



Universidad Autónoma del Estado de México



Facultad de Química

Preparación y evaluación de las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de nanopartículas de lantánidos-péptidos activadas por irradiación neutrónica.

Tesis que para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias y Tecnología Farmacéuticas

Presenta:

M. en C. Q. Alejandra Ancira Cortez

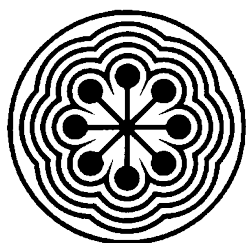
Tutor Académico:

Dr. en C.Q. Enrique Morales Avila.

Tutores adjuntos:

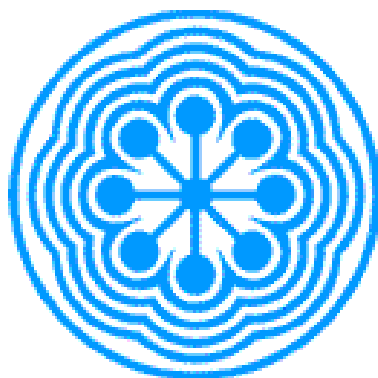
Dra. en C. Guillermina Ferro Flores

Dra. en C. Nallely Patricia Jiménez Mancilla.



ININ

Toluca Estado de México; marzo de 2021.



ININ

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos LANIDER-CONACyT), Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares bajo la dirección académica de la **Dra. Guillermina Ferro Flores y la Dra. Nallely Patricia Jiménez Mancilla** (Financiamiento SEP-CONACyT CB2017-2018-A1-S-36841).

Lo más importante es tratar de inspirar a las personas para que puedan ser geniales en lo que quieran hacer.

Kobe Bryant

A mis amores Ale, Mau y Aldo.

CONTENIDO

Índice de tablas	4
Índice de figuras	5
Abreviaturas	6
Resumen	7
Abstract	9
1. Introducción	11
2. Antecedentes	13
2.1. Nanociencia y nanotecnología.	13
2.2. Nanomedicina y cáncer.	13
2.3. Clasificación de los nanomateriales.	15
2.3.1. <i>Clasificación por sus dimensiones</i>	15
2.3.2. <i>Clasificación por su morfología</i>	15
2.3.3. <i>Clasificación por su material de fabricación</i>	15
2.3.4. <i>Clasificación por su composición</i>	16
2.4. Métodos de síntesis de nanopartículas.	17
2.4.1. <i>Métodos químicos.</i>	19
2.4.1.1. <i>Síntesis por Precipitación-Calcinación</i>	19
2.4.2. <i>Métodos físicos.</i>	20
2.4.2.1. <i>Ablación láser pulsada en líquidos (PLAL)</i>	20
2.4.3. <i>Métodos biológicos.</i>	22
2.5. Regulación en nanopartículas	22
2.6. Nanopartículas de Lu₂O₃ y Sm₂O₃.	24
2.7. Radionúclido ¹⁷⁷Lu	25
2.8. Radionúclido ¹⁵³Sm.	25
2.9. ¹⁷⁷Lu₂O₃ NPs y ¹⁵³Sm₂O₃ NPs	26
2.10. Mecanismos de captación de las nanopartículas.	26
2.10.1. <i>Captación pasiva (E.P.R.).</i>	27
2.10.2. <i>Captación activa</i>	28
2.11. Funcionalización	29
2.11.1. <i>PSMA e iPSMA: moléculas que logran el reconocimiento molecular.</i>	29

2.12. Caracterización de nanopartículas.....	32
2.12.1. Espectroscopia de Absorción electrónica UV-Vis.....	32
2.12.2. Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).....	34
2.12.3. Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	35
2.12.4. Potencial zeta (ζ).....	35
2.12.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	36
2.12.6. Difracción de Rayos X (DRX).....	37
2.12.7. Análisis térmicos (DSC-TGA).....	37
2.13. Desarrollo de radiofármacos.....	39
3. Justificación.....	40
4. Hipótesis.....	41
5. Objetivos.....	42
5.1. Objetivo general.....	42
5.2. Objetivos específicos.....	42
6. Metodología.....	44
6.1. Síntesis P-C para la obtención de Lu ₂ O ₃ NPs y Sm ₂ O ₃ NPs.....	44
6.1.1. Síntesis Lu ₂ O ₃ NPs.....	44
6.1.2. Síntesis Sm ₂ O ₃ NPs.....	44
6.2. Preparación de los sistemas Lu ₂ O ₃ -iPSMA y Sm ₂ O ₃ -iPSMA-BN.....	45
6.3. Activación de Lu ₂ O ₃ [¹⁷⁷ Lu ₂ O ₃] NPs y Sm ₂ O ₃ [¹⁵³ Sm ₂ O ₃] NPs.....	45
6.4. Síntesis PLAL para la obtención de Lu ₂ O ₃ NPs y Sm ₂ O ₃ NPs.....	45
6.5. Preparación de los sistemas ¹⁷⁷ Lu ₂ O ₃ -iPSMA NPs y ¹⁵³ Sm ₂ O ₃ -iPSMA-BN NPs.....	46
6.6. Caracterización de los diferentes sistemas.....	46
6.6.1. Espectroscopia de Absorción electrónica UV-Vis.....	46
6.6.2. Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).....	47
6.6.3. Microscopía electrónica de barrido.....	47
6.6.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	47
6.6.5. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM).....	47
6.6.6. Difracción de Electrones de Área Selecta (SAED).....	48
6.6.7. Difracción de Rayos X (DRX).....	48
6.6.8. Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	48
6.6.9. Potencial Zeta (ζ).....	48
6.6.10. Análisis térmico (DSC-TGA).....	48
6.7. Caracterización biológica.....	49
6.7.1. Ensayos <i>in vitro</i>	49
6.7.1.1. Internalización celular.....	49

6.7.1.2.	<i>Viabilidad celular (XTT)</i>	50
6.7.1.3.	<i>Afinidad a receptores</i>	50
6.7.2.	Ensayos <i>in vivo</i>	51
6.7.2.1.	<i>Biodistribución</i>	51
6.7.2.2.	<i>Imagen óptica (luminiscencia)</i>	51
7.	Discusión de resultados	53
8.	Conclusiones	57
9.	Perspectivas	59
10.	Referencias	60
11.	Anexos	63
11.1.	Artículo de co-autoría	63
11.2.	Artículo de co-autoría	77
11.3.	Presentación en congreso	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de nanopartículas y usos más importantes	16
Tabla 2. Métodos de síntesis de nanopartículas	22
Tabla 3. Características fisicoquímicas estudiadas por las diferentes técnicas analíticas	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Métodos de síntesis de las nanopartículas (arriba-abajo y abajo-arriba).	18
Figura 2. Métodos de síntesis de las nanopartículas (químico, físico y biológico).....	18
Figura 3. Parámetros para la obtención de nanopartículas por PLAL.....	21
Figura 4. Mecanismos de captación pasiva y activa de nanopartículas.....	27
Figura 5. Captación mediada por receptores.	29
Figura 6. Estructura del antígeno prostático específico de membrana (PSMA) con sus tres dominios: CD (dominio citoplasmático), TM (transmembranal) y ED (extracelular).....	30
Figura 7. Estructura de la molécula de DOTA-HYNIC-iPSMA.....	31

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
AuNPs: Nanopartículas de oro
BFCA: (*ing*) Agente quelante bifuncional
BN: Bombesina
CT: Tomografía computarizada
Cys: Cisteína
DCM: Diclorometano
DMSO: Dimetilsulfóxido
DLS: (*ing*) Dispersión Dinámica de Luz
DOTA: 1,4,6,10-tetraazaciclodecano-1,4,7,10-tetracetico
DSC-TGA: (*ing*) Análisis Termogravimétrico acoplado a Calorimetría Diferencial de Barrido
EPR: (*ing*) Efecto de retención y permeabilidad mejorado
FDA: *U.S. Food and Drug Administration*
FT-IR: (*ing*) Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier
Gly: Glicina
GRP: (*ing*) Péptido liberador de gastrina
GRPr: Receptor del péptido liberador de gastrina
Gy: Gray (J/kg)
HRTEM: (*ing*) Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución
HYNIC: Ácido-6-hidrazinopiridin-3-carboxílico/ Hidrazinonicotinamida
ICRP: *U.S. International Commission on Radiological Protection*
IO: Imagen óptica
iPSMA: inhibidor del Antígeno prostático específico de membrana
iPSMA-BN: DOTA-PSMA(inhibidor)Lys3-Bombesina
Ln: Lantánidos
MBq: Megabequerel
MIRD: *U.S. Medical Internal Radiation Dosimetry*
MRI: (*ing*) Resonancia Magnética de Imagen
Nd:YAG: Neodimio-Granate Itrio-Aluminio
nm: Nanómetro
NMX/NOM: Norma Oficial Mexicana
NMs: Nanomateriales
NNI: (*ing.*) Iniciativa Nacional de Nanotecnología
NPs: Nanopartículas
OMS: Organización Mundial de la Salud
PET: (*ing*) Tomografía por Emisión de Positrones
PROY NMX: Proyecto de Norma Oficial Mexicana
PSA: Antígeno prostático específico
PSMA: Antígeno prostático específico de membrana
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
SAED: (*ing*) Difracción de Electrones de Área Seleccionada
SPECT: (*ing*) Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón
TEM: (*ing*) Microscopía Electrónica de Transmisión.
UV-Vis: Espectroscopía Ultravioleta Visible
XDR: (*ing*) Difracción de Rayos X
XTT: (2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazol-5-carboxilánilinda)

RESUMEN

A lo largo de los años el desarrollo de nanomateriales ha tenido un impacto positivo en diversas áreas por las ventajas, cualidades y propiedades novedosas que los materiales presentan en esta escala (1-100 nm en al menos una de sus dimensiones); una de ellas es la **nanomedicina**, en la cual se emplean sistemas basados principalmente en **nanopartículas** para el tratamiento y diagnóstico de diversas enfermedades, como el cáncer. Las nanopartículas se obtienen principalmente por los métodos bottom-up y top-down, de entre los cuales sobresalen la síntesis por precipitación-calcinación (P-C) y la síntesis por ablación laser pulsada en líquidos (PLAL) para la obtención de nanopartículas metálicas del tipo de sesquióxidos de lantánidos, específicamente de óxido de lutecio (Lu_2O_3 NPs) y óxido de samario (Sm_2O_3 NPs) por las ventajas que ofrecen en cuanto a la metodología involucrada y las características de los materiales obtenidos.

En el presente trabajo se sintetizaron por los dos métodos mencionados anteriormente nanopartículas de Lu_2O_3 y Sm_2O_3 que fueron funcionalizadas con las secuencias peptídicas DOTA-HYNIC-iPSMA y DOTA-HYNIC-iPSMA-BN respectivamente. Los sistemas obtenidos fueron analizados fisicoquímicamente con las técnicas analíticas correspondientes, antes y después de su activación por captura neutrónica llevada a cabo en el reactor Triga MARK III. Las nanopartículas de la síntesis P-C se obtuvieron con alta pureza y cristalinidad de acuerdo con sus planos cristalográficos obtenidos por XDR e indexados acorde a las cartas cristalográficas JCPDS No. 12-0728 (Lu_2O_3) y No. 15-0813 (Sm_2O_3), de morfología cuasi esférica de y con tamaños de entre 25-45 nm que después de ser conjugados con las secuencias peptídicas aumentaron sus tamaños a un intervalo de 30- 50 nm; los sistemas funcionalizados presentaron las bandas de vibración correspondientes a sus grupos funcionales por espectroscopía FT-IR, mismas que se replicaron en las bandas de absorción de los espectros UV-Vis observadas. Además, los valores de potencial zeta en todos los sistemas tuvo un valor absoluto mayor a los 25 mV. Por otra parte, con la síntesis PLAL se obtuvieron nanopartículas bimodales, donde las poblaciones más pequeñas (60-80 nm)

presentaron una morfología esférica mientras que la segunda población fueron fragmentos amorfos debidos a la expulsión del material precursor, con tamaños no definidos. Dichas características repercutieron en los difractogramas XDR, al observarse picos anchos y escasamente definidos, indicativos de su baja pureza y cristalinidad, rasgos que no permitieron la detección de luminiscencia tras su activación neutrónica.

Además, posterior a la irradiación neutrónica, los sistemas funcionalizados preparados ($^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs) se evaluaron *in vitro* en las líneas celulares HepG2 (PSMA+, GPRr+) y PC3 (PSMA-, GPRr+). Ambos sistemas mostraron mayores porcentajes de internalización, toxicidad y afinidad hacia las células con sobreexpresión de los respectivos receptores involucrados. Las radionanopartículas ($^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$) de la síntesis P-C permitieron la obtención de imágenes ópticas por sus propiedades radioluminiscentes mostradas, además de su biodistribución *in vivo* en ratones sanos Balb-C, observándose una mayor acumulación de las nanopartículas en hígado de ambos tipos de nanopartículas.

Estos resultados avalan el posible uso de nanopartículas funcionalizadas de los sesquióxidos Lu y Sm como nuevos radiofármacos para terapia molecular dirigida, así como su uso para imagen dual.

ABSTRACT

Throughout the years, the development of nanomaterials has had a positive impact in various areas due to the advantages and novel properties that materials show on this scale (1-100 nm in at least one of its dimensions); one of them is the nanomedicine, in which systems based mainly on nanoparticles are employed for the treatment and diagnosis of different diseases, like cancer. Nanoparticles are obtained mostly by the bottom-up and top-down methods, among which the syntheses by precipitation-calcination (P-C) and pulsed laser ablation in liquids (PLAL) stand out for obtaining metallic nanoparticles of the type on lanthanide sesquioxides, specifically lutetium oxide (Lu_2O_3 NPs) and samarium oxide (Sm_2O_3 NPs) because of the advantages offered in terms of the methodology involved and the characteristics of the materials obtained.

In the present work, Lu_2O_3 and Sm_2O_3 nanoparticles were synthesized by the two methods mentioned above, which were functionalized with the peptide sequences DOTA-HYNIC-iPSMA and DOTA-HYNIC-iPSMA-BN, respectively. The systems obtained were analyzed physicochemically with the corresponding analytical techniques, before and after their activation by neutron capture carried out in the Triga MARK III reactor. The nanoparticles of the P-C synthesis were obtained with high purity and crystallinity according to their JCPDS crystallographic cards No. 12-0728 (Lu_2O_3) and No. 15-0813 (Sm_2O_3), with a quasi-spherical morphology and with particle sizes between 25-45 nm that after being conjugated with the peptide sequences increased their particle sizes to 30-50 nm, the functionalized systems showed the vibration bands corresponding to their functional groups by FT-IR spectroscopy, that were replicated in the absorption bands observed in the UV-Vis spectra. Moreover, the zeta potential values had absolute values greater than 25 mV in all the systems. On the other hand, with the PLAL synthesis, bimodal nanoparticles were obtained, where the smallest population (60-80 nm) had spherical morphology, while the second ones were amorphous fragments due to the expulsion of the precursor material, with undefined sizes. Such characteristics have an impact in the XRD diffractograms, when broad and not poorly

defined peaks were observed, indicative of their low purity and crystallinity, features that did not allow the detection of luminescence after its neutron activation.

Furthermore, after neutron irradiation, the functionalized prepared systems ($^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs and $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs) were evaluated *in vitro* in the HepG2 (PSMA+, GPRr+) and PC3 (PSMA-, GPRr+) cell lines. Both systems, showed higher percentages of internalization, toxicity, and affinity towards cells with overexpression of the respective receptors involved. The radionanoparticles ($^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ and $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$) of the P-C synthesis allowed the obtention of optical images because of their radioluminescent properties shown, in addition to their *in vivo* biodistribution in healthy Balb-C mice, where a greater accumulation of nanoparticles in the liver of both types of nanoparticles was observed.

These results support the possible use of functionalized nanoparticles of Lu and Sm sesquioxides as new radiopharmaceuticals for targeted molecular therapy, as well as their use for dual imaging.

1. INTRODUCCIÓN

Los estudios y desarrollos tecnológicos en materiales funcionales de los últimos 20 años han dado muestra de las aplicaciones que pueden tener en diferentes y amplias áreas. Una de las áreas que mayor interés ha generado es la **nanociencia**, que se vale de las propiedades novedosas presentadas por los materiales a esta escala para poder emplearlas en diferentes ámbitos. Dentro de las distintas áreas de aplicación de esta ciencia destaca la **nanomedicina**, enfocada en el estudio de las interacciones entre células, moléculas y los nanomateriales (sustancias manipuladas como fragmentos moleculares, átomos y moléculas). De acuerdo con la Iniciativa Nacional de Nanotecnología (NNI por sus siglas en inglés), se define a los nanomateriales como aquellas partículas con tamaños que van desde aproximadamente 1 a 100 nanómetros (nm) en alguna de sus dimensiones [1-4].

