for ^{177}Lu Lu-iFAP/iPSMA clinical translation.

Keywords: lutetium nanoparticles; ^{177}Lu Lu-nanoparticle toxicity; FAP inhibitor; PSMA inhibitor

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Tumors are complex pathological arrangements consisting of malignant cells and the tumor microenvironment (stroma). The latter involves the communication of different non-cancerous cells through dynamic networks regulated by chemokines, inflammatory

Dear Professor Ferro-Flores,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Nanomaterials

Manuscript ID: nanomaterials-2053724

Type of manuscript: Article

Title: Toxicity assessment of [177Lu]Lu-iFAP/iPSMA nanoparticles prepared under BPF-compliant radiopharmaceutical processes

Authors: Tania Hernández-Jiménez, Pedro Cruz-Nova *, Alejandra Ancira-Cortez *, Brenda Gibbens-Bandala, Nancy Lara-Almazán, Blanca Ocampo-García, Clara Santos-Cuevas, Enrique Morales-Avila, Guillermina Ferro-Flores *

Received: 9 November 2022

E-mails: tania.hernandez@inin.gob.mx, pedro.cruz.comecyt@inin.gob.mx, alejandra.a.servicios@inin.gob.mx, brenda.g.servicios@inin.gob.mx, nancy.l.servicios@inin.gob.mx, blanca.ocampo@inin.gob.mx, clara.cuevas@inin.gob.mx, emoralesav@uaemex.mx, guillermina.ferro@inin.gob.mx

Submitted to section: Biology and Medicines,

https://www.mdpi.com/journal/nanomaterials/sections/biology_medicines

Toxicity Assessment of Metal Nanoparticles and Metal Oxide Nanoparticles

https://www.mdpi.com/journal/nanomaterials/special_issues/toxic_nanometal

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/cc7e76b3d20ee32a50dccb9d949096dc

The following points were confirmed during submission:

1. Nanomaterials is an open access journal with publishing fees of 2400 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/nanomaterials/apc>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access publishing.

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code or if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see <https://www.mdpi.com/about/ioap>. If you have been granted any other special discounts for your submission, please contact the Nanomaterials editorial office.

2. I understand that:

a. If previously published material is reproduced in my manuscript, I will provide proof that I have obtained the necessary copyright permission.

(Please refer to the Rights & Permissions website:

<https://www.mdpi.com/authors/rights>).

b. My manuscript is submitted on the understanding that it has not been published in or submitted to another peer-reviewed journal. Exceptions to this rule are papers containing material disclosed at conferences. I confirm that I will inform the journal editorial office if this is the case for my