A nivel biológico, el tamaño nanométrico ha resultado eficaz y permite a las nanopartículas desempeñarse como óptimos sistemas terapéuticos y de diagnóstico (sirviendo como transportadores y/o acarreadores farmacéuticos y agentes de contraste,), teniendo de esta forma un profundo impacto en la prevención, diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades.

El cáncer, definido por la OMS como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células (OMS, 2018), continúa siendo una de las enfermedades que a nivel nacional y mundial representa una de las principales causas de morbi y mortalidad. Actualmente, y a pesar de la ardua investigación realizada, sus altos porcentajes de incidencias recaen en la falta de métodos de diagnóstico y tratamiento eficaces y, que además limiten los efectos adversos en los pacientes. El uso de nanomateriales y nanosistemas centrado en esta patología se basa en sus cualidades que permiten la entrega de fármacos y/o el diagnóstico específico en tejidos blanco, minimizando los efectos adversos y su llegada a sitios no deseados, y, maximizando su entrega controlada. Sumando a estas características sus propiedades de ser sistemas biodegradables, biocompatibles y capaces de evadir los

procesos de degradación del cuerpo antes de producir su efecto[5]. Sumado a las ventajas ofrecidas por los nanosistemas, existe la posibilidad de integrar en ellos radionúclidos que les permitan ser utilizados como radiofármacos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Nanociencia y nanotecnología.

Etimológicamente, “nano” es un prefijo griego que significa “enano” o “algo muy pequeño” y representa una mil millonésima parte de un metro. Por lo cual el termino nanociencia, definido por primera vez en 1959 por Richard Feynman, se refiere a la ciencia multidisciplinaria que estudia las propiedades y fenómenos de las estructuras y moléculas en la escala manométrica (desde 1 y hasta 100 nm en al menos una de sus dimensiones). Por su parte, la nanotecnología es la ciencia aplicada; se centra en el diseño, caracterización, ensamble, manipulación y producción de estructuras, sistemas o dispositivos controlando sus tamaños y formas, al tiempo que se toman ventajas de las propiedades y fenómenos que se presentan a esta escala y que son completamente diferentes y nuevos [1, 6] [7] [3, 8] [5].

Las propiedades físicas y químicas novedosas mostradas por los nanomateriales tienen aplicaciones en amplias áreas (química, física, biología, medicina, óptica, ingeniería, electrónica y muchas más) y están completamente relacionadas con sus características: tamaño, forma y ambiente que las rodea. Buscar referencias tamaño y propiedades. [8] [5].

2.2. Nanomedicina y cáncer.

Dentro de estas áreas, es de interés en el presente estudio la nanomedicina, que se define como la aplicación de la nanotecnología para obtener nanomateriales útiles para diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades a nivel celular y molecular. Una característica de estos nanomateriales es que están formados por al menos dos componentes: a) el principio activo o la molécula biológicamente activa y, b) la misma nanopartícula que permite una función especial y esta además relacionada al diagnóstico, tratamiento o prevención de la enfermedad [1] [3] [9].

Una de las enfermedades en la que se ha enfocado el uso de los nanosistemas para su diagnóstico y tratamiento es el cáncer; padecimiento definido por la Organización Mundial de Salud (OMS) como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células.

Las estadísticas actuales posicionan al cáncer como una de las enfermedades con las cifras más altas en mortalidad y morbilidad en personas de ambos sexos a nivel mundial. En el plano nacional, la panorámica no es distinta y dicho padecimiento ocupa el tercer lugar de defunciones de acuerdo con las estadísticas reportadas por el INEGI para el año 2018. En este caso el cáncer colorrectal tiene el primer lugar, seguido del cáncer de próstata y de los cánceres de hígado y mama compartiendo el tercer lugar (OMS, 2018). En la actualidad, su diagnóstico se basa principalmente en exámenes morfológicos, mientras que el tratamiento se encuentra mayormente restringido a la quimioterapia, radiación y cirugía. Al ser una enfermedad que involucra numerosos sistemas fisiológicos celulares (desde la señalización celular hasta los procesos apoptóticos) es también altamente compleja e incomprensible, características que limitan el éxito de su diagnóstico y tratamiento [7], con la desventaja de tener en la mayoría de los casos diagnósticos tardíos y tratamientos con múltiples reacciones adversas. Una de las herramientas de mayor uso para su diagnóstico se basa en la obtención de imágenes por diferentes técnicas (PET, SPECT, CT, MRI, etc.), mismas que siendo adecuadas permiten una detección temprana de las enfermedades y/o el monitoreo de sus diferentes estadios, ayudan al desarrollo de la medicina individualizada y a la evaluación en tiempo real de la eficiencia terapéutica y quirúrgica. Dichos sistemas de diagnóstico deben cumplir con ciertas características: ser no invasivos, certeros, tener una alta sensibilidad y proporcionar una detección temprana, además de suministrar información objetiva sobre la supervivencia, función y localización celular. Por otro lado, la terapia basa su éxito en alcanzar la concentración adecuada del agente terapéutico en el sitio tumoral y además de esto, limitar dicha presencia en tejido no tumoral, para de esta forma minimizar el daño a las células normales.

Por la tanto, la nanotecnología enfocada en cáncer se basa en el desarrollo de sistemas que permitan la prevención, detección y tratamiento de manera selectiva y/o direccionada en un solo agente limitando efectos adversos, y en diversos estudios ha demostrado un impacto positivo cumpliendo estas acciones [7].

2.3. Clasificación de los nanomateriales.

De acuerdo con las características estudiadas, los nanomateriales (NMs) pueden tener diferentes clasificaciones, basadas ya sea en sus dimensiones, morfología, estado y composición química.

2.3.1. Clasificación por sus dimensiones

Fue elaborada por Pokropivny y Skorokhod y se basa en la dimensión en la que los electrones del material se pueden mover y se hace evidente la propiedad novedosa del nanomaterial, las dimensiones son:

- a) Cero dimensiones (0D): los materiales tienen tres dimensiones en la escala nanométrica en las que los electrones se encuentran confinados y se mueven libremente (moléculas, racimos, anillos, granos y puntos cuánticos).
- b) Una dimensión (1D): aquí los electrones están libremente en movimiento en el plano X siendo este el que confiere las propiedades al material (nanotubos, nanofibras, nanofilamentos, agujas, nanorresortes, nanoagujas, nanocables, etc.).
- c) Dos dimensiones (2D): los electrones del material pueden moverse en los planos X-Y y tiene una dimensión en el rango nanométrico (nanocapas o películas delgadas y los nanorecubrimientos).
- d) Tres dimensiones (3D): se habla de materiales nanoestructurados, razón por la cual los electrones presentes en esta materia tienen movimiento en los tres planos (X, Y, Z) [6] [10] [5].

2.3.2. Clasificación por su morfología

La clasificación morfológica toma en cuenta tres aspectos: la planitud o llanura de las nanopartículas, la relación entre su longitud y su radio (puede ser grande/alta o chica/baja) y su esfericidad. La morfología de los nanomateriales dicta en gran medida sus propiedades, así como las aplicaciones en que pueden ser empleados [10].

2.3.3. Clasificación por su material de fabricación

Los materiales pueden ser orgánicos o inorgánicos. Los primeros se obtienen típicamente mediante la precipitación de sales inorgánicas de metales y en su estructura cuentan con

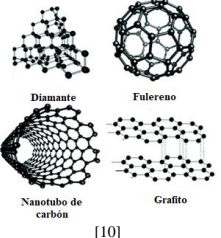
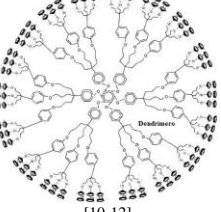
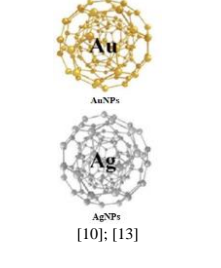
enlaces covalentes o metálicos; por su parte, los materiales considerados de naturaleza orgánica son comúnmente sintetizadas a partir de estructuras orgánicas más pequeñas (fragmentos lipídicos, proteicos, etc.) y cuentan con fragmentos polares y no polares como puntos clave para su formación.


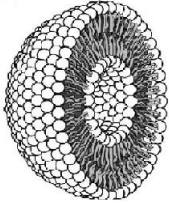

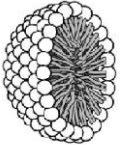
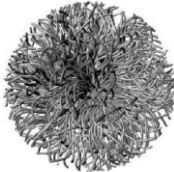
2.3.4. Clasificación por su composición

Por su composición las nanopartículas pueden tener muchas clasificaciones, sin embargo, pueden agruparse en tres grandes grupos: NPs de un solo componente, compositos y NPs orgánicas (excluyendo a las NPs de carbón son ejemplos los dendrímeros, micelas, liposomas y NPs poliméricas) e inorgánicas (NPs metálicas y de óxidos metálicos, puntos cuánticos, NMs semiconductores, NMs núcleo-coraza, etc.) [10] [5].

Las nanopartículas con mayor relevancia en nanomedicina se encuentran descritas en **Tabla 1.**

Tabla 1. Tipos de nanopartículas y usos más importantes

Tipo de NPs y descripción	Usos importantes	Referencias/ Dibujo
<p>Carbón</p> <p>Consisten en átomos de carbono con hibridación sp^2. Sus propiedades importantes incluyen las mecánicas, térmicas, y de conductividad. Tienen gran estabilidad química. Ejemplo: los fulerenos.</p>	<p>Terapia fototérmica; agente de imagen y acarreador de fármacos.</p>	 <p>[10]</p>
<p>Dendrímeros</p> <p>Estructura con ramificaciones de grupos repetidas, su superficie es fácilmente modificable y permiten la encapsulación de fármacos, son muy hidrosolubles y altamente estables.</p>	<p>Administración de fármacos de liberación controlada de manera, acarreador de agentes de imagen.</p>	 <p>[10-12]</p>
<p>Metálicas</p> <p>Se caracterizan por sus propiedades químicas, ópticas y eléctricas inusuales en tamaño nanométrico. Sus tamaños oscilan entre los 5- 50 nm. Destaca la presencia del Plasmón de Resonancia Superficial en AuNPs y AgNPs.</p>	<p>Radioterapia; imagen; acarreador de fármacos.</p>	 <p>[10]; [13]</p>

<p>Óxidos metálicos</p> <p>Sus principales aplicaciones se deben a la influencia del tamaño en su banda prohibida, mejorando sus características como materiales conductores. Algunos ejemplos: NPs de Ti_2O_3, Fe_2O_3, Al_2O_3, ZnO, SiO_2, etc.</p>	<p>Acarreador de fármacos; hipertermia magnética; agente de RMI.</p>	 <p>NPs de Óxido de hierro [10]; [13]</p>
<p>Liposomas</p> <p>NPs de autoensamblaje de fosfolípidos que forman una membrana cerrada. Tiene un núcleo acuoso útil para atrapar fármacos hidrosolubles, mientras que fármacos liposolubles pueden ser acarreados en su bicapa.</p>	<p>Acarreador de fármacos y agentes de imagen.</p>	 <p>Liposoma [12]</p>
<p>Puntos cuánticos</p> <p>Se trata de nanocristales con un tamaño entre 2-100 nm y excelentes propiedades ópticas y de EPR</p>	<p>Imagen de fluorescencia; terapia fototérmica; acarreador de fármacos.</p>	 <p>Puntos cuánticos [13]</p>
<p>Micelas</p> <p>Sistemas a base de copolímeros anfifílicos, de forma esférica, una capa hidrofílica y un núcleo hidrófobo; su tamaño oscila entre 20-200 nm.</p>	<p>Acarreador de fármacos y agentes de imagen.</p>	 <p>Micela [12]</p>
<p>Polímeros</p> <p>Sistemas a base de polímeros naturales o sintéticos y biocompatibles con un tamaño medio entre 10-1 000 nm.</p>	<p>Se usan principalmente para la entrega de fármacos como sistemas de liberación controlada.</p>	 <p>NPs poliméricas [12]</p>

2.4. Métodos de síntesis de nanopartículas.

De manera general los procesos de obtención y/o síntesis de nanopartículas se agrupan en dos categorías: “top-down” (de arriba hacia abajo) y “bottom-up” (de abajo hacia arriba).

Las metodologías basadas en el enfoque de top-down consisten esencialmente en la descomposición de la materia prima para obtener material en tamaño nanométrico. Mientras que el enfoque de bottom-up se basa en la acumulación (coalescencia o ensamble) de nanoestructuras: átomo por átomo o molécula por molécula hasta alcanzar la formación de la nanopartícula. [5] [1] [8]. La **figura 2 y 3** muestran los diferentes métodos de síntesis

nanopartículas de acuerdo con los enfoques de top-down y bottom-up y la clasificación física, químicas y biológico.

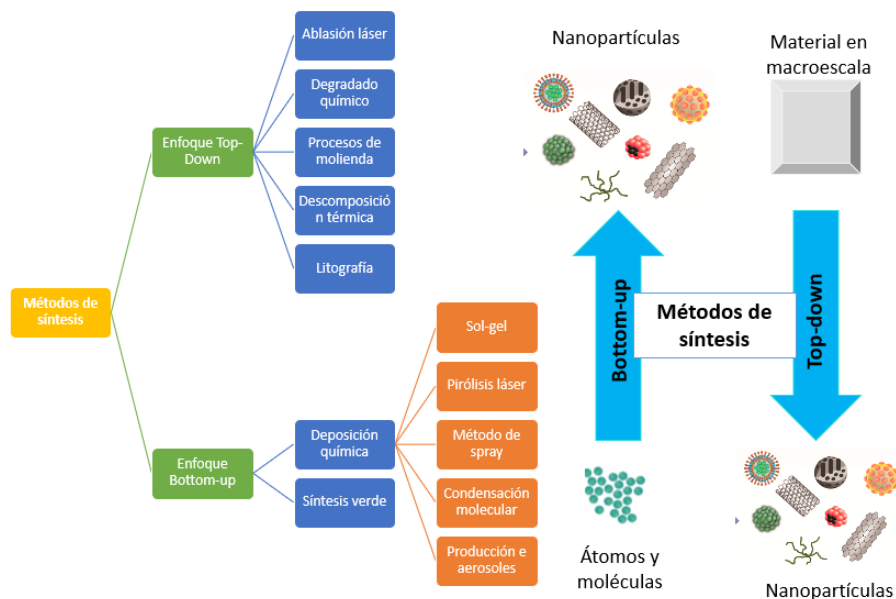


Figura 1. Métodos de síntesis de las nanopartículas (arriba-abajo y abajo-arriba). Tomado y modificado de [10, 14].

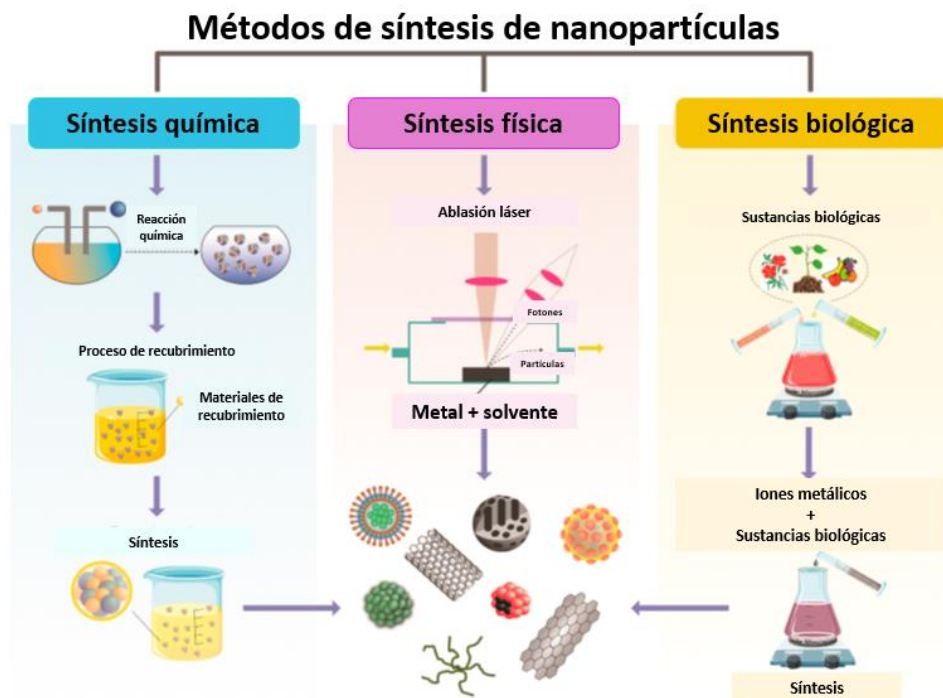


Figura 2. Métodos de síntesis de las nanopartículas (químico, físico y biológico). Tomado y modificado de [14].

Estos procesos se dividen en tres grupos generales: métodos físicos, químicos y biológicos.

2.4.1. Métodos químicos.

La síntesis química se realiza bajo el enfoque de bottom-up. La mayoría de los procesos involucran cationes solubles en agua que desencadenan la reducción de los materiales en sus monómeros correspondientes, proceso conocido como nucleación; seguido de esto está el crecimiento de las partículas que se lleva a cabo por el ensamble de varios racimos de partículas que es controlado por las diferentes variables involucradas en el proceso (temperatura, pH, temperatura, tiempo de reacción, etc.) o por agentes reductores o de recubrimiento[8, 14].

2.4.1.1. Síntesis por Precipitación-Calcinación

Este método se basa en dos pasos: primero se realiza la precipitación de la sal precursora para formar, el óxido del metal, hidróxido, carbonato y/o el hidroxicarbonato correspondiente. Se emplea una solución de la sal que contiene al metal y una solución precipitante (ácido o base) que formará al sólido precursor de las nanopartículas. El segundo paso es la calcinación, proceso que logra la oxidación del precursor hasta el óxido del metal correspondiente, generalmente se lleva a temperaturas mayores a 500 °C, dependiendo siempre del material utilizado, además ayuda a la formación de las nanopartículas con una adecuada morfología, pureza y homogeneidad. Las ventajas que tiene este método son: a) buena homogeneidad del producto, costo bajo, pureza relativamente alta, el proceso de precipitación se realiza a temperatura ambiente [15] [14].

De manera particular, las NPs de sesquióxidos o metales de tierras raras (RE), como las Lu_2O_3 NPs son precipitadas con carbonatos e hidróxidos de amonio obteniendo precursores del tipo $\text{RE}(\text{OH})(\text{CO}_3) \cdot x\text{H}_2\text{O}/\text{RE}_2(\text{CO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y sus temperaturas de calcinación son mayores a 800°C. Por otra parte, las Sm_2O_3 NPs son precipitadas con soluciones básicas de hidróxido de sodio para obtener su precursor hidratado $\text{RE}(\text{OH})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, que para permitir la formación de las NPs necesita temperaturas mayores a 600°C [15].

2.4.2. Métodos físicos.

Se basan en la aplicación de presión mecánica, radiaciones de alta energía, aplicación de energía térmica o aplicación de energía eléctrica con el fin de causar en el material precursor (material a granel o materia prima) ablación, fundición, evaporación o condensación y poder así generar las nanopartículas que generalmente tienen una alta pureza y uniformidad en tamaño y forma, aunque su rendimiento sea bajo. Los métodos incluidos en esta categoría generalmente se categorizan dentro de las estrategias top-down [14].

2.4.2.1. Ablación láser pulsada en líquidos (PLAL)

La ablación láser es un método simple pero muy caro, involucra la remoción del material de un sólido sumergido en un líquido (preferentemente translúcido) al ser irradiado con un rayo láser pulsado para la obtención de nanopartículas o micropartículas del mismo material. Así mismo, permite la obtención de nanopartículas funcionalizadas de forma *in situ* pues los líquidos de inmersión pueden ser tanto soporte del método, como medio de estabilización y/o conjugación. Las características y el tamaño del material obtenido dependen fuertemente de los parámetros experimentales, que se dividen en los asociados al material y los asociados láser (**Figura 3**) [14] [8]. Una de las mayores desventajas de este método es su bajo rendimiento, tanto por la obtención de partículas policristalinas (partículas que no logran el arreglo completo de los planos cristalinos), como por la baja masa de nanopartículas formadas durante cada experimento.

El proceso de ablación se puede dividir de forma general en tres grandes etapas:

- a) Absorción del láser por el material blanco: proceso que ocurre al tiempo cero y que tiene como finalidad entregar toda o la mayor parte de la energía del pulso en el objetivo, evitando entregar energía en el líquido. Uno de los efectos más importantes que se pueden inducir por la interacción del láser con el material es la ionización, misma que produciría una fotoionización inducida. Otro fenómeno posible es la termalización de las redes cristalinas, por lo cual la energía cinética de los electrones involucrados al ser liberada produciría emisión termoiónica, vaporización, ebullición e inclusive fusión del material, de manera simultánea con la fotoionización, sin embargo, estos últimos fenómenos se ven limitados por la capacidad eficiente que

tienen los sólidos para disipar el calor de casi instantáneamente, sin limitarse a que se presenten eventualmente. Los procesos de esta etapa siguen un mecanismo termodinámico nombrado “ebullición-explosiva”, que se alcanza cuando un sólido se sobrecalienta rápidamente a su temperatura crítica termodinámica, produciendo una descomposición vapor/líquida simultánea y tienen como resultado la formación de una columna de plasma que contiene los iones y/o fragmentos de material.

- b) Expansión de la columna de plasma: durante este evento se lleva a cabo la liberación de la energía del plasma tanto en el medio líquido circundante como en el material sólido, energía que puede producir degradación, ionización y/o pirólisis, siendo además el punto en el que se mezclan los componentes sólidos y las moléculas presentes en solución. La presencia de los productos finales sugiere que la temperatura alcanzada en este punto es tal, que permite la movilidad de los átomos y su subsecuente rearreglo en tamaños más pequeños o incluso la fundición del material.
- c) Emisión de una onda de choque: una vez que sucede la interacción entre la materia sólida y la solución se lleva a cabo casi de manera sincrónica la generación de una burbuja de cavitación y su subsecuente onda de choque debida a la extinción de la columna de la columna de plasma. La emisión de esta onda de choque se considera la fase final del proceso donde además tanto la temperatura como presión alcanzadas anteriormente sufren un decremento casi inmediato alcanzando valores similares a los del líquido circundante [14, 16-22].

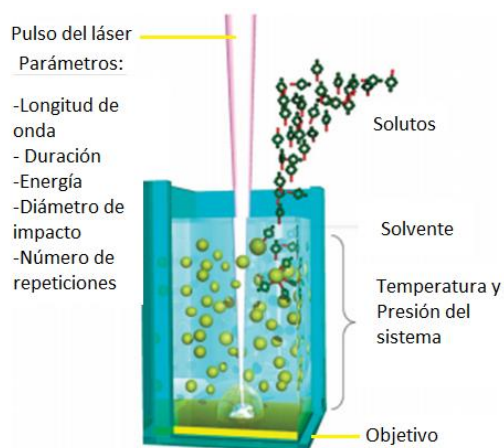


Figura 3. Parámetros para la obtención de nanopartículas por PLAL. Tomado y modificado de [20].

2.4.3. Métodos biológicos.

Su principal enfoque es el uso de sistemas biológicos (bacterias, hongos, virus, levaduras, extractos de plantas, etc.) para la síntesis de nanopartículas metálicas y de óxidos de nanopartículas metálicas [8].

La **Tabla 2**, concentra algunas de las metodologías más representativas de cada uno de los métodos de obtención de nanopartículas.

Tabla 2. Métodos de síntesis de nanopartículas

Métodos físicos	Métodos Químicos	Métodos biológicos
<p>Síntesis por combustión Aprovecha la energía exotérmica para superar la energía de activación y poder formar las NPs. Emplea un compuesto orgánico como combustible y reductor y una sal metálica como agente oxidante.</p>	<p>Reducción Se basa en la reducción de sales con agentes reductores como el citrato de sodio, ácido ascórbico, etc., resultando en la formación de un aglomerado de nanopartículas coloidales comúnmente protegidas con agentes como el PVA o el PEG.</p>	<p>Se trata de un enfoque ecológico y amigable con el medio ambiente que emplean extractos de plantas, flores, bacterias, hongos, levaduras, etc., más los compuestos precursores (sales inorgánicas) para la síntesis de las nanopartículas, sustituyendo los químicos comúnmente empleados para la reducción y recubrimiento.</p>
<p>Evaporación-condensación Se trata de la evaporación de metales, aleaciones o cerámicos permitiendo que reaccionen entre sí para después llevar a cabo la condensación con gases fríos y permitir la formación de las nanopartículas.</p>	<p>Co-precipitación Se basa en precipitación al mismo tiempo de las sales precursoras para la formación del nuevo compuesto en forma de NPs, la reacción se lleva a cabo en un medio ácido o básico, mismo que permite la disolución y formación del nuevo compuesto.</p>	
<p>Calentamiento haz de electrones Con la ayuda de un haz de electrones con alta temperatura se impacta el material para de esta manera formar las NPs.</p>	<p>Método sol-gel Primero se realiza la formación del sol mediante la disolución de un alcóxido metálico que es secado para formar una red polimérica que permita atrapar las moléculas del disolvente en el sólido (gel). Finalmente se seca y calcina del producto.</p>	
<p>Ablación láser Emplea un láser pulsado que impacta al material precursor a una energía y frecuencia determinadas para así formar las NPs.</p>	<p>Polimerización Sigue los pasos normales para una polimerización, pero uno de los factores claves de esta metodología es la formación de la microemulsión adecuada para la preparación de las NPs.</p>	

2.5. Regulación en nanopartículas

Debido al amplio campo de aplicación de las nanopartículas, organismos de diferentes países han establecido parámetros para su regulación, restricción e incluso prohibición de algunas aplicaciones de la nanotecnología.

Algunos de dichos organismos pertenecientes a la Unión Europea se encuentran listados a continuación:

- Comité de Medio Ambiente, Salud Pública y Seguridad Alimentaria del Parlamento Europeo: Dentro de sus funciones está la reciente prohibición de nanoingredientes en los alimentos a reserva de que estén correctamente evaluados por riesgo y etiquetados en los productos.
- Agencia Europea de Productos Químicos (ECHA): Realiza documentos para ofrecer más información de la aplicabilidad de nanomateriales.
- Comité Europeo de Normalización: Trabaja en la estandarización y etiquetado de productos que contienen nanomateriales.

Además de dichos organismos, existen diferentes programas de investigación en toxicidad de nanopartículas, entre los que destacan: *e-ICOON*, *FramingNano*, *Hinamox*, *NanoCharM*, *NanoMedNet*, *Nano-org*, *Nanosafety cluster* y *observatoryNANO*.

Respecto a Estados Unidos, existe la Iniciativa Nacional de Nanotecnología, en la que participan 25 agencias federales incluidas la FDA (*Food and Drug Administration*) y el NIST (*National Institute of Standards and Technology*), cuyo enfoque se centra en garantizar la seguridad y eficacia de productos que empleen nanomateriales. También existe el Laboratorio de Caracterización de Nanotecnología, encargado de la estandarización de nanomateriales de uso en el tratamiento de cáncer.

En México, existen 15 diferentes NMX (Norma Mexicana) y PROY-NMX (Proyecto de Norma Mexicana) a cargo de la Secretaría de Economía con contenido principalmente de conceptos referidos a la nanotecnología, y, de entre las que destacan como documentos de regulación en aspectos de riesgos ocupacionales, la NMX-R-12901-1-SCFI-2015: Nanotecnologías-Gestión de riesgo ocupacional aplicado a nanomateriales manufacturados. Parte 1: Principios y enfoques y el PROY-NMX-R-12901-2-SCFI-2016: Nanotecnologías: Gestión de riesgo ocupacional aplicado a nanomateriales manufacturados. Parte 2: Uso del enfoque de control por bandas [5].

2.6. Nanopartículas de Lu₂O₃ y Sm₂O₃

Un vasto grupo de materiales a escala nanométrica incluye a las nanopartículas de óxidos metálicos, dentro de este grupo son comunes aquellas de metales de transición (Fe₂O₃, CuO, ZnO, Ni₂O₃, etc.) debido a sus áreas superficiales grandes, sus ricos estados de valencia, su estabilidad química y térmica, sus propiedades adecuadas de conductividad y sus configuraciones electrónicas, todas estas características conllevan a sus buenas propiedades ópticas, magnéticas, de coordinación y eléctricas. Además de los elementos anteriormente mencionados, el grupo de los lantánidos (igualmente considerados metales de transición) es de particular interés principalmente, y además de las características ya descritas, por sus propiedades de luminiscencia que se presentan en el rango del UV-Vis e infrarrojo cercano. Sin embargo, a diferencia de los demás metales, los lantánidos son más comúnmente encontrados como iones dopantes (Ln³⁺) en estructuras tipo núcleo@coraza y en aplicaciones en campos que distan de la nanomedicina[23-29].

Lutecio, último miembro de esta familia, tiene como único estado de oxidación +3 de acuerdo con su configuración electrónica ([Xe]4f¹⁴ 5d¹ 6s²), por otro lado, un lantánido de igual manera es samario, con igual número de oxidación y una configuración electrónica descrita de la siguiente manera: [Xe]4f⁶ 6s². En ambos casos las configuraciones electrónicas de los elementos resultan importantes por distintos aspectos:

- a) La interacción spin-orbital de los electrones *f* resulta en un grupo grande de niveles de energía.
- b) Los electrones de los orbitales 5s, 5p y 6s tienen un efecto protector sobre los otros niveles, ocasionando que se vean nulamente afectados por factores externos.
- c) Existen intraconfiguraciones *f-f* de igual manera posibles por el efecto de blindaje de los niveles superiores, estas intraconfiguraciones resultan en propiedades ópticas con características únicas (cambios de Stokes grandes, tiempos de vida media prolongados, bandas de emisión estrechas y lineales, alta resistencia al parpadeo óptico, así como alta resistencia al fotoblanqueamiento y degradación fotoquímica) y no generan modificaciones en los enlaces químicos que el compuesto pueda formar con los electrones 5s y 5p. Estas intraconfiguraciones están asociadas a las 7 funciones de onda de los orbitales *f* (considerando los valores de spin + 1/2, - 1/2) que

permiten la obtención tanto de los estados basales como los cambios permitidos por resonancia, descritos en los diagramas de Dieke [30-32].

Aún con sus buenas características y propiedades, los sistemas basados en nanopartículas de óxido de lantánidos no se han utilizado como sistemas para radioterapia de blancos moleculares, razón por la cual en el presente trabajo se planteó su uso como agentes en un primer plano de terapia molecular dirigida y en un segundo, como agentes para imagenología dual (Rayos X y luminiscencia).

2.7. Radionúclido ^{177}Lu

^{177}Lu es un radionúclido emisor beta, con una máxima energía de emisión beta de 497 keV, utilizado comúnmente para aplicaciones terapéuticas, tiene un tiempo de vida media de 6.65 días y decae a ^{177}Hf con emisiones β^- de energías 497 keV, 384 keV y 176 keV. Además de la emisión beta, presenta emisión gamma dentro del rango útil para la toma de imágenes por gammagrafía, siendo sus principales emisiones: 208.37 keV (11.06%) y 112.95 keV (6.4%). La composición del lutecio natural es 97.4% de ^{175}Lu y 2.6% de ^{176}Lu . El radionúclido ^{177}Lu se puede producir de forma directa o indirecta. Para el método directo se emplea ^{176}Lu enriquecido (82%), (objetivo Lu_2O_3) que es bombardeado con un flujo de neutrones bajo la siguiente reacción $^{176}\text{Lu} \xrightarrow{(\eta,\gamma)} ^{177}\text{Lu}$, mientras que la producción indirecta sigue la siguiente reacción $^{177}\text{Yb} \xrightarrow{(\eta,\gamma)} ^{177}\text{Lu}$. Las mayores ventajas las tiene el método directo pues el isótopo radiactivo y el elemento precursor son el mismo elemento, por lo cual no es necesaria la separación o purificación química a pesar de la ligera contaminación que presenta con $^{177\text{m}}\text{Lu}$ ($t_{1/2}$ relativamente largo de 160.1 días) [33-41].

Entre los usos del ^{177}Lu se encuentran: unión a distintos sistemas para radioterapia mediada por receptores para cáncer, para mediar el dolor de huesos en casos de metástasis ósea y radiosinovectomía.

2.8. Radionúclido ^{153}Sm

^{153}Sm tiene baja abundancia de forma natural en la naturaleza, por lo cual su producción se realiza gracias a captura neutrónica (η, γ) utilizando objetivos del óxido de lantánido o con

^{nat}Sm enriquecido con ^{152}Sm . El radioisótopo producido por esta reacción tiene un tiempo de vida media de 46.27 horas y tiene dos tipos de decaimiento; sus emisiones β^- tienen energías de 808 keV (17.5%) y de 705 keV (49.6%) y las γ de 103 keV (29.8%), 69 keV (4.85%) y 635 keV (32.2%), y al igual que ^{177}Lu tiene características óptimas para su uso en terapia y diagnóstico [42, 43]. Algunas de las aplicaciones médicas del radioisótopo ^{153}Sm son: formación de complejos (hidroxipatita), para radiosinovertesis y en el tratamiento paliativo en metástasis óseas.