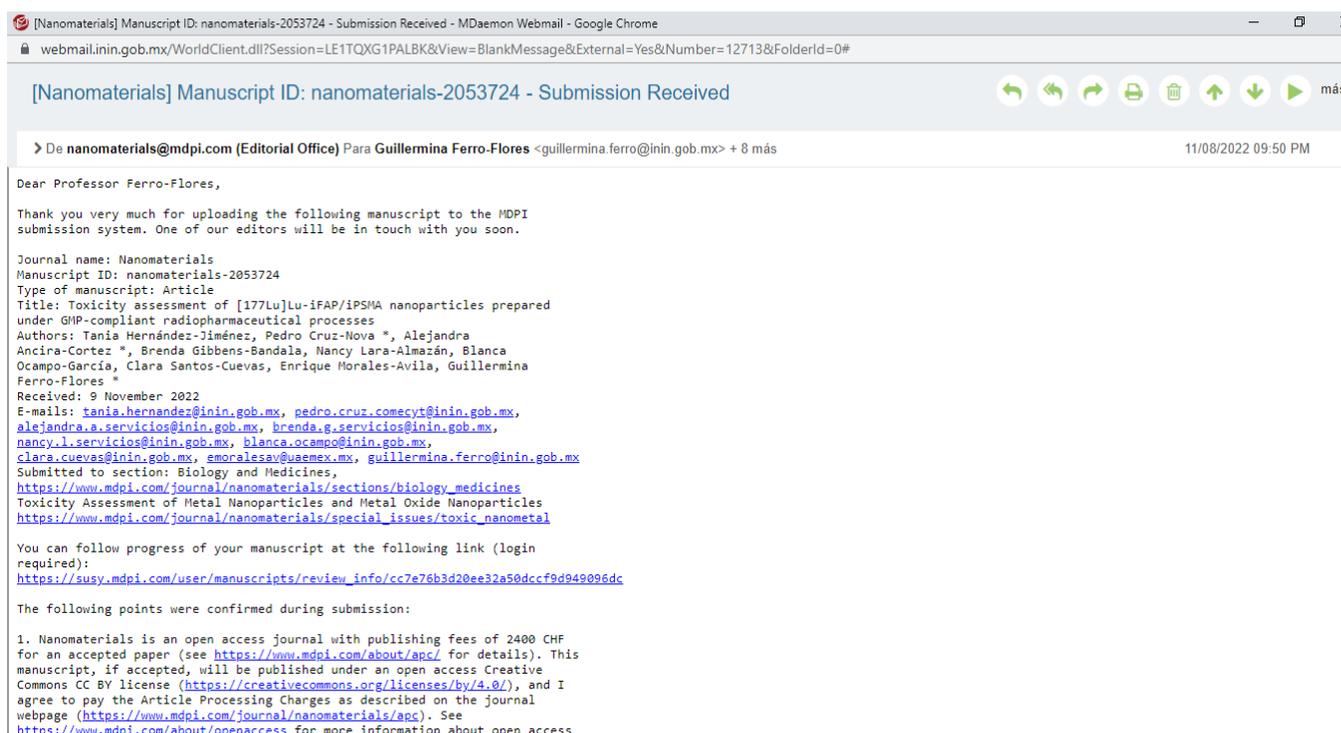
Preparación y evaluación in vitro e in vivo de nanocápsulas de rHDL marcadas con ²²⁵AcCl₃: comparación con nanopartículas de ¹⁷⁷Lu₂O₃ para radioterapia dirigida

manuscript. I confirm that all authors are familiar with and agree with submission of the contents of the manuscript. The journal editorial office reserves the right to contact all authors to confirm this in case of doubt. I will provide email addresses for all authors and an institutional e-mail address for at least one of the co-authors, and specify the name, address and e-mail for invoicing purposes.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the Nanomaterials editorial office at nanomaterials@mdpi.com

Kind regards,
Nanomaterials Editorial Office
St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland
E-Mail: nanomaterials@mdpi.com
Tel. +41 61 683 77 34
Fax: +41 61 302 89 18

*** This is an automatically generated email ***



[Nanomaterials] Manuscript ID: nanomaterials-2053724 - Submission Received

De nanomaterials@mdpi.com (Editorial Office) Para Guillermina Ferro-Flores <guillermina.ferro@inin.gob.mx> + 8 más 11/08/2022 09:50 PM

Dear Professor Ferro-Flores,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Nanomaterials
Manuscript ID: nanomaterials-2053724
Type of manuscript: Article
Title: Toxicity assessment of [¹⁷⁷Lu]Lu-IFAP/iPSMA nanoparticles prepared under GMP-compliant radiopharmaceutical processes
Authors: Tania Hernández-Jiménez, Pedro Cruz-Nova *, Alejandra Ancira-Cortez *, Brenda Gibbens-Bandala, Nancy Lara-Almazán, Blanca Ocampo-García, Clara Santos-Cuevas, Enrique Morales-Avila, Guillermina Ferro-Flores *
Received: 9 November 2022
E-mails: tania.hernandez@inin.gob.mx, pedro.cruz.comecyt@inin.gob.mx, alejandra.a.servicios@inin.gob.mx, brenda.g.servicios@inin.gob.mx, nancy.l.servicios@inin.gob.mx, blanca.ocampo@inin.gob.mx, clara.cuevas@inin.gob.mx, emoralesav@uaemex.mx, guillermina.ferro@inin.gob.mx
Submitted to section: Biology and Medicines, https://www.mdpi.com/journal/nanomaterials/sections/biology_medicines
Toxicity Assessment of Metal Nanoparticles and Metal Oxide Nanoparticles https://www.mdpi.com/journal/nanomaterials/special_issues/toxic_nanometal