2.9. $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs

Las radionanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ no tienen reportadas aplicaciones de su uso en el ámbito clínico, por lo cual su adecuada síntesis y activación neutrónica permitiría crear sistemas novedosos para terapia molecular dirigida como potenciales agentes teranósticos (tratamiento e imagen), entre las ventajas que tienen estos sobre el uso de los iones de los radionúclidos, es la mayor cantidad y/o masa de estos en una misma partícula, permitiendo así la obtención de radiofármacos con actividades adecuadas para su uso médico directo.

2.10. Mecanismos de captación de las nanopartículas.

La eficacia del tratamiento anticancerígeno se basa en cuanto llega después de su administración al sitio de acción (con una concentración adecuada) además en que estando ahí ejerza su efecto de manera selectiva. Las dos formas principales en que las nanopartículas pueden ser entregadas en los tejidos tumorales es por direccionamiento pasivo (penetración a las membranas celulares facilitada por su tamaño nanométrico) o por el direccionamiento activo (enfoque que asegura su acumulación en el órgano, tejido o células blanco de forma selectiva y cuantitativa, limitando los efectos en los demás tejidos independientemente de la ruta de administración) **Figura 4** [44, 45] [46]

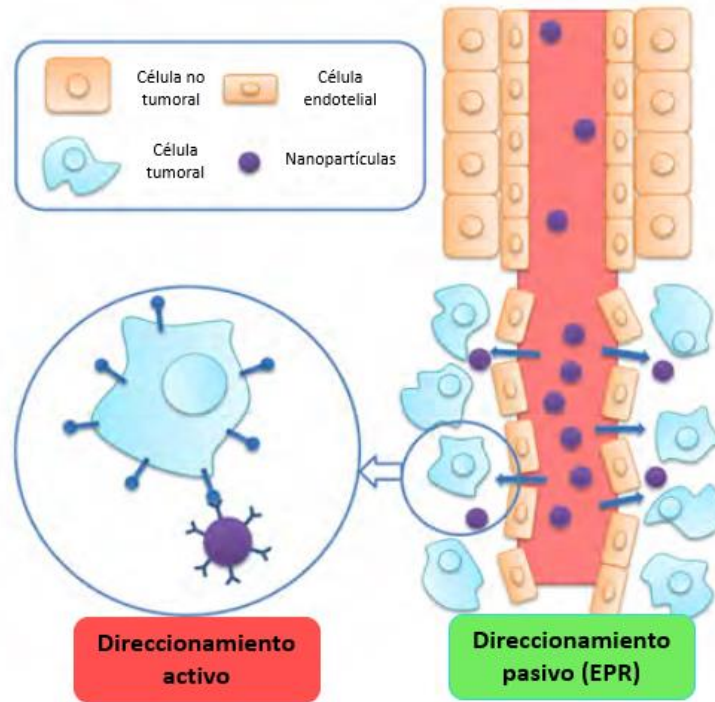


Figura 4. Mecanismos de captación pasiva y activa de nanopartículas. Tomado y modificado de [46]

2.10.1. Captación pasiva (E.P.R.).

La captación pasiva se refiere a la acumulación del sistema en el sitio deseado debido principalmente a sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Las características que favorecen la captación pasiva de los sistemas nanométricos son fundamentalmente su tamaño (50 nm en promedio), el microambiente tumoral y las propiedades de la vasculatura tumoral; mismas que inducen el efecto de permeabilidad de membrana mejorado (EPR, por sus siglas en inglés), donde nanopartículas con un tamaño de entre 50-500 nanómetros se ven ampliamente favorecidas. Lo anterior por que la vasculatura tumoral presenta “brechas” entre las células endoteliales de entre 600-800 nm debidas a la rápida vascularización del tumor, teniendo una vasculatura inevitablemente permeable y defectuosa, debido a que tienen niveles elevados de mediadores vasculares (bradiquininas, óxido nítrico, factores de crecimiento vascular, prostaglandinas, etc.), permitiendo así una mayor permeabilidad y retención de las nanopartículas y otras sustancias en el tejido tumoral. Es importante recalcar en este punto, que el efecto de EPR no ocurre en tejidos sanos[44-46].

Por otro lado, los nanosistemas de mayor estudio en aplicaciones biológicas son aquellos con un rango de tamaño más pequeño (20-50 nm) y a pesar de que su permeabilidad esta facilitada también tienen un mayor retorno a circulación pues su retorno también es mayor por difusión, razón por la cual se propone la creación de sistemas conjugados a moléculas biológicamente activas y dirigidas a blancos moleculares, que permitan aprovechar las cualidades de los tamaños nanométrico y mejorar la retención en el tejido tumoral de manera significativa.

2.10.2. Captación activa

La captación activa permite alcanzar los blancos moleculares a través de moléculas biológicamente activas que al ser conjugadas a la superficie de las nanopartículas permiten el reconocimiento específico de estos sistemas a través de receptores moleculares. Los receptores moleculares generalmente son proteínas o glicoproteínas de membrana que permiten la interacción de diferentes sustancias con los mecanismos del metabolismo celular,

Además, cambian su expresión según el estadio del cáncer, sobreexpresándose en la superficie de la membrana celular. Por otro lado, los ligandos a los receptores de membrana pueden ser péptidos, fragmentos peptídicos, proteínas, moléculas pequeñas o una combinación de varios tipos de biomoléculas específicas. La captación activa de manera particular en nanosistemas se ve aumentada por el efecto de EPR, que sigue estando activo, logrando un aumento en el tiempo de residencia en los tejidos de interés.

La razón principal del uso de biomoléculas radica en que la mayoría de las células cancerosas tienen una sobreexpresión en sus receptores, comúnmente debido a las altas tasas de replicación celular, y esta diferencia entre células sanas y enfermas permite que su uso sea tan efectivo en el mayor de los casos permitiendo además que se lleve a cabo una captación específica *vía* endocitosis mediada por receptores (RME). La RME es la ruta más común por la cual las NPs tienen acceso al interior celular y puede ser descrita en cinco pasos generales: a) las NPs funcionalizadas llegan al sitio tumoral, b) se lleva a cabo el reconocimiento y unión de los ligandos con sus receptores, c) Se desencadena un cambio conformacional en la membrana celular, d) el cambio conformacional promueve la formación de la invaginación de la membrana plasmática y, e) esta invaginación genera la formación de endosomas

tempranos (**Figura 5**). Otros factores que también influyen en la cinética de captación son el tamaño, la forma, la rigidez, la carga, concentración y los tiempos de incubación [44, 45]

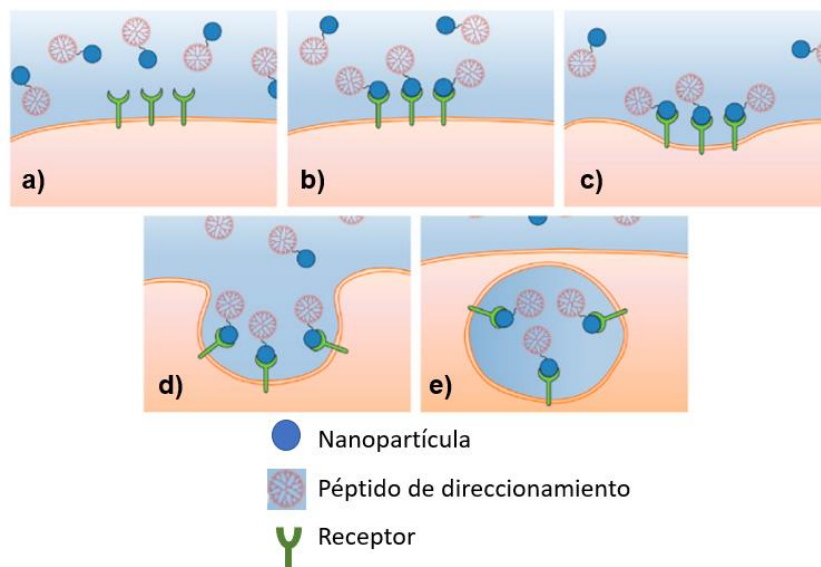


Figura 5. Captación mediada por receptores. Tomado y modificado de [45]

2.11. Funcionalización

Los objetivos de la funcionalización son generar sitios activos específicos y mejorar las características superficiales de las nanopartículas. Este proceso acarrea consigo ciertas ventajas pues se basa además en el principio de multimericidad, ocasionando que múltiples ligandos se unan a múltiples sitios de reconocimiento específico, potenciando así los eventos de interacción membrana celular-nanosistema a su vez que se incrementa la concentración de dichos sistemas en los sitios cancerosos y se evitan efectos tóxicos en tejidos y órganos sanos.

La funcionalización puede ser *vía* enlace tipo covalente o no covalente (tipo interacciones electrostáticas, Van der Waals y/o puentes de hidrógenos), y en el proceso es importante controlar las condiciones de reacción (temperatura de reacción, solventes, surfactantes, tiempo de reacción, etc.) para asegurar la completa y correcta formación del sistema.

2.11.1. PSMA e iPSMA: moléculas que logran el reconocimiento molecular.

El antígeno prostático específico de membrana (PSMA) o glutamato carboxipeptidasa II (GCP II) es una proteína integral multifuncional y transmembranal dependiente de Zn^{2+} ,

presente en las células epiteliales de próstata normales. Las funciones que realiza son: ser un receptor de internalización, una enzima de absorción de nutrientes, una peptidasa involucrada en la transducción de señales y ayudar en la motilidad celular. En células sanas, PSMA es internalizado constitutivamente desde la superficie celular por un mecanismo endocítico mediado por clatrina (CME), proceso en el cual cierto número de estos receptores son reciclados nuevamente a la superficie de la membrana celular. Estructuralmente tiene tres dominios: a) un dominio citoplasmático (CD) cuenta con un grupo amino terminal que contiene un motivo de orientación endocítica, b) una región transmembranal hidrofóbica (TM) y C) un dominio extracelular (ED) que cuenta con un carboxilo terminal siendo además altamente glicosilado (9 sitios de proteínas destinadas a utilizarse fuera de la célula). También, posee dos sitios catalíticos, uno con actividad de N-acilado-alfa vinculado a amino dipeptidasa (NAALADasa) y otro con actividad de folato hidrolasa (FOLH), como se puede observar en la **Figura 6** [34, 37, 38, 41, 47-52].

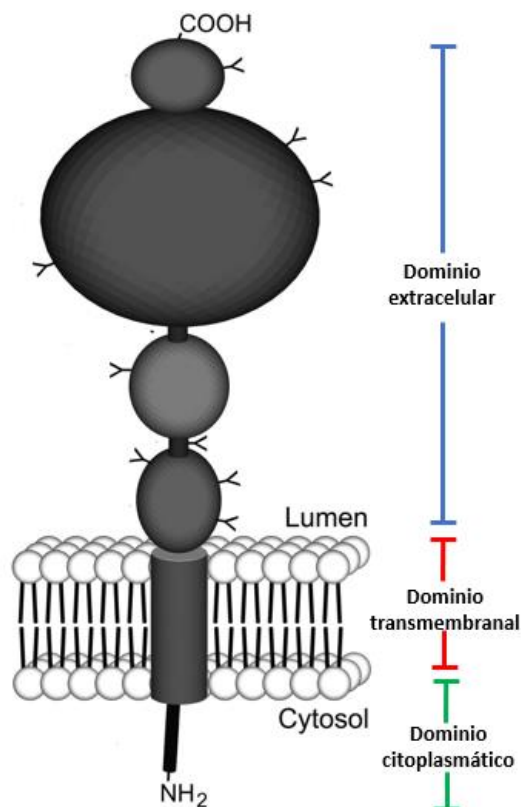


Figura 6. Estructura del antígeno prostático específico de membrana (PSMA) con sus tres dominios: CD (dominio citoplasmático), TM (transmembranal) y ED (extracelular).

PSMA es sobreexpresado en el 95% de los cánceres metastásicos de próstata; de igual manera se ha encontrado expresado en lesiones primarias, metastásicas y adenocarcinomas de próstata y en la neovascularización tumoral. Sus niveles de expresión están correlacionados con su dependencia a andrógenos y a la progresión de la enfermedad, mismos que aumentan de forma precipitada y proporcional a la agresividad del tumor a la vez su expresión es altamente restringida y con regulación positiva. Características que lo convierten en un candidato ideal como biomarcador clínico para el diagnóstico, tratamiento y manejo de cáncer de próstata, sin dejar de lado que también puede funcionar en otros tipos de neoplasias como gliomas, carcinomas hepáticos, osteosarcomas, cáncer de tiroides y cáncer metastásico de mama, pues en estos también se tiene sobreexpresión de este.

Efectivamente se pueden unir a PSMA anticuerpos, aptámeros y/o inhibidores. Dentro de la categoría de inhibidores y gracias al Zn contenido en sitio activo de PSMA, el inhibidor de PSMA (iPSMA) es propuesto como un vector de direccionamiento efectivo que se une efectivamente por 3 principales y diferentes interacciones químicas: 1) los 3 grupos carboxílicos del fragmento Glu-Urea-Lys interactúan electrostáticamente con los péptidos de cadena lateral del lado activo de PSMA, 2) el oxígeno de la urea se coordina con el Zn y 3) las estructuras aromáticas de β -naftilalanina interactúan con los sitios activos de la enzima. Una modificación de esta estructura es el péptido DOTA-HYNIC-iPSMA diseñado en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y sintetizado por Ontores Biotechnology Co. en la cual, HYNIC actúa como un sitio lipofílico adicional debido al anillo heterocíclico, mientras que DOTA sirve como agente quelante de diversos iones. La **figura 7** muestra la estructura de la molécula de DOTA-HYNIC-iPSMA.

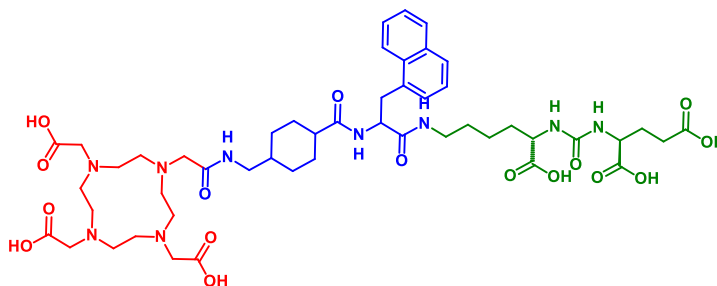


Figura 7. Estructura de la molécula de DOTA-HYNIC-iPSMA

2.12. Caracterización de nanopartículas.

Las técnicas de caracterización son realizadas para conocer las características de tamaño, forma, pureza, estabilidad, así como composición química de los sistemas sintetizados y comúnmente se dividen en dos grandes categorías, técnicas espectroscópicas y técnicas microscópicas. La **tabla 3** agrupa las técnicas empleadas, así como las características analizadas con cada una de ellas.

Tabla 3. Características fisicoquímicas estudiadas por las diferentes técnicas analíticas

Técnica	Característica analizada					
	Composición química	Número	Distribución de tamaño	Forma	Estado de agregación	Área superficial y carga
UV-Vis	✓					
FT-IR	✓					
DRX	✓					
XPS	✓					
DLS			✓		✓	
PZ						✓
Espectroscopía de fluorescencia	✓					
FRX	✓					
DSC-TGA						
SAED						
HRTEM						
TEM		✓	✓	✓	✓	

2.12.1. Espectroscopia de Absorción electrónica UV-Vis

La espectroscopia de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia T o de la absorbancia A de disoluciones que para ser analizadas se encuentran en cubetas/celdas transparentes, teniendo un camino óptico de la radiación normalmente en cm.

La absorción ultravioleta o visible por una especie (M) se puede considerar como un proceso de dos etapas: 1) una excitación electrónica como se muestra en la **Ec. (1)**, y 2) una relajación, siendo la forma más común la que supone la liberación de la energía como calor (**Ec (2)**).



Donde:

M^* : molécula excitada.

$h\nu$: fotón.

De manera general la absorción de radiación UV-Vis se debe a la excitación de los electrones de enlace, pudiéndose correlacionar estas bandas con los tipos de enlaces de las moléculas, permitiendo a su vez identificar ciertos grupos funcionales. Los grupos absorbentes en las moléculas se pueden clasificar por su tipo de transiciones electrónicas, que pueden ser:

- a) **Electrones tipo π , σ y η** : Incluyen iones y moléculas orgánicas. Por regla general, todos los compuestos orgánicos son capaces de absorber radiación pues contienen electrones de valencia que pueden ser excitados a niveles de energía superiores, sus espectros en general son complejos y con bandas anchas pues la superposición de las transiciones vibracionales sobre las transiciones electrónicas conduce a una compleja combinación de líneas solapadas. Los electrones presentes en los enlaces de estas pueden ser: π presentes en de los enlaces sencillos, σ provenientes de los enlaces dobles y η de los electrones no enlazantes; así como sus electrones antienlazantes correspondientes π^* y σ^* . Resultado de lo anterior las transiciones son: a) $\sigma \rightarrow \sigma^*$ (con máximos de absorción no observables en la región UV-Vis), b) $\eta \rightarrow \sigma^*$ (comunes en compuestos saturados con pares de electrones no compartidos), y, c) $\eta \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$. Estas últimas son la base de las transiciones que tienen los compuestos orgánicos y producen picos de absorción dentro de la región espectral experimentalmente accesible (200-700 nm), ambas requieren de grupos funcionales no saturados que aporten los electrones π (cromóforos).
- b) **Electrones d y f** : Para los lantánidos, los procesos de absorción son el resultado de las transiciones electrónicas de sus electrones $4f$. Una característica importante de sus espectros es la presencia de bandas de absorción con picos característicos, bien definidos y estrechos, y que al ser conjugados se ven muy poco afectados por el tipo de ligando asociado con el ión metálico.
- c) **Transferencia de carga**: para llevar a cabo este proceso se necesita un componente con características de dador de electrones y otro con propiedades de aceptor, tal es el caso de complejo hierro (III)/tiocianato.

El uso de la espectroscopia UV-Vis para el análisis de NPs es generalmente para confirmar los procesos de síntesis empleados para la obtención de las nanopartículas, así como para evaluar su estabilidad. La primera se confirma con base en la absorbancia de las muestras, que normalmente se encuentran en el rango de 220-800 nm. (10.3390/nano9121719). Por otro lado, la funcionalización con la biomolécula se evalúa por la presencia de las bandas provenientes de las transiciones $\eta \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ del compuesto.

2.12.2. Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).

El análisis por IR permite la identificación y localización de los grupos funcionales en una molécula, la región denominada media ($4000-600 \text{ cm}^{-1}$), es la principal herramienta para el estudio de compuestos orgánicos y biomoléculas. Los espectros de absorción y emisión infrarroja son el resultado de los distintos cambios energéticos producidos por las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros, siendo necesario que las moléculas sufran un cambio neto en su momento dipolar cuando vibran o giran para poder absorber la radiación infrarroja. La espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier emplea un dispositivo óptico (interferómetro) que produce una gráfica de intensidad contra el tiempo que se llama interferograma (contiene la información de la radiación absorbida para todas las frecuencias del haz inicial), esta información al llegar al detector es decodificada a una gráfica de intensidad de la luz transmitida vs frecuencia gracias a las transformadas de Fourier.

La espectroscopia Infrarroja resulta de gran importancia en el análisis de sistemas conjugados con biomoléculas pues permite conocer e identificar los grupos funcionales presentes, así como para identificar la formación de enlaces químicos nuevos entre las NPs y las biomoléculas y su presencia en la superficie de estas [14]. Por lo tanto, en la formación del sistema de NPs de lantánido-péptido, la importancia del análisis radica la presencia de las bandas del péptido en el mismo, puesto que las vibraciones correspondientes al núcleo del lantánido suelen ser entre una y dos, debidas a la vibración comúnmente lantánido-O, además, los cambios presentados entre los diferentes sistemas ayudan a dar seguimiento a la correcta funcionalización y dilucidar la forma en que se enlazan los componentes [6].

2.12.3. *Dispersión Dinámica de Luz (DLS)*

Se conoce también como espectroscopía de correlación de fotones y dispersión elástica de la luz. El fundamento de la técnica se basa en cómo una suspensión de partículas en movimiento Browniano al ser excitadas por un rayo láser ocasionan que este cambie su longitud de onda de entrada tras golpear a las nanopartículas, creando un cambio Doppler, que es un pequeño cambio de frecuencia en la luz dispersada en comparación con la no dispersada, este cambio proporciona información acerca del tamaño (diámetro hidrodinámico: D_H), y la distribución del tamaño, principalmente, aunque también puede dar información de la forma o estructura de las partículas con sus respectivas consideraciones. El D_H también llamado diámetro Stokes-Einstein o Diámetro de Stokes representa el diámetro teórico de una partícula esférica, razón por la cual puede variar significativamente con respecto al tamaño real de las partículas estudiadas, pues el análisis además está influenciado por parámetros como el tamaño físico real y su comportamiento relacionado al mismo, la estructura y textura superficial de las NPs, como la concentración y tamaño de los iones presentes en el medio de dispersión, temperatura de análisis, solvente empleado y ángulo de dispersión, es conveniente complementar los resultados con otras técnicas de análisis como TEM o DRX con análisis de Scherrer [6] [14]. El uso de esta técnica se empleó para estudiar la distribución de tamaño y el diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas antes y después de funcionalizarlas con el péptido iPSMA.

2.12.4. *Potencial zeta (ζ)*

Se define al potencial zeta como el promedio electrostático donde se unen la capa difusa y la capa de Stern del coloide en suspensión, normalmente a 0.2 nm de la superficie de las partículas. Su importancia radica en la información que proporciona acerca del comportamiento y estabilidad del coloide, sin significar que representa estrictamente la carga de la superficie de las partículas (potencial superficial) puesto que este potencial no puede medirse de forma directa. Sin embargo, la medición del potencial zeta en agua representa una buena aproximación del valor superficial y es uno de los métodos más directos para la caracterización de las superficies coloidales. Este valor se obtiene suministrando un campo eléctrico a través de la dispersión, donde el cambio en la frecuencia en la luz incidente debida a la movilidad de las partículas se convierte en el PZ utilizando la teoría de Smoluchowski o

Huckel. Siendo descrito de manera general que valores con un valor absoluto por encima de 25 mV son indicativos de sistemas con una buena estabilidad [14, 53-55].

Los análisis de ζ tuvieron como finalidad analizar el comportamiento, la estabilidad y los cambios en la “superficie” de las partículas al ser funcionalizadas con el péptido iPSMA.

2.12.5. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Dentro de las técnicas de análisis de nanopartículas, la Microscopía Electrónica de Transmisión resulta ser la herramienta más potente para determinar el tamaño y la distribución de tamaño de las partículas, así como su morfología y estructura cristalina [14]. La conjugación del péptido en la superficie de la nanopartícula se puede observar como una baja densidad electrónica alrededor de la nanopartícula de Lutecio.

La técnica se basa en un haz de electrones que son acelerados y manejados a través de lentes electromagnéticas, para irradiar a través de una muestra delgada al tiempo que va interaccionando con la misma. Los electrones irradiados son capaces de penetrar muchos planos atómicos y son difractados por las diferentes regiones cristalinas de los materiales, dando una imagen formada por los electrones que emergen, donde generalmente las zonas con elementos más densos suelen observarse más oscuros en la muestra; la técnica permite magnificaciones de 100 a 500 000 veces aproximadamente. Los principales componentes del microscopio electrónico de transmisión son: la columna óptica electrónica, el sistema de vacío, el sistema de enfriamiento, corrientes de alimentación y sus controles, y el dispositivo de registro de la imagen. En el microscopio de transmisión, los electrones se obtienen por emisión termoiónica a partir de un filamento usualmente de tungsteno que es calentado gracias a una corriente, una lente magnética proyecta el haz de electrones sobre una pantalla fluorescente donde es observada la imagen. El proceso de trayectoria de los electrones desde la fuente hasta la pantalla se realiza en u sistemas sellado y al vacío.

Uno de los factores más importantes para un adecuado análisis por TEM es la correcta preparación de la muestra para evitar aglomeración de las nanopartículas y garantizar la obtención de buenas imágenes. Generalmente las muestras se preparan secando una muestra representativa y diluida del material en una rejilla de cobre con recubrimiento de carbono.

Además de la obtención de la imagen, el microscopio de transmisión permite obtener información de otro tipo con el uso de detectores y equipo periférico apropiado, como los siguientes:

- *Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM).*

Es un estudio resultante de variaciones en los arreglos de los campos magnéticos que ayudan a focalizar el haz de electrones del microscopio electrónico de transmisión.

Las imágenes de HRTEM permiten estudiar la microestructura de los materiales con mayor resolución, ayudando a determinar la posición de los átomos dentro de los materiales.

- *Difracción de Electrones de Área Selecta (SAED).*

Si el material analizado es cristalino, los electrones sufren una difracción en distintas direcciones en función de su estructura cristalina; obteniéndose un patrón de difracción característico.

2.12.6. Difracción de Rayos X (DRX).

Se considera una de las técnicas más poderosas para estudiar la estructura cristalina de los nanomateriales y se fundamenta en la Ley de Bragg. Permite conocer el arreglo atómico, la posición e intensidad de los picos de difracción, así como el grado de cristalinidad y pureza de los materiales [14] [6].

El análisis se realiza colocando la muestra de forma compacta y exponiéndola al haz de rayos X que es difractado por cada átomo de la muestra en polvo a un ángulo de 2θ , la difracción de cada cristal forma el patrón cristalográfico. Para este patrón los rayos X dispersos muestran valores de intensidad máxima a ángulos específicos para los diferentes picos de un material en particular. Estos picos son el reflejo de las características estructurales y fisicoquímicas de los cristales contenidos en la muestra. Además de lo anterior, con los resultados obtenidos se puede calcular teóricamente el tamaño de partícula empleando la ecuación de Scherrer [6] [14].

2.12.7. Análisis térmicos (DSC-TGA)

Tanto el Análisis termogravimétrico como la Calorimetría Diferencial de Barrido pertenecen a las técnicas de análisis térmico, que tienen como finalidad determinar las

propiedades físicas de una sustancia y/o sus productos bajo un programa de temperatura controlado.

- *Calorimetría Diferencial de Barrido*

El fundamento de la técnica se basa en el registro de las variaciones de flujo de calor o de temperatura de una muestra, analizando el cambio de la Capacidad Calórica (C_p) de un material con respecto a la temperatura. Para esto, una muestra con una masa conocida y un material de referencia son calentados bajo parámetros definidos y considerando el principio de balance nulo (cualquier cambio en el valor de la entalpía experimentado por la muestra implica una adición energética, bien sea al crisol de referencia o a la muestra, con el objeto de mantenerlos a la misma temperatura), por lo tanto la energía térmica será exactamente igual en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, y el balance de energía proporcionará una medida calorimétrica directa de esta energía. Por lo tanto, lo que se mide es la energía suministrada requerida para mantener a la misma temperatura tanto a la muestra como al material de referencia (material inerte que no experimenta ninguna transición o transformación en el intervalo de temperatura a estudio). Los resultados obtenidos son de diferenciales de calor en función de la temperatura y proporcionan información sobre los efectos térmicos y los cambios que estos causan, dentro de los que se incluyen: la fusión, cristalización, sublimación, ebullición, transiciones vítreas, porcentaje de pureza, porcentaje de cristalinidad, etc.

- *Análisis termogravimétrico*

La termogravimetría ha sido desarrollada para identificar y medir los cambios físicos y químicos que sufren los materiales cuando son expuestos a variaciones controladas de temperatura. El análisis se basa en el registro continuo de la variación de la masa (perdida o ganancia) del material analizada cuando esta se somete a un programa controlado de temperatura (cambio de temperatura lineal a una rampa de temperatura) y en una atmósfera controlada. Los datos obtenidos del análisis termogravimétrico son del cambio de masa con respecto a la temperatura o al tiempo, representando gráficamente las variaciones porcentuales de la masa y los aspectos que pueden determinarse incluyen: el porcentaje de pérdida de peso por descomposición, deshidratación, pérdida de disolvente, absorción, etc.

De igual manera puede determinarse la estabilidad térmica u oxidativa, la descarboxilación y el porcentaje de aditivos. Comúnmente los equipos constan de: una balanza que registra la masa inicial, sus cambios durante el análisis y la masa final, un horno infrarrojo que provee la temperatura del análisis y un sensor de temperatura.

De manera global ambas técnicas ayudan a evaluar el estado fisicoquímico y posibles interacciones/ descomposiciones de los componentes de los materiales y al estar acopladas permiten identificar las posibles ganancias o pérdidas de peso y asociarlas a los diferentes fenómenos posibles.

2.13. Desarrollo de radiofármacos.

Un radiofármaco es una molécula orgánica que contienen en su estructura un átomo radioactivo y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación puede ser administrado a seres humanos para el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades. Los radiofármacos útiles en terapia molecular dirigida constan de tres componentes: el radionúclido, una molécula biológicamente activa o biomolécula que permita el reconocimiento específico y un agente quelante bifuncional (BCFA), encargado tanto de unir al radionúclido como a la molécula de vectorización.

La referencia a radiofármacos terapéuticos no implica un efecto farmacológico, ya que la molécula acarreadora del radionúclido (anticuerpo, péptido, oligonucleótido, aptámero, etc.) se administra a una concentración muy baja (traza) de forma que no perturbe el sistema bioquímico, actuando como un simple dispositivo médico que transporta al radionúclido a un blanco molecular específico, donde la energía de radiación depositada es altamente selectiva para eliminar a las células malignas.

Aunque no existe una bala mágica para el tratamiento de las enfermedades, las mejoras en los radiofármacos existentes, o la creación de nuevos con propiedades mejoradas son las alternativas a trabajar para de esta forma lograr tanto, tratamientos como diagnósticos más efectivos y sensibles con menos efectos adversos y adecuadas características para su producción (costo, facilidad, accesibilidad, etc.).

3. JUSTIFICACIÓN

La investigación de nuevos radiofármacos basados en nanopartículas para el tratamiento de cáncer es de interés mundial en el ámbito de la Salud por las prometedoras características que estos sistemas presentan. El desarrollo de estos fundamenta su éxito en los componentes involucrados en los nanosistemas, donde se permita que los radionúclidos contenidos en su estructura cumplan con las características fisicoquímicas y bioquímicas adecuadas para que logren un tratamiento y/o diagnóstico exitoso en los sitios blancos limitando además la llegada de estos a tejido y células sanas.

De manera general, las nanopartículas que cumplen con un tamaño adecuado (<50 nm) pueden acumularse de forma pasiva en tejido tumoral debido al efecto EPR, esta captación puede verse mejorada con el empleo de biomoléculas y moléculas biológicamente activas que permitan un reconocimiento específico por receptores (proteínas o glicoproteínas de membrana) que ampliamente se encuentran descritos estar sobreexpresados en las células tumorales y que los convierte en blancos moleculares adecuados. Por lo anterior, es de importancia la correcta elección de los métodos de síntesis para la obtención de las nanopartículas, logrando que estas cumplan con las características deseadas (morfología, tamaño, composición, etc.), y permitan además su facilidad para su conjugación y/o modificación superficial.

Con base en lo anterior, se planteó la obtención y disponibilidad de nanopartículas de óxido de lutecio y óxido de samario de manera fácil y rápida que permitan tener una masa suficiente de los lantánidos para obtener radiofármacos con actividades adecuadas para su uso médico directo, pudiendo estas ser además ser funcionalizadas con biomoléculas o moléculas biológicamente activas para un reconocimiento molecular específico en sitios tumorales. Permitiendo además que para el caso de ^{177}Lu , este pueda ser producido en el reactor Triga Mark III sin necesidad de adquirirse como radionúclido de importación.

4. HIPÓTESIS

Las propiedades estructurales y bioquímicas de los sesquióxidos de lantánidos Lu y Sm en forma de nanopartículas (Lu_2O_3 NPs y Sm_2O_3 NPs) funcionalizadas con péptido (Lu_2O_3 -iPSMA NPs y Sm_2O_3 -iPSMA-BN NPs) no se verán alteradas por efecto del proceso de irradiación neutrónica en el reactor Triga Mark III, permitiendo su potencial uso en el reconocimiento específico de sus receptores específicos de membrana: PSMA ($^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs) y PSMA y GRPr ($^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs), por lo cual será posible su uso como radiofármacos para radioterapia molecular dirigida.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Sintetizar por un precipitación-calcinación (P-C) y por ablación láser pulsada en líquidos nanopartículas de óxido de lutecio (Lu_2O_3 NPs) y óxido de samario (Sm_2O_3 NPs) funcionalizadas con un péptido y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas antes y después de su irradiación neutrónica, así como sus propiedades bioquímicas (reconocimiento molecular).