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required): https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/cc7e76b3d20ee32a50dccc9d949086dc

The following points were confirmed during submission:

1. Nanomaterials is an open access journal with publishing fees of 2400 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/nanomaterials/apc>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access

10. Colaboración en artículo publicado



Article

Targeted Endoradiotherapy with Lu_2O_3 -iPSMA/-iFAP Nanoparticles Activated by Neutron Irradiation: Preclinical Evaluation and First Patient Image

Myrna Luna-Gutiérrez ¹, Blanca Ocampo-García ¹, Nallely Jiménez-Mancilla ², Alejandra Ancira-Cortez ¹, Diana Trujillo-Benítez ¹, Tania Hernández-Jiménez ¹, Gerardo Ramírez-Nava ¹, Rodrigo Hernández-Ramírez ³, Clara Santos-Cuevas ^{1,*} and Guillermina Ferro-Flores ^{1,*}

- ¹ Department of Radioactive Materials, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico; myrna.luna@inin.gob.mx (M.L.-G.); blanca.ocampo@inin.gob.mx (B.O.-G.); alejandra.a.servicios@inin.gob.mx (A.A.-C.); sarahitrujillo097@hotmail.com (D.T.-B.); tania.hernandez@inin.gob.mx (T.H.-J.); gerardo.r.servicios@inin.gob.mx (G.R.-N.)
- ² Cátedras CONACYT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico; nallely.jimenez@inin.gob.mx
- ³ Nuclear Medicine Department, Hospital Médica Sur, Mexico City 14080, Mexico; rhernandez@medicasur.org.mx
- * Correspondence: clara.cuevas@inin.gob.mx (C.S.-C.); guillermina.ferro@inin.gob.mx (G.F.-F.)



Citation: Luna-Gutiérrez, M.; Ocampo-García, B.; Jiménez-Mancilla, N.; Ancira-Cortez, A.; Trujillo-Benítez, D.; Hernández-Jiménez, T.; Ramírez-Nava, G.; Hernández-Ramírez, R.; Santos-Cuevas, C.; Ferro-Flores, G. Targeted Endoradiotherapy with Lu_2O_3 -iPSMA/-iFAP Nanoparticles Activated by Neutron Irradiation: Preclinical Evaluation and First Patient Image. *Pharmaceutics* 2022, 14, 720. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040720>

Academic Editor: Philippe Garrigues

Received: 14 February 2022

Accepted: 24 March 2022

Published: 27 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Prostate-specific membrane antigen (PSMA) is expressed in a variety of cancer cells, while the fibroblast activation protein (FAP) is expressed in the microenvironment of tumors. Previously, we reported the ability of iPSMA and iFAP ligands to specifically target PSMA and FAP proteins, as well as the preparation of stable $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ nanoparticles (<100 nm) functionalized with target-specific peptides. This research aimed to evaluate the dosimetry and therapeutic response of Lu_2O_3 -iPSMA and Lu_2O_3 -iFAP nanoparticles activated by neutron irradiation to demonstrate their potential for theranostic applications in nuclear medicine. The biokinetic behavior, radiation absorbed dose, and metabolic activity (^{18}F FDG/micro-PET, SUV) in preclinical tumor tissues (athymic mice), following treatment with $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA, $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP or $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ nanoparticles, were assessed. One patient with multiple colorectal liver metastases (PSMA-positive) received $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA under a “compassionate use” protocol. Results indicated no significant difference ($p < 0.05$) between $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA and $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP, regarding tumor radiation absorbed doses (105 ± 14 Gy, 99 ± 12 Gy and 58 ± 7 Gy for $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA, $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP, and $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$, respectively) and tumor metabolic activity (SUV of 0.421 ± 0.092 , 0.375 ± 0.104 and 1.821 ± 0.891 for $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA, $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP, and $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$, respectively) in mice after treatment, which correlated with the observed therapeutic response. $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA and $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP significantly inhibited tumor progression, due to the prolonged tumor retention and a combination of ^{177}Lu radiotherapy and iPSMA or iFAP molecular recognition. There were negligible uptake values in non-target tissues and no evidence of liver and renal toxicity. The doses received by the patient’s liver metastases (42–210 Gy) demonstrated the potential of $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA for treating colorectal liver metastases.