5.2. Objetivos específicos.

- a) Sintetizar por precipitación-calcinación nanopartículas de Lu_2O_3 y Sm_2O_3 .
- b) Caracterizar por TEM y DSC-TGA los precursores $\text{Lu}(\text{OH})(\text{CO}_3) \cdot x\text{H}_2\text{O}$ / $\text{Lu}_2(\text{CO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Sm}(\text{OH})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- c) Caracterizar por TEM, HRTEM, SAED, DRX, DLS, PZ y espectroscopias UV-VIS e FT-IR las nanopartículas de Lu_2O_3 y Sm_2O_3 obtenidas por P-C.
- d) Funcionalizar las Lu_2O_3 NPs y Sm_2O_3 con la secuencia peptídica iPSMA e iPSMA-BN, respectivamente.
- e) Caracterizar los sistemas Lu_2O_3 -iPSMA NPs y Sm_2O_3 -iPSMA-BN por TEM, DLS, PZ, UV-VIS e FT-IR
- f) Sintetizar por ablación láser pulsada en líquidos (PLAL) Lu_2O_3 NPs y Sm_2O_3 NPs empleando como medio de inmersión agua tipo 1.
- g) Sintetizar por ablación láser pulsada en líquidos (PLAL) Lu_2O_3 -iPSMA NPs y Sm_2O_3 -iPSMA-BN NPs empleando como medio de inmersión las soluciones peptídicas correspondientes.
- h) Caracterizar por TEM, HRTEM, SAED, DRX, DLS, PZ, FT-IR y UV-VIS las nanopartículas de Lu_2O_3 y Sm_2O_3 sintetizadas por PLAL.
- i) Caracterizar por TEM, DLS, PZ, FT-IR y UV-VIS los sistemas Lu_2O_3 -iPSMA NPs y Sm_2O_3 -iPSMA-BN sintetizadas por PLAL.

- j) Realizar la activación neutrónica de Lu_2O_3 NPs y Sm_2O_3 NPs sintetizadas por P-C y PLAL.
- k) Preparar los sistemas $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-B N con las nanopartículas obtenidas P-C y PLAL y activadas por captura neutrónica.
- l) Evaluar la internalización de los radionanosistemas $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs en células HepG2.
- m) Evaluar la citotoxicidad de los radionanosistemas $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs mediante el ensayo XTT en células HepG2.
- n) Evaluar la afinidad hacia PSMA de los radionanosistemas $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs en células HepG2.
- o) Evaluar la biodistribución in vivo de los radionanosistemas $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs y $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs en ratones sanos Balb-C
- p) Obtener los espectros de emisión de luminiscencia de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs.
- q) Evaluar la internalización de los radionanosistemas $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs en células HepG2 y PC3.
- r) Evaluar la citotoxicidad de los radionanosistemas $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs mediante el ensayo XTT en células HepG2 y PC3.
- s) Evaluar la afinidad hacia PSMA y GRPr de los radionanosistemas $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs en células HepG2 y PC3.
- t) Evaluar la biodistribución in vivo de los radionanosistemas $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs en ratones sanos Balb-C
- u) Obtener los espectros de emisión de luminiscencia de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs.

6. METODOLOGÍA

6.1. Síntesis P-C para la obtención de Lu_2O_3 NPs y Sm_2O_3 NPs

6.1.1. Síntesis Lu_2O_3 NPs

Se preparó una solución acuosa de LuCl_3 (10 mM), con agitación durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó por goteo una solución de 2 M de $\text{NH}_4\text{OH}:(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ en una relación 1:1 con agitación vigorosa y a temperatura ambiente hasta que ocurrió la precipitación y se alcanzó un pH de 9, una vez que obtenido el sedimento se continuó con la agitación durante 30 minutos más. Al término del tiempo, la suspensión precursora se centrifugó a 2500g durante 30 minutos con agua desionizada para su lavado, repitiendo el proceso hasta alcanzar un pH neutro. Después, la muestra se puso a secar a 110°C durante 24 h y finalmente se calcinó a 1100°C durante 24 h para completar el proceso de formación de las NPs.

6.1.2. Síntesis Sm_2O_3 NPs

Se utilizó una solución de Sm_2O_3 (19 mM) que se mantuvo en agitación durante 30 minutos para una completa homogeneización, posteriormente se adicionó HCl concentrado hasta observar la formación de una solución translúcida, indicando la formación del SmCl_3 correspondiente. A la solución anterior se le agregó una solución de NaOH 3M por goteo con agitación continua y a temperatura ambiente hasta la observación de la formación del precipitado (pH>12). La agitación se continuó durante 30 minutos más, posteriormente el precipitado fue lavado con agua desionizada vía centrifugación a 2500g durante 30 min hasta alcanzar un pH neutro. La muestra final se colocó en una placa de calentamiento a 90°C durante 24 horas y finalmente, el polvo obtenido se calcinó a 600°C durante 24 horas para completar el proceso de formación de las NPs.

6.2. Preparación de los sistemas Lu₂O₃-iPSMA y Sm₂O₃-iPSMA-BN

Con la finalidad de obtener un sistema específico y mejorar su eficacia terapéutica las ¹⁷⁷Lu₂O₃ NPs se funcionalizaron con la secuencia peptídica 1,4,7,10-tetraazociclododecano, *N*, *N*, *N*', *N*''''-ácido tetra-acético-hidrazinonicotinilo-Lys-(β-naftilalanina)-NH-CO-NH-Glu (DOTA-HYNIC-iPSMA) y las Sm₂O₃ NPs se funcionalizaron con la secuencia OH-Gu-CO-Lys{Nal-Cys[Pyr-Gln-Lys(maleidomidobutyl)-Leu-Gly-Asn-Gln-Tep-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂]-DOTA}-OH (iPSMA-BN).

El proceso se llevó a cabo colocando 10 mg de cada uno de los polvos de nanopartículas en una solución de citrato de sodio 5 mM para Lu₂O₃ NPs y 1 mM para Sm₂O₃ NPs, estas soluciones se colocaron en un baño de ultrasonido durante 30 minutos para resuspenderlas y homogeneizarlas. Por otro lado, se prepararon las soluciones peptídicas a una concentración de 1mg/ mL y se inyectaron 100 μL a cada tipo de nanopartículas, las mezclas se homogeneizaron durante 1 hora más. Al finalizar las muestras fueron purificadas por ultrafiltración a 2500g/30 min empleando unidades de filtración de 100 kDa para Sm₂O₃-iPSMA-BN y de 30 kD para Lu₂O₃-iPSMA.

6.3. Activación de Lu₂O₃[¹⁷⁷Lu₂O₃] NPs y Sm₂O₃[¹⁵³Sm₂O₃] NPs

¹⁷⁷Lu₂O₃ NPs y ¹⁵³Sm₂O₃ NPs se produjeron por captura neutrónica. Para la activación neutrónica se utilizaron de 100 mg cada tipo de nanopartículas (^{nat}Lu₂O₃ NPs y ^{nat}Sm₂O₃ NPs) que fueron irradiados en la posición SIFCA del reactor nuclear Triga MARK III del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares durante 20 horas a un flujo de neutrones de $1 \times 10^{13} \text{ n} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.

6.4. Síntesis PLAL para la obtención de Lu₂O₃ NPs y Sm₂O₃ NPs

Se utilizaron comprimidos circulares de 10 mm de diámetro y 3 mm de una masa de 400 mg de polvo de Lu₂O₃ y 300 mg de polvo Sm₂O₃ que se elaboraron por compresión manual (P=20.68 MPa). Por otro lado, los medios de disolución utilizados fueron: a) Solución de citrato de sodio 5 mM (Lu₂O₃ NPs) y 1 mM (Sm₂O₃ NPs), b) Solución peptídica de iPSMA(1mg/mL) y c) Solución peptídica de iPSMA-BN (1mg/mL). Durante cada experimento se colocó un comprimido en el fondo de un vaso de precipitados de un volumen

de 25 mL al cual se le adicionó la cantidad necesaria para alcanzar una altura aproximada de 1cm del líquido (~2 ml de solución). Antes de cada experimento el láser fue focalizado sobre la superficie del comprimido a una distancia focal de 20 cm; posteriormente las muestras se irradiaron empleando un láser de Nd:YAG (Quantel[®], modelo Q-smart 100) operado a una energía de 8.393 mJ/pulso para Lu₂O₃ NPs de 5.614 mJ/pulso para Sm₂O₃ NPs, una frecuencia de 10 Hz, una longitud de onda de 532 nm y una duración para cada irradiación de 10 minutos (n=3).

Una vez concluidas las repeticiones de cada experimento se recuperó el líquido donde se depositaron las NPs y en el caso de las nanopartículas suspendidas en soluciones peptídicas estas se purificaron con lavados repetitivos *vía* ultrafiltración (2500g/30 min) hasta la eliminación completa del péptido no enlazado (utilizando unidades de filtración MWCO 100/30 kDa; Merck-Millipore a 2500g/30 min).

6.5. Preparación de los sistemas ¹⁷⁷Lu₂O₃-iPSMA NPs y ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs

Para la preparación de los sistemas de radionanopartículas funcionalizadas se realizó primero la activación de los polvos de ^{nat}Lu₂O₃ NPs y ^{nat}Sm₂O₃ NPs obtenidos por ambas síntesis en el reactor Triga MARK III. Una vez obtenidas las radionanopartículas, el proceso de funcionalización se realizó de acuerdo con lo descrito en el numeral 6.2.

6.6. Caracterización de los diferentes sistemas

Para obtener evidencia de la formación de los nanosistemas se realizaron análisis fisicoquímicos en las diferentes fases de síntesis.

6.6.1. Espectroscopia de Absorción electrónica UV-Vis

Los espectros de absorción fueron adquiridos en un espectrofotómetro Perkin-Elmer LambdaBio con barridos en un rango de 200-350 nm en una celda de cuarzo de 1 cm. Las soluciones analizadas fueron: Lu₂O₃ NPs, Sm₂O₃ NPs, iPSMA, iPSMA-BN, Lu₂O₃-iPSMA NPs, Sm₂O₃-iPSMA-BN y los mismos sistemas después de su decaimiento radioactivo, las muestras emplearon como solvente agua Tipo I y se midieron recién preparadas.

6.6.2. *Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)*

Los espectros de infrarrojo se adquirieron en un equipo Perkin Elmer (Perkin Elmer System 2000) con una plataforma ATR (Reflexión total atenuada) por Transformada de Fourier. Las muestras analizadas fueron los mismos sistemas que en el UV-Vis además de los compuestos precursores de las nanopartículas ($\text{Lu}(\text{OH})(\text{CO}_3) \cdot x\text{H}_2\text{O}/\text{Lu}_2(\text{CO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Sm}(\text{OH})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Los espectros se obtuvieron en el intervalo de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ con un barrido de 20 y una resolución de 1 cm^{-1} .

6.6.3. *Microscopía electrónica de barrido*

Las micrografías de barrido se obtuvieron con un microscopio JEOL JSM 6510LV operado a 20 kV. Las muestras analizadas fueron los polvos secos y calcinados de las nanopartículas de Lu_2O_3 y Sm_2O_3 colocadas en portamuestras para SEM y se recubrieron con una capa delgada de oro ($\sim 15\text{ nm}$) utilizando un sistema Denton Vacuum DESK IV.

6.6.4. *Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)*

Las micrografías se obtuvieron con un microscopio JEM 2010 HT operado a 200 kV. Para poder obtener las imágenes las muestras se montaron por evaporación de $10\text{ }\mu\text{L}$ de la solución de NPs en rejillas de cobre para microscopía cubiertas con carbono. Las muestras analizadas fueron: los precursores de ambos tipos de nanopartículas obtenidos por la síntesis P-C, las nanopartículas de Lu y Sm solas (síntesis P-C y PLAL), así como los correspondientes sistemas funcionalizados (P-C y PLAL). Las nanopartículas y sistemas de ambas síntesis se analizaron antes de su activación neutrónica y después de su decaimiento radioactivo. Los tamaños de partícula se cuantificaron utilizando el programa ImageJ contando al menos 600 nanopartículas.

6.6.5. *Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)*

Las imágenes de Microscopía Electrónica de Alta Resolución se obtuvieron con un microscopio JEM 2010 HT operado a 200 kV con muestras montadas en rejillas de cobre y recubiertas con carbono para microscopía a magnificaciones de $50\text{ }000\times$ y $80\text{ }000\times$. La indexación de los planos cristalográficos se realizó utilizando el programa ImageJ. Las muestras analizadas fueron Lu_2O_3 NPs y Sm_2O_3 NPs de la síntesis P-C.

6.6.6. *Difracción de Electrones de Área Selecta (SAED)*

Las imágenes de Difracción de electrones de área selecta se obtuvieron con un microscopio JEM 2010 HT operado a 200 kV con muestras montadas en rejillas de cobre y recubiertas con carbono para microscopia y empleando el modo de difracción, las muestras analizadas fueron las mismas que el numeral 6.6.5. La indexación de los planos cristalográficos se realizó utilizando el programa ImageJ y las cartas cristalográficas JCPDS correspondientes.

6.6.7. *Difracción de Rayos X (DRX)*

Los espectros de Difracción de Rayos X se obtuvieron en un difractorémetro Burker D8 DISCOVER utilizando una fuente de rayos X de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.15406$ nm) con un voltaje de operación de 35 kV y una corriente de 25 mA. El intervalo de obtención del ángulo 2θ fue de $15^\circ - 90^\circ$ y las muestras analizadas fueron: precursores $\text{Lu}(\text{OH})(\text{CO}_3) \cdot x\text{H}_2\text{O}/\text{Lu}_2(\text{CO}_3)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Sm}(\text{OH})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (síntesis P-C) y Lu_2O_3 NPs y Sm_2O_3 NPs (síntesis P-C y PLAL).

6.6.8. *Dispersión Dinámica de Luz (DLS)*

La determinación del diámetro hidrodinámico se realizó por Dispersión Dinámica de Luz utilizando un analizador Nanotracs wave MN401. Las muestras fueron soluciones acuosas de las nanopartículas solas y conjugadas antes y después de la activación neutrónica y se analizaron por triplicado.

6.6.9. *Potencial Zeta (ζ)*

El valor de potencial zeta se determinó en un equipo Nanotracs wave MN401. Las muestras fueron soluciones acuosas de las nanopartículas solas y conjugadas antes y después de la activación neutrónica y se analizaron por triplicado con una longitud de onda de 657 nm, 21°C , corriente de 15.79 mA, campo eléctrico de 14.38 V/cm y tiempo de muestreo de 128 μs .

6.6.10. *Análisis térmico (DSC-TGA)*

Las curvas termogravimétricas se obtuvieron con un equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido acoplado a Análisis Termogravimétrico en un equipo y software STD Q600 V20.9

Build 20. Los parámetros de medición consideraron una rampa de calentamiento de 10°C/min (de 20°C-100°C) bajo atmósfera de nitrógeno. Para el análisis las muestras utilizadas fueron los precursores de Sm y Lu, con la finalidad de estudiar las reacciones de descomposición de los compuestos hasta su óxido correspondiente.

6.7. Caracterización biológica

6.7.1. Ensayos *in vitro*

Para los análisis *in vitro* se utilizaron dos líneas celulares: la primera fue la línea celular positiva a PSMA de carcinoma hepatocelular HepG2 (ATCC® HB-8065™), las células se cultivaron a 85% de humedad, 5% CO₂ y 37°C en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) que fue suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomina y 100 unidades/mL de penicilina. La segunda línea celular fue la de adenocarcinoma de próstata, PC3, que fue cultivada bajo las mismas condiciones que la anterior, pero en medio RPMI-1640.

6.7.1.1. Internalización celular

Los experimentos de internalización para ¹⁷⁷Lu₂O₃ NPs y ¹⁷⁷Lu₂O₃-iPSMA NPs se realizaron en células HepG2 y para ¹⁵³Sm₂O₃ NPs y ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NP en células HepG2 y PC3, para esto se utilizaron por triplicado suspensiones celulares de 4x10⁵ células en 500 µL de PBS que se colocaron en tubos de ensayo. Las células se dividieron en tres grupos de tratamiento que fueron los siguientes: a) 37 kBq de ¹⁷⁷Lu₂O₃ NPs o ¹⁵³Sm₂O₃ NPs, b) 37 kBq de ¹⁷⁷Lu₂O₃-iPSMA NPs o ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs y c) grupo control (sin tratamiento). Las células tratadas con el radionúclido ¹⁷⁷Lu se dejaron incubar a diferentes tiempos (0.5 h, 3h y 24h) mientras que las tratadas con el radionúclido ¹⁵³Sm se dejaron incubar a un tiempo (1h). Una vez concluidos los tiempos de incubación se midió la actividad inicial (volumen total de los tubos) que representó el 100%. Posteriormente las muestras se centrifugaron (700g/5min) para retirar el sobrenadante y medir la actividad del botón, después el botón se incubó con 1 mL de NaOH 1M durante 5 minutos; pasado el tiempo se volvieron a centrifugar (700g/5min); se retiró el sobrenadante y se midió la actividad del botón que se utilizó para determinar el porcentaje de internalización.