Keywords: lutetium oxide nanoparticles; prostate-specific membrane antigen inhibitor; fibroblast activation protein inhibitor; lutetium-177

1. Introduction

Research on nanoparticle-based radiopharmaceuticals for the treatment of various types of cancer is of interest in the field of human health, due to the high tumor retention and high internalization in cancer cells of previously-reported targeted radionanosystems [1–4].

Lutetium-177 has been widely used as the radionuclide of choice for peptide-targeted endoradiotherapy [5,6]. During the last decade many studies have reported the preclinical



pharmaceutics

Submit to this Journal

Review for this Journal

Edit a Special Issue

Article Menu

Article Overview

- Abstract
- Open Access and Permissions
- Share and Cite
- Article Metrics
- Order Article Reprints

Article Versions

Related Info Links

More by Authors Links

Open Access Article

Targeted Endoradiotherapy with Lu_2O_3 -iPSMA/-iFAP Nanoparticles Activated by Neutron Irradiation: Preclinical Evaluation and First Patient Image

by Myrna Luna-Gutiérrez ¹ Blanca Ocampo-García ¹ Nallely Jiménez-Mancilla ² Alejandra Ancira-Cortez ¹ Diana Trujillo-Benitez ¹ Tania Hernández-Jiménez ¹ Gerardo Ramírez-Nava ¹ Rodrigo Hernández-Ramírez ³ Clara Santos-Cuevas ^{1,*} and Guillermina Ferro-Flores ^{1,*}

¹ Department of Radioactive Materials, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico

² Cátedras CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico

³ Nuclear Medicine Department, Hospital Médica Sur, Mexico City 14080, Mexico

* Authors to whom correspondence should be addressed.

Academic Editor: Philippe Garrigue

Pharmaceutics **2022**, *14*(4), 720; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040720>

Received: 14 February 2022 / Revised: 23 March 2022 / Accepted: 24 March 2022 / Published: 27 March 2022

(This article belongs to the Special Issue Radiopharmaceuticals and Nanotechnology: From Diagnostics to Theranostic Applications)

View Full-Text

Download PDF

Browse Figures

Review Reports

11. Participación en congreso internacional

29th Win-Global Annual Conference 2022 Japan, May 25, 2022, Win Japan

^{225}Ac -rHDL Nanoparticles: A potential Agent for Targeted Alpha-Particle Therapy of Tumors Overexpressing SR-BI Proteins

Tania Hernández Jiménez^{1,2}, Guillermina Ferro Flores¹, Enrique Morales Ávila², Keila Isaac Olivé³, Blanca Ocampo García¹, Liliana Aranda Lara³, Clara Santos Cuevas¹, Myrna Luna Gutiérrez¹, Laura De Nardo⁴, Antonio Rosato^{5,6} and Laura Meléndez Alafort⁶
¹Department of Radioactive Materials, ²Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Faculty of Chemistry, Universidad Autónoma del Estado de México, ³Faculty of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de México, ⁴Department of Physics and Astronomy, University of Padua, ⁵Department of Surgery Oncology and Gastroenterology, University of Padova, ⁶Veneto Institute of Oncology IOV-IRCCS Padova

Este trabajo, obtuvo el premio WIN-Japan Award- otorgado al mejor e-poster durante el 29th Women in Nuclear (Win) Global Conference, Japan, 2022.

12. CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO

En este trabajo se prepararon dos nanosistemas utilizando como vehículos acarreadores lipoproteínas rHDL que encapsulan ^{225}Ac y nanopartículas de Lu_2O_3 empleando como agentes de direccionamiento a los inhibidores de FAP y PSMA y marcados con ^{177}Lu . El sistema ^{225}Ac -rHDL se preparó y evaluó como un posible agente radioterapéutico dirigido. Los resultados mostraron propiedades fisicoquímicas adecuadas del nanoportador rHDL para depositar específicamente ^{225}Ac en el citoplasma de las células cáncerosas HEP-G2 y PC-3 y producir un efecto citotóxico celular significativo. Los estudios de biodistribución de ^{225}Ac -rHDL en ratones sanos mostraron principalmente captación hepática con excreción hepatobiliar y renal sin una acumulación apreciable en otros tejidos, mientras que, en ratones portadores de tumores, el nanosistema ^{225}Ac -rHDL permaneció estable en los tumores y generó dosis de radiación ablativas. Los resultados obtenidos en esta investigación justifican más estudios preclínicos diseñados para evaluar la eficacia terapéutica de ^{225}Ac -rHDL para la terapia dirigida con partículas alfa de tumores que sobreexpresan el receptor SR-BI.

Por otra parte, los datos obtenidos en la investigación del sistema ^{177}Lu - Lu_2O_3 -iFAP/iPSMA, muestran nueva evidencia sobre la toxicidad selectiva para tumores malignos y la ausencia de cambios histológicos en tejidos sanos después de la administración intravenosa de ^{177}Lu - Lu_2O_3 -iFAP/iPSMA en huéspedes mamíferos. La fácil preparación en condiciones BPF y las características de toxicidad brindan el valor agregado para la traslación clínica de ^{177}Lu - Lu_2O_3 -iFAP/iPSMA en el tratamiento de metástasis hepáticas colorrectales. En complemento, los resultados preclínicos obtenidos mostraron que $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP inhiben la progresión del tumor colorrectal HCT116 debido a la retención prolongada del tumor y una combinación de radioterapia con ^{177}Lu y reconocimiento molecular iPSMA o iFAP. Hubo valores de absorción insignificantes en tejidos no diana y no hubo evidencia de toxicidad renal o hepática. Las dosis recibidas por las metástasis hepáticas del paciente demostraron el potencial de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA para tratar las metástasis hepáticas colorrectales. Sin embargo, el perfil de biodistribución de las radionanopartículas puede presentar variaciones muy significativas, dependiendo del daño hepático del paciente; la razón por la cual los cálculos de dosimetría personalizados son cruciales. Aunque la administración intravenosa de nanopartículas es menos invasiva y factible, la opción de administrar $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iFAP a través de la arteria hepática mediante un

procedimiento de radiología intervencionista sigue siendo la siguiente tarea para mejorar su distribución y perfil dosimétrico.

Indudablemente, los nanosistemas conteniendo ^{225}Ac producen mayor dosis de radiación absorbida en aproximadamente 3 ordenes de magnitud por unidad de actividad administrada respecto a las nanopartículas de ^{177}Lu . Sin embargo, los datos obtenidos en esta tesis demuestran que ambos sistemas se dirigen de manera selectiva a los tejidos malignos y que depositan la suficiente energía de radiación para su ablación, sin producir daños irreversibles en tejidos sanos. Por tanto, los resultados alcanzados justifican la realización de estudios preclínicos adicionales en diferentes patologías y su potencial traslación a fases clínicas cero.

Se propone un estudio preclínico comparativo entre la eficacia terapéutica del nanosistema ^{225}Ac -rHDL y las nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iPSMA a fin de evaluar la microdistribución en tejidos tumorales y la eficacia terapéutica de dos nanosistemas de última generación, uno emisor de partículas beta y otro emisor de partículas alfa.

Asimismo, se propone realizar un estudio clínico con un mayor número de pacientes que permita establecer con precisión los modelos clínicos radiofarmacocinéticos que permitan iniciar la Fase clínica I de las nanopartículas de ^{177}Lu Lu₂O₃-iPSMA.