6.7.1.2. Viabilidad celular (XTT)

La viabilidad celular se realizó en las mismas líneas celulares descritas en el ensayo de internalización para los radionanosistemas de lutecio y samario. Los análisis se ejecutaron mediante el ensayo XTT, sembrando en placas de 96 pocillos una densidad celular de 1×10^4 células/pocillo que se incubaron durante 24h (37°C , $5\% \text{CO}_2$ y 85% de humedad) y se dividieron en tres grupos. Transcurrido el tiempo de incubación se eliminó el medio de los pocillos y se colocaron los diferentes tratamientos (a) 37 kBq de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs o $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs, b) 37 kBq de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs o $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs y c) grupo control (sin tratamiento), las células se dejaron incubar durante 1 h; transcurrido el tiempo el tratamiento fue retirado y las células se lavaron por duplicado con PBS, se adicionó medio fresco y se colocaron en incubación por 72 h, una vez finalizado el tiempo se agregó en los pocillos $100 \mu\text{L}$ de PBS y $50 \mu\text{L}$ de reactivo XTT y las células se dejaron incubar durante 4h más para permitir la conversión del XTT a formazan por las células viables. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de microplacas considerando al grupo control como el 100% para la obtención de los porcentajes de viabilidad.

6.7.1.3. Afinidad a receptores

La afinidad hacia los receptores PSMA y GRPr se realizaron mediante un ensayo de saturación. Se utilizaron las mismas líneas celulares descritas anteriormente para cada tipo de nanopartículas, para lo cual se incubaron ($n=3$) una densidad celular de 1×10^6 células/pocillo en placas de seis pocillos durante 24 h para permitir la adherencia celular (37°C , $5\% \text{CO}_2$ y 85% de humedad). Tras el tiempo de incubación las células se colocaron en baño de hielo durante 30 min, posteriormente las células se incubaron con siete diferentes concentraciones de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs o $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs (90 nM - $0.25 \text{ nm}/200\mu\text{L}$) por 2 h a 4°C . La captación no específica se determinó en paralelo mediante la adición de “péptido frío” (iPSMA o iPSMA-BN, 1 mol/L) como agente bloqueante previo a la adición de los radionanosistemas. Al término del tiempo se retiró el medio por completo y las células se lavaron por duplicado con PBS frío, posteriormente se adicionó 1 mL de NaOH para lisar las membranas celulares y se midieron las actividades de la fracción libre (sobrenadante) y de la fracción unida (ligada e internalizada en las células). Todas las medidas se normalizaron utilizando un estándar de actividad conocida de los sistemas

$^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs. La afinidad específica se calculó como la diferencia de la actividad total menos la actividad no específica. Los valores de K_d y B_{max} se determinaron por un análisis de regresión no-lineal utilizando el software GraphPad Prism.

6.7.2. Ensayos *in vivo*

Para los análisis *in vivo* se utilizaron ratones macho Balb-C de un peso promedio de 18-30 g y una edad de entre 6-12 semanas. Los ratones se mantuvieron bajo los lineamientos éticos para el cuidado de animales de laboratorio establecidos en la NOM-062-ZOO-1999.

6.7.2.1. Biodistribución

Para el análisis de biodistribución se inyectó a los ratones vía intravenosa a través de la cola caudal con los sistemas $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs (100 μL , 74 MBq), estos se sacrificaron a las 0.5, 3, 24 y 96 h (n=3 para cada tiempo) y se pesaron y midió la actividad de los diferentes órganos (sangre, corazón, pulmones, hígado, páncreas, bazo y riñones) para determinar el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido con respecto a la actividad total inyectada. Se utilizó un estándar de actividad conocida que representó el 100% de la actividad administrada.

6.7.2.2. Imagen óptica (luminiscencia)

Las imágenes ópticas de luminiscencia se obtuvieron tanto de los polvos de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs y de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs, como de estos sistemas administrados en roedores Balb-C en un equipo Bruker Preclinical Optical/ XRay Imaging System *in vivo* XTREME; no se utilizaron filtros de emisión para verificar la radioluminiscencia y se emplearon filtros de 535, 600, 700, 750, 790 y 800 nm con la finalidad de obtener el espectro de intensidad de emisión de luminiscencia (fotones/segundo/ mm^2 vs longitud de onda). Se obtuvieron las imágenes de Rayos X de los viales que contenían los polvos de las radionanopartículas para corroborar su posición y su luminiscencia. Las imágenes de los ratones se obtuvieron sin filtros de emisión de los ratones completos a los 2 min, 120 min y 24 horas después de ser administrados con $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (74 MBq, 1 mg) y después de 3 h en los animales administrados con $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs, para poder tomar las imágenes los animales fueron anestesiados con oxígeno y 2% de isoflurano en posición

supina. Los polvos de las nanopartículas de $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs fueron fotografiados antes y después de su irradiación neutrónica en la oscuridad, con la finalidad de apreciar las diferencias en color y la radioluminiscencia que son observables a simple vista, lo cual no se pudo realizar con los polvos de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs pues la luminiscencia no fue observable a simple vista.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La síntesis de nanopartículas de óxido de lutecio y óxido de samario por el método de precipitación-calcinación resultó en una ruta relativamente fácil y rápida. Como ha sido reportado, la homogeneidad en su composición sucedió durante la precipitación. En el caso de las nanopartículas de Lu_2O_3 los aniones de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ actuaron como agentes precipitantes, mientras que los aniones de NH_4OH tuvieron por función la regulación del pH necesario en el proceso (pH~9), mientras que para Sm_2O_3 NPs la fase oxiclorigenina de lutecio intermediaria ($[\text{Sm-O-Cl}]$), complejo covalente de distintas capas entre los iones $(\text{SmO})_n^{+n}$ y Cl^- , fue la especie que controló la cinética del proceso de nucleación y formación del precipitado ($\text{Sm}(\text{OH})_3$) hidratado. Por otro lado, la segunda fase del proceso, la calcinación, influyó en la pureza y aglomeración del material (reflejado en el tamaño menor a 50 nm con poblaciones monodispersas y monomodales). Las ventajas de este método fueron: facilidad, rapidez, condiciones de reacción de fácil manejo (temperatura y presión ambiental y medio acuoso) y su buen rendimiento (mayor a 75%); este último se puede asociar al intercambio que existe prácticamente solo entre los elementos de los precursores y las nanopartículas finales (C, H, N, O y Sm/Lu), donde además los iones Na^+ y Cl^- no tienen mayor influencia y los reactivos limitantes fueron los compuestos que incluían en su fórmula química a los lantánidos.

Por otro lado, las nanopartículas sintetizadas por PLAL fueron de mayor tamaño (60-80 nm) y de poblaciones bimodales con morfología de dos tipos: 1) esférica y bien definida y 2) amorfa, que se puede explicar por la cantidad de eventos involucrados en el proceso, tanto de naturaleza química (nucleación y crecimiento) como física (expulsión de fragmentos). La producción de los dos tipos de poblaciones mermó el rendimiento de nanopartículas que cumplan con las cualidades idóneas para las aplicaciones planteadas y para la detección del efecto de luminiscencia, siendo esto, la mayor desventaja del método.

Para corroborar la formación de las NPs de óxidos de lantánidos Lu y Sm y de sus correspondientes sistemas funcionalizados se realizaron distintos análisis fisicoquímicos, que

globalmente dieron información sobre las cualidades morfológicas y de composición química al mismo tiempo que se complementaron. En este aspecto, los análisis térmicos (DSC-TGA) reflejaron el comportamiento de descomposición térmica hasta la formación de las NPs; los datos experimentales de los porcentajes totales de pérdida de masa (Lu_2O_3 NPs ~27% y Sm_2O_3 NPs ~16%) coincidieron con aquellos reportados en la literatura, siguiendo además para Lu los estadios de descomposición que los carbonatos de metales de tierras raras presentan (a: deshidratación, b: descarbonatación parcial y c: descarbonatación completa) y para Sm los correspondientes a los hidróxidos de lantánidos.

Una vez obtenidas las nanopartículas se analizar sus aspectos cristalográficos, y de acuerdo con los resultados obtenidos se corroboró la pureza, cristalinidad, identidad del material, estabilidad coloidal y formación de los materiales esperados después del proceso de calcinación. Estas características también se evidenciaron por UV-Vis por la presencia de sus bandas características (Lu_2O_3 NPs ~216 y Sm_2O_3 ~204 nm) asociadas también a su estructura química y tamaño nanométrico, y por FT-IR con las bandas de vibración entre los lantánidos y el oxígeno de las nanopartículas (~575 cm^{-1} de la vibración Lu-O y, ~580 cm^{-1} de la vibración Sm-O), bandas también reportadas como indicio del tamaño nanométrico de los materiales, la completa cristalización (a la estructura cúbica) y la pureza en el proceso de formación de los óxido metálicos.

Los sistemas funcionalizados mostraron cambios en los resultados analíticos de sus correspondientes sistemas solos. En cuanto a los aspectos morfológicos el péptido se observó en las micrografías TEM como una baja en la densidad electrónica alrededor de las NPs por la menor interacción entre los electrones acelerados y las moléculas del péptido, aumentando además el tamaño de ambos sistemas aumento tras su análisis en ~3 nm, pero conservando la morfología cuasi-esférica inicial. Su estabilidad coloidal se observó en los sistemas solos (PZ mayor a |25 mV|) y se vio mejorada en sus respectivos sistemas funcionalizados (PZ mayor a |35 mV|). Referente a su composición química, los espectros UV-Vis mostraron la aparición de bandas que los péptidos libres tienen (solapamiento a ~226 nm para Lu_2O_3 -iPSMA, y bandas a 232 nm y 285 nm para Sm_2O_3 -iPSMA) y la conservación de las bandas de las nanopartículas con ligeros desplazamientos de ~ 2 nm; estos pequeños pero evidentes desplazamiento se deben al bajo efecto que los ligandos pueden tener en los iones metálicos,

pues sus las bandas de absorción de los iones lantánidos involucran a los electrones $4f$ que están protegidos de influencias externas por los orbitales ocupados por electrones con mayores números, por lo cual sus bandas continúan siendo estrechas y sin mayor afección por especies unidas a los electrones externos, pero indicando aun así un cambio en el entorno químico del sistema. En los espectros FT-IR se pudieron observar las diferentes bandas provenientes los péptidos, tanto en la región de los grupos funcionales ($4000-1500\text{ cm}^{-1}$) como en la región de huella dactilar ($1500-400\text{ cm}^{-1}$), además de cambios específicos, entre los que se encuentran los siguientes:

- A) Para Lu_2O_3 -iPSMA NPs: a) La banda de interacción de los iones Lu con los oxígenos del agente quelante DOTA a 490 cm^{-1} , b) Cambio hacia números de onda más bajos de las vibraciones de los grupos carboxilo (1657 cm^{-1} a 1588 cm^{-1}) por la misma interacción, c) desplazamiento hacia longitudes de onda más bajos en de las vibraciones de las aminas terciarias (1284 cm^{-1} a 1164 cm^{-1}) atribuidas a la interacción del N (DOTA) con los iones superficiales de lutecio en la nanopartícula, y d) desplazamiento general de todas las bandas (desde $18-100\text{ cm}^{-1}$) que sugieren el cambio en la estructura de la molécula y repercute en la forma de vibrar de los dipolos involucrados.
- B) Para Sm_2O_3 -iPSMA NPs: a) El cambio a energías más altas del grupo $-\text{COOH}$ se asociaron a la interacción de los grupos COO^- (del DOTA) con Sm^{+3} presentes en la superficie de las nanopartículas por la formación del compuesto coordinado tipo monodentado, b) El desplazamiento hacia mayores números de onda de la vibración del grupo C-N se atribuyó a las interacciones de los N del DOTA con los iones superficiales del lantánido, y c) se observó la banda de interacción de la nanopartícula (Sm^{+3}) con DOTA a 528 cm^{-1} , específicamente la interacción Sm-O, donde los oxígenos provienen de los ácidos carboxílicos del DOTA.

Todos los sistemas funcionalizados tuvieron mejores características en su interacción con las células que sobreexpresan sus receptores, de forma general se tuvieron mayores porcentajes de internalización, menores porcentajes de viabilidad, y adecuados valores de las constantes de afinidad a receptores con respeto a las nanopartículas no direccionadas. A pesar de que estas últimas también mostraron captación y citotoxicidad se puede establecer que los

sistemas funcionalizados trabajan concomitantemente por captación pasiva (efecto EPR) y captación activa (internalización mediada por receptores), siendo la última, la responsable de la mejora en su reconocimiento celular y subsecuente acción en células sobreexpresoras de sus receptores, en sistemas *in vitro*.

Después de la activación neutrónica, las radionanopartículas formadas ($^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$) mostraron propiedades luminiscentes con valores máximos de emisión de luminiscencia a 615 nm para Lu_2O_3 NPs y a 758 nm para Sm_2O_3 NPs, este fenómeno se define como radioluminiscencia y es producto de la interacción del material con la radiación ionizante, el cual está relacionado con la estructura electrónica de los iones trivalentes de los lantánidos que al tener el nivel $4f$ parcial y/o totalmente hace posibles intraconfiguraciones de los mismos. Este fenómeno se observó además potenciado por el tamaño nanométrico (mayor área superficial, mayor movilidad de sus iones trivalentes, que genera excitación directa por la contribución en la transferencia de energía ión-ión) y el efecto de confinamiento cuántico. Esta propiedad novedosa observada permitió la obtención de imágenes ópticas *in vivo*.

Una vez que las nanopartículas fueron activadas por irradiación neutrónica, y después de transcurrido su tiempo de decaimiento radiactivo, se analizaron nuevamente sus características fisicoquímicas para explorar algún posible cambio surgido tras este evento, sin embargo, de acuerdo con todos los análisis realizados, no se encontró algún cambio y/o alteración, ni en su morfología y composición (para la síntesis P-C: morfología cuasi esférica, tamaños 30-50 nm, poblaciones monomodales y monodispersas, $\text{PZ} > |30 \text{ mV}|$; para la síntesis PLAL: morfologías esférica y amorfa, poblaciones bimodales, tamaños 60- 140 nm, y en ambos casos, espectros FT-IR y UV-Vis con la misma intensidad y bandas en la misma posición) atribuido a que por lo cual se puede decir que el efecto de irradiación causa cambios solo a nivel nuclear en los átomos de interés, manteniendo las propiedades referentes a los niveles electrónicos del material y conservando así sus propiedades fisicoquímicas.

8. CONCLUSIONES

Se sintetizaron nanopartículas de Lu_2O_3 y Sm_2O_3 utilizando dos metodologías diferentes (precipitación-calcinación y ablación láser pulsada en líquidos) de manera exitosa, siendo ambos métodos adecuados para la obtención de nanopartículas que fácilmente se conjuguen a secuencias peptídicas para que puedan ser utilizadas potencialmente en terapia de blancos moleculares.

El método de síntesis P-C presentó evidentes ventajas sobre el método de PLAL en la obtención de nanopartículas de Lu_2O_3 y Sm_2O_3 , algunas de ellas fueron: facilidad y reproducibilidad del proceso, mayor rendimiento (~4 veces más), adecuadas propiedades cristalinas y morfológicas, obtención de poblaciones monomodales y monodispersas, así como un tamaño más adecuado para su uso en sistemas de radioterapia molecular dirigida. Estas características se reflejaron principalmente en las propiedades luminiscentes de los materiales presentes después de su activación neutrónica.

Las nanopartículas de Lu_2O_3 NPs, Sm_2O_3 NPs, $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs se funcionalizaron de manera correcta con los péptidos de direccionamiento iPSMA e iPSMA-BN gracias a la presencia de los iones Ln^{+3} en la superficie de las nanopartículas y su interacción con el agente quelante DOTA presente en las estructuras peptídicas, logrando la formación de radionanosistemas estables que al ser evaluados en células HepG2 ($^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs) y HepG2 y PC3 ($^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN) mostraron mejores características en los ensayos de internalización, viabilidad y saturación de receptores con respecto a los sistemas no funcionalizados ($^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$).