13. REFERENCIAS

1. Daniela D. Rosa, Gustavo Ismael, Lissandra Dal Lago, Ahmad Awada, Molecular-targeted therapies: Lessons from years of clinical development, *Cáncer Treatment Reviews*, Volume 34, Issue 1, 2008, Pages 61-80, ISSN 0305-7372, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.07.019>.
2. Rui Kuai, Dan Li, Y. et. al. High-Density Lipoproteins (HDL). Nature's Multi-Functional nanoparticles. *ACS Nano*, 2016.
3. Linda K. Mooberry, Nirupama A. Sabnis, *Front PHarmacol*. Targeting the SR-B1 Receptor as a Gateway for Cáncer Therapy and Imaging. 2016.
4. Sunil Shaha Rahul Chiba, et al PHotophysical characterization of anticáncer drug valrubicin in rHDL nanoparticles and its use as an imaging agent Author links open overlay panel. *Journal of PHotocchemistry and PHotobiology B: Biology* Volume 155, February 2016.
5. Hamson et al. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cáncer therapy. *Proteomics Clin. Appl.*, 2014, 8, 454-463.
6. Aertgeerts et al. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein α . *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 19441-19444.
7. BJ Allen J. Systemic Targeted Alpha Radiotherapy for Cáncer. *Biomed PHys Eng Sep*; 3(3): 67-80. 2013.
8. N. Arlicot b, A. Faivre-Chauvet F. Lacoeyille et al. Targeted alpha and beta radiotherapy: An overview of radiopharmaceutical and clinical aspects Un état des lieux des aspects radiopharmaceutiques et cliniques de la radiothérapie vectorisée par émetteurs alpha et beta F. Lacoeyille a, / *Médecine Nucléaire* 42 (2018) 32-44
9. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cáncer* 2001; 1:46-54.
10. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - Bipolar effects of the tumour stroma in cáncer. *Nat Rev Cáncer* 2004; 4:839-49.
11. Mueller L, Goumas FA, Affeldt M, Sandtner S, Gehling UM, Briloff S, Walter J, Karnatz N, Lamszus K, Rogiers X et al.: Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. *Am J Pathol* 2007, 171:1608-1618.
12. Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA: Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cáncer Res* 2004, 64:8492-8495.
13. Trujillo-Benítez D, Luna-Gutiérrez M, Ferro-Flores G, et al. Design, Synthesis and Preclinical Assessment of ^{99m}Tc-iFAP for In Vivo Fibroblast Activation Protein (FAP) Imaging. *Molecules*. 2022 Jan 1;27(1):264. doi: 10.3390/molecules27010264.
14. Hamson et al. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cáncer therapy. *Proteomics Clin. Appl.*, 2014, 8, 454-463.
15. Aertgeerts et al. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein α . *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 19441-19444.
16. Edosada et al. Selective inhibition of fibroblast activation protein protease based on dipeptide substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 7437-7444.
17. Tran et al. Synthesis and structure - activity relationship of N-acyl-Gly-, N-acyl-Sar- and N-blocked-boroPro inhibitors of FAP, DPP4, and POP. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 2007, 1438-1442.
18. Jansen et al. Extended structure activity relationship and pharmacokinetic investigation of (4-quinolinoyl) -glycyl-2-cyanopyrrolidine inhibitors of fibroblast activation protein. *J. Med. Chem.*, 2014, 57, 3053-3074.
19. Jansen et al. Selective inhibitors of fibroblast activation protein (FAP) with a (4-quinolinoyl) -glycyl-2-cyanopyrrolidine scaffold. *ACS Med. Chem. Lett.*, 2013, 4, 491-496.

20. Zhang, H., Zhang, W., Jiang, L. et al. Recent advances in systemic therapy for hepatocellular carcinoma. *Biomark Res* 10, 3 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00350-4>
21. Sim HW, Knox J. Hepatocellular carcinoma in the era of immunotherapy. *Curr Probl Cáncer*. 2018;42(1):40–8.
22. Alqahtani A, Khan Z, Alloghbi A, Said Ahmed TS, Ashraf M, Hammouda DM. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55:9.
23. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16018.
24. Data source: Globocan 2021. GrapH production: Global center observatory (<http://gco.iarc.fr>). International Agency for Research on cáncer2022
25. Memon K, Lewandowski RJ, Kulik L, Riaz A, Mulcahy MF, Salem R. Radioembolization for primary and metastatic liver cáncer. *Semin Radiat Oncol*. 2011 Oct;21(4):294-302. doi: 10.1016/j.semradonc.2011.05.004. PMID: 21939859; PMCID: PMC3221012.
26. Lewandowski RJ, Thurston KG, Goin JE, et al. 90Y microspheres (TheraSphere) treatment for unresectable colorectal cáncer metastases of the liver: response to treatment at targeted doses of 135-150 Gy as measured by [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography and computed tomographic imaging. *J Vasc Interv Radiol*. Dec; 2005 16(12):1641–1651.
27. Xinyi Ma, Qingxiang Song, Xiaoling Gao, Reconstituted high-density lipoproteins: novel biomimetic nanocarriers for drug delivery, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Volume 8, Issue 1, 2018, Pages 51-63, ISSN 2211-3835, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.11.006>.
28. Jens B. Simonsen, Evaluation of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) as a drug delivery platform – a detailed survey of rHDL particles ranging from biophysical properties to clinical implications, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Volume 12, Issue 7, 2016, Pages 2161-2179, ISSN 1549-9634, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.05.009>.
29. Marina G. Damiano, R. Kannan Mutharasan, Sushant Tripathy, Kaylin M. McMahon, C. Shad Thaxton, Templated high density lipoprotein nanoparticles as potential therapies and for molecular delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 65, Issue 5, 2013, Pages 649-662, ISSN 0169-409X, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.013>.
30. He, J., Li, C., Ding, L., Huang, Y., Yin, X., Zhang, J., Zhang, J., Yao, C., Liang, M., Pirraco, R. P., Chen, J., Lu, Q., Baldrige, R., Zhang, Y., Wu, M., Reis, R. L., Wang, Y., Tumor Targeting Strategies of Smart Fluorescent Nanoparticles and Their Applications in Cáncer Diagnosis and Treatment. *Adv. Mater.* 2019, 31, 1902409. <https://doi.org/10.1002/adma.201902409>
31. Tasso O. Sales, Erving C. Ximendes, Daniel Jaque, Carlos Jacinto, 8 - Facile and fast synthesis of lanthanide nanoparticles for bio-applications Editor(s): Luciana Reyes Pires Kassab, Sidney J.L. Ribeiro, Raul Rangel-Rojo, In *Nanophotonics, Nanocomposites for Photonics and Electronic Applications*, Elsevier, 2020, Pages 195-228, ISBN 9780128183960, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818396-0.00008-X>
32. L. Labrador-Paez, et al., Core-shell rare-earth-doped nanostructures in biomedicine, *Nanoscale* 10 (2018) 12935e12956
33. D. Jaque, C. Jacinto, Luminescent nanoprobes for thermal bio-sensing: towards controlled photothermal therapies, *J. Lumin.* 169 (2016) 394e399.
34. H. Dong, et al., Lanthanide nanoparticles: from design toward bioimaging and therapy, *Chem. Rev.* 115 (2015) 10725e10815.
35. J.C.G. Bunzli, Lanthanide light for biology and medical diagnosis, *J. Lumin.* 170 (2016) 866e878.
36. I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, Nanoparticles in cáncer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 631e651.
37. A. Ancira-Cortez, G. Ferro-Flores, et al, Synthesis, chemical and biochemical characterization of Lu₂O₃-iPSMA nanoparticles activated by neutron irradiation, *Materials Science and*

- Engineering: C, Volume 117, 2020, 111335, ISSN 0928-4931,
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111335>.
38. Dash A, Chakraborty S, Pillai MR, Knapp FF Jr. Peptide receptor radionuclide therapy: an overview. *Cáncer Biother RadiopHarm*. 2015 Mar;30(2):47-71. doi: 10.1089/cbr.2014.1741. Epub 2015 Feb 24. PMID: 25710506.
 39. Volkert WA, Hoffman TJ. Therapeutic radiopHarmaceuticals. *Chem Rev* 1999;99:2269.
 40. 5. Britton KE. Towards the goal of cáncer-specific imaging and therapy. *Nucl Med Commun* 1997;18:992.
 41. 6. Heeg MJ, Jurisson S. The role of inorganic chemistry in the development of radiometal agents for cancer therapy. *Acc Chem Res* 1999;32:1053.
 42. 7. Okarvi SM. Peptide-based radiopHarmaceuticals: Future tools for diagnostic imaging of cáncers and other diseases. *Med Res Rev* 2004;24:357.
 43. N. Arlicot b, A. Faivre-Chauvet F. Lacoeyille et al. Targeted alpha and beta radiotherapy: An overview of radiopHarmaceutical and clinical aspects Un état des lieux des aspects radiopHarmaceutiques et cliniques de la radiothérapie vectorisée par émetteurs alpha et bêta F. Lacoeyille a, / *Médecine Nucléaire* 42 (2018) 32–44
 44. Robin M.de Kruijff, Hubert T. Wol terbeek. A Critical Review of Alpha Radionuclide Therapy—How to Deal with Recoiling Daughters? .*PHarmaceuticals*. 2015.
 45. [17] Clemens Kratochwil, Frank Bruchertseifer, et. al.. Targeted alpha-Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cáncer with 225Ac-PSMA-617: Dosimetry Estimate and Empiric Dose Finding. *The journal of Nuclear Medicine*. 2017
 46. [18] Nikki A. Thiele and Justin J. Wilson. Actinium-225 for Targeted alpha Therapy: Coordination Chemistry and Current Chelation Approaches. *Cáncer Biotherapy and radiopHarmaceuticals*. Vol 3. 2018.
 47. [19] Rubel Chakravarty. Cerise M Siamof. Review Article. Targeted alpha-therapy of prostate cáncer using radiolabeled PSMA inhibitors: a game changer in nuclear medicine. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. 2018.
 48. Dash A, Pillai MR, Knapp FF Jr. Production of (177)Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nucl Med Mol Imaging*. 2015 Jun;49(2):85-107. doi: 10.1007/s13139-014-0315-z. Epub 2015 Feb 17. PMID: 26085854; PMCID: PMC4463871.
 49. Ercan MT, Caglar M. Therapeutic radiopHarmaceuticals. *Curr PHarm Des*. 2000;6:1085-121.
 50. Guo H, Miao Y. Melanoma targeting property of a Lu-177-labeled lactam bridge-cyclized alpha-MSH peptide. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23:2319
 51. Secretaria de Salud. Suplemento para establecimientos dedicados a la venta y suministro de medicamentos y demás insumos para la salud. Sexta Edición. 2018
 52. FF (Russ), Dash A. Therapeutic Radionuclides Decay with particle emission for Therapeutic Applications. *RadiopHarmaceuticals for Therapy* [internet]. Springer India. 2016 [citado 5 de Septiembre de 2018]. p.25-35
 53. Silvia Vederea-Silvia Gomez de Castiglia. Radiofármacos terapéuticos. Comité de Radiofarmacia. 2007.
 54. Kowalsky, R. J.; Falen, S. W.; *RadiopHarmaceuticals in Nuclear PHarmacy and Nuclear Medicine*; American PHarmacist Association DC, 2004; PP.256-277.
 55. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM 241-SSA1-2021, Buenas prácticas de fabricación de dispositivos médicos. *Diario Oficial de la Federación*. 2021. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5638793&fecha=20/12/2021#gsc.tab=0
 56. World Health Organization. IAEA/WHO guideline on good manufacturing practices for investigational radiopHarmaceutical products. Rev1. July 2021.
 57. WHO good manufacturing practices for investigational pharmaceutical products for clinical 889 trials in humans. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: 890 thirty-fourth report. Geneva: World Health Organization; 1996: Annex 7 (WHO Technical 891 Report Series, No. 863; (<https://www.who.int/docs/default->

- source/medicines/norms-and-892 standards/guidelines/production/trs863-annex7-who-BPF-investigational-893 pHaraceutical-products-clinical-trials-humans.pdf?sfvrsn=2432f236_0,
58. WHO good storage and distribution practices (GSDP). In: WHO Expert Committee on 912 Specifications for PHarmaceutical Preparations: fifty-third report. Geneva: World Health 913 Organization; 2020: Annex 7 (WHO Technical Report Series, No. 1025; 914 <https://www.who.int/publications/m/item/trs-1025-annex-7-gdp-medical-products>, accessed 915 4 November 2020).
59. Todde, S., Peitl, P.K., Elsinga, P. et al. Guidance on validation and qualification of processes and operations involving radiopHaraceuticals. *EJNMMI radiopHarm. chem.* 2, 8 (2017). <https://doi.org/10.1186/s41181-017-0025-9>