La correcta funcionalización de las nanopartículas se comprobó con los diferentes análisis fisicoquímicos realizados. Las espectroscopias FT-IR y UV-Vis mostraron la presencia de las bandas de vibración y absorción de los grupos funcionales de las moléculas peptídicas, así como de los núcleos metálicos en los sistemas finales, los valores de PZ tuvieron un aumento en sus valores “basales” (nanopartículas no funcionalizadas) al ser funcionalizadas,

siendo esto indicativo tanto del cambio en el entorno químico como de la mejora en la estabilidad coloidal por la presencia de los péptidos en la composición de la estructura final (PZ<35 mV en los sistemas funcionalizados), y, en el análisis TEM se observó la presencia de los péptidos en la superficie de las nanopartículas como una baja en la densidad electrónica alrededor de las mismas, comparado el contraste generado por las nanopartículas metálicas.

Los sistemas $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN se pueden considerar en la clasificación de teranósticos, pues los radionúclidos poseen las características adecuadas tanto para tratamiento (emisión beta) como para diagnóstico (radioluminiscencia para imagen molecular basada en la luz). Además de que las longitudes de onda de la luz emitida estos (615 nm para $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ NPs y 758 nm para $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs) se encuentran en el rango conocido como ventana biológica (600-1100 nm), siendo este rango donde se logra la mayor penetración de la luz en el tejido biológico por la mínima absorbancia de los componentes bioquímicos en la misma, permitiendo su uso para imagenología óptica *in vivo*.

Las propiedades de luminiscencia en las nanopartículas son producto de la radiación con la materia, lo que demostró que el efecto fue producido tras la activación neutrónica y potenciado por el tamaño nanométrico de los materiales.

Las propiedades fisicoquímicas de Lu_2O_3 NPs y Sm_2O_3 NPs no mostraron cambios ni alteraciones después del proceso de irradiación neutrónica, por lo cual se puede decir que el este proceso causa cambios solo a nivel nuclear en los átomos de interés, manteniendo las propiedades referentes a los niveles electrónicos del material.

9. PERSPECTIVAS

Aún, cuando el desarrollo de radiofármacos es un área con constante crecimiento, el uso de nanopartículas de los sesquióxidos de lantánidos es un área con mucho camino por recorrer. Desde el establecimiento de los métodos de síntesis correctos que potencien sus ventajas hasta el desarrollo de metodologías para su producción rutinaria como radiofármacos de terapia molecular dirigida.

En el actual trabajo se lograron establecer las pautas en la síntesis de las nanopartículas funcionalizadas que mostraron adecuadas propiedades en células positivas a los receptores PSMA y GRPr de cáncer de próstata y hepatocelular, sin embargo, estos sistemas aún pueden ser evaluados en otro tipo de células que sobreexpresen los mismos receptores y no pertenezcan a estas patologías, así como en modelos tumorales *in vivo* de células positivas a PSMA y GRPr.

De igual forma, es necesaria la evaluación de sus aspectos dosimétricos y el establecimiento de los parámetros de sus propiedades luminiscentes para su uso adecuado en la obtención de imágenes ópticas *in vivo*.

10. REFERENCIAS

1. Bayda, S., et al., *The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine*. Molecules, 2019. **25**(1).
2. Boulaiz, H., et al., *Nanomedicine: application areas and development prospects*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(5): p. 3303-21.
3. Bhushan, B., *Introduction to Nanotechnology: History, Status, and Importance of Nanoscience and Nanotechnology Education*, in *Global Perspectives of Nanoscience and Engineering Education*. 2016. p. 1-31.
4. Hulla, J.E., S.C. Sahu, and A.W. Hayes, *Nanotechnology: History and future*. Hum Exp Toxicol, 2015. **34**(12): p. 1318-21.
5. Jeevanandam, J., et al., *Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations*. Beilstein J Nanotechnol, 2018. **9**: p. 1050-1074.
6. Mageswari, A., et al., *Nanomaterials: Classification, Biological Synthesis and Characterization, in Nanoscience in Food and Agriculture 3*. 2016. p. 31-71.
7. Misra, R., S. Acharya, and S.K. Sahoo, *Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy*. Drug Discov Today, 2010. **15**(19-20): p. 842-50.
8. Dhand, C., et al., *Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview*. RSC Advances, 2015. **5**(127): p. 105003-105037.
9. Soares, S., et al., *Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues*. Front Chem, 2018. **6**: p. 360.
10. Saleh, T.A., *Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities*. Environmental Technology & Innovation, 2020. **20**.
11. Salvanou, E.A., P. Bouziotis, and C. Tsoukalas, *Radiolabeled Nanoparticles in Nuclear Oncology*. Advanced Nano Research, 2018. **1**(1): p. 38-55.
12. Zhou, Q., L. Zhang, and H. Wu, *Nanomaterials for cancer therapies*. Nanotechnology Reviews, 2017. **6**(5): p. 473-496.
13. Itani, R. and A. Al Faraj, *siRNA Conjugated Nanoparticles-A Next Generation Strategy to Treat Lung Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(23).
14. Jeyaraj, M., et al., *A Comprehensive Review on the Synthesis, Characterization, and Biomedical Application of Platinum Nanoparticles*. Nanomaterials (Basel), 2019. **9**(12).
15. Kim, P., et al., *Trends in Structure and Thermodynamic Properties of Normal Rare Earth Carbonates and Rare Earth Hydroxycarbonates*. Minerals, 2018. **8**(3).
16. Singh, A., et al., *Pulsed Laser Ablation-Induced Green Synthesis of TiO₂ Nanoparticles and Application of Novel Small Angle X-Ray Scattering Technique for Nanoparticle Size and Size Distribution Analysis*. Nanoscale Res Lett, 2016. **11**(1): p. 447.
17. Krstulović, N., et al., *Parameters optimization for synthesis of Al-doped ZnO nanoparticles by laser ablation in water*. Applied Surface Science, 2018. **440**: p. 916-925.
18. Johnny, J., et al., *Facile and fast synthesis of SnS₂ nanoparticles by pulsed laser ablation in liquid*. Applied Surface Science, 2018. **435**: p. 1285-1295.
19. Goncharova, D.A., et al., *Chemical and Morphological Evolution of Copper Nanoparticles Obtained by Pulsed Laser Ablation in Liquid*. The Journal of Physical Chemistry C, 2019. **123**(35): p. 21731-21742.
20. Amendola, V. and M. Meneghetti, *What controls the composition and the structure of nanomaterials generated by laser ablation in liquid solution?* Phys Chem Chem Phys, 2013. **15**(9): p. 3027-46.
21. Anugrahwidya, R., N. Yudasari, and D. Tahir, *Optical and structural investigation of synthesis ZnO/Ag Nanoparticles prepared by laser ablation in liquid*. Materials Science in Semiconductor Processing, 2020. **105**.
22. Farahani, S.V., A. Mahmoodi, and M. Goranneviss, *The effect of laser environment on the characteristics of ZnO nanoparticles by laser ablation*. International Nano Letters, 2015. **6**(1): p. 45-49.
23. Achilefu, S., et al., *Lanthanide-doped nanoparticles for hybrid x-ray/optical imaging*, in *Reporters, Markers, Dyes, Nanoparticles, and Molecular Probes for Biomedical Applications V*. 2013.
24. Ahmad, T. and I.H. Lone, *Development of multifunctional lutetium ferrite nanoparticles: Structural characterization and properties*. Materials Chemistry and Physics, 2017. **202**: p. 50-55.

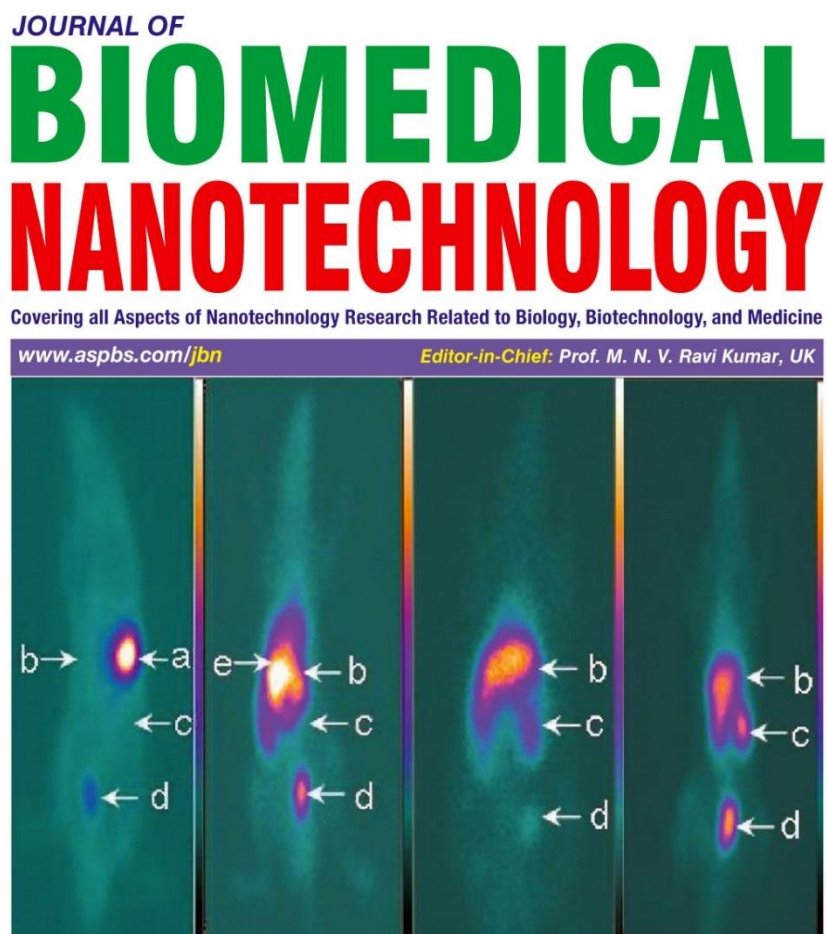
25. Aryanrad, P., et al., *Europium oxide nanorod-reduced graphene oxide nanocomposites towards supercapacitors*. RSC Advances, 2020. **10**(30): p. 17543-17551.
26. Bagheri, A., et al., *Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles: Emerging Intelligent Light-Activated Drug Delivery Systems*. Adv Sci (Weinh), 2016. **3**(7): p. 1500437.
27. Barrera, E.W., et al., *Hydrothermal trivalent lanthanide doped Lu₂O₃ nanorods: Evaluation of the influence of the surface in optical emission properties*. Optical Materials, 2011. **34**(2): p. 399-403.
28. Dong, H., et al., *Lanthanide Nanoparticles: From Design toward Bioimaging and Therapy*. Chem Rev, 2015. **115**(19): p. 10725-815.
29. Huang, K., N.M. Idris, and Y. Zhang, *Engineering of Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles for Optical Encoding*. Small, 2016. **12**(7): p. 836-52.
30. Zhang, K.Y., et al., *Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing*. Chem Rev, 2018. **118**(4): p. 1770-1839.
31. Locardi, F., et al., *Facile synthesis of NIR and Visible luminescent Sm³⁺ doped lutetium oxide nanoparticles*. Materials Research Bulletin, 2017. **86**: p. 220-227.
32. Klein, J.S., C. Sun, and G. Pratz, *Radioluminescence in biomedicine: physics, applications, and models*. Phys Med Biol, 2019. **64**(4): p. 04TR01.
33. Nir-El, Y., *Producción of ¹⁷⁷Lu by neutron activation of ¹⁷⁶Lu*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2004. **262**: p. 4.
34. Banerjee, S., M.R. Pillai, and F.F. Knapp, *Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications*. Chem Rev, 2015. **115**(8): p. 2934-74.
35. Das, T., et al., *Clinical translation of ¹⁷⁷Lu-labeled PSMA-617: Initial experience in prostate cancer patients*. Nuclear Medicine and Biology, 2016. **43**(5): p. 296-302.
36. Dash, A., M.R. Pillai, and F.F. Knapp, Jr., *Production of (¹⁷⁷)Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options*. Nucl Med Mol Imaging, 2015. **49**(2): p. 85-107.
37. Escudero-Castellanos, A., et al., *Synthesis and preclinical evaluation of the ¹⁷⁷Lu-DOTA-PSMA(inhibitor)-Lys3-bombesin heterodimer designed as a radiotheranostic probe for prostate cancer*. Nucl Med Commun, 2019. **40**(3): p. 278-286.
38. Escudero-Castellanos, A., et al., *Preparation and in vitro evaluation of ¹⁷⁷Lu-iPSMA-RGD as a new heterobivalent radiopharmaceutical*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2017. **314**(3): p. 2201-2207.
39. Ferro-Flores, G., et al., *Clinical translation of a PSMA inhibitor for (^{99m}Tc)-based SPECT*. Nucl Med Biol, 2017. **48**: p. 36-44.
40. Gibbens-Bandala, B., et al., *Synthesis and Evaluation of (¹⁷⁷)Lu-DOTA-DN(PHX)-BN for Selective and Concomitant Radio and Drug-Therapeutic Effect on Breast Cancer Cells*. Polymers (Basel), 2019. **11**(10).
41. Hernández-Jiménez, T., et al., *¹⁷⁷Lu-DOTA-HYNIC-Lys(Nal)-Urea-Glu: synthesis and assessment of the ability to target the prostate specific membrane antigen*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2018. **318**(3): p. 2059-2066.
42. Chen, G., et al., *Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics*. Chem Rev, 2014. **114**(10): p. 5161-214.
43. Trujillo-Benitez, D., et al., *Synthesis and Biochemical Evaluation of Samarium-153 Oxide Nanoparticles Functionalized with iPSMA-Bombesin Heterodimeric Peptide*. J Biomed Nanotechnol, 2020. **16**(5): p. 689-701.
44. Iversen, T.-G., T. Skotland, and K. Sandvig, *Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies*. Nano Today, 2011. **6**(2): p. 176-185.
45. Manzanares, D. and V. Cena, *Endocytosis: The Nanoparticle and Submicron Nanocompounds Gateway into the Cell*. Pharmaceutics, 2020. **12**(4).
46. Doello, K., et al., *Magnetic Nanoparticules in Cancer Diagnosis and Treatment*. Actualidad Medica, 2015. **100**(796): p. 139-144.
47. Ancira-Cortez, A., et al., *Synthesis, chemical and biochemical characterization of Lu₂O₃-iPSMA nanoparticles activated by neutron irradiation*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020. **117**: p. 111335.
48. Colombatti, M., et al., *The prostate specific membrane antigen regulates the expression of IL-6 and CCL5 in prostate tumour cells by activating the MAPK pathways*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4608.
49. Ghosh, A. and W.D. Heston, *Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer*. J Cell Biochem, 2004. **91**(3): p. 528-39.
50. Irvani, A., et al., *Lutetium-177 prostate-specific membrane antigen (PSMA) theranostics: practical nuances and intricacies*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2020. **23**(1): p. 38-52.

51. Navratil, M., et al., *Structural and biochemical characterization of the folyl-poly-gamma-l-glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II*. FEBS J, 2014. **281**(14): p. 3228-42.
52. Rajasekaran, A.K., G. Anilkumar, and J.J. Christiansen, *Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?* Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(5): p. C975-81.
53. Honary, S. and F. Zahir, *Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013. **12**(2).
54. Honary, S. and F. Zahir, *Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2013. **12**(2).
55. Hotze, E.M., T. Phenrat, and G.V. Lowry, *Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment*. J Environ Qual, 2010. **39**(6): p. 1909-24.

11. ANEXOS

11.1. Artículo de co-autoría

Trujillo-Benítez, D., Ferro-Flores, G., Morales-Avila, E., Jiménez-Mancilla, N., **Ancira-Cortez, A.**, Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Escudero-Castellanos, A., Luna-Gutiérrez, M., Azorín-Vegas, E., **2020**. Synthesis and biochemical evaluation of samarium-153 oxide nanoparticles functionalized with iPSMA-Bombesin heterodimeric peptide. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 16(5) pp.689-701.



A Special Issue on
Nanomedicines

GUEST EDITOR: Sophia G. Antimisiaris



Synthesis and Biochemical Evaluation of Samarium-153 Oxide Nanoparticles Functionalized with iPSMA-Bombesin Heterodimeric Peptide

D. Trujillo-Benítez^{1,2}, G. Ferro-Flores^{1,*}, E. Morales-Avila^{2,*}, N. Jiménez-Mancilla³, A. Ancira-Cortez^{1,2}, B. Ocampo-García¹, C. Santos-Cuevas¹, A. Escudero-Castellanos¹, M. Luna-Gutiérrez¹, and E. Azorín-Vega¹

¹Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Estado de México, 52750, Mexico

²Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, 50180, Mexico

³Cátedras CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Estado de México, 52750, Mexico

Developments in the design of lanthanide oxide nanoparticles (NPs) have unleashed a wide variety of biomedical applications. Several types of hepatic cancer cells overexpress two proteins: the gastrin-releasing peptide receptor (GRPr), which specifically recognizes the bombesin (BN) peptide, and the prostate-specific membrane antigen (PSMA), which specifically binds to several peptides that inhibit its activity (iPSMA). This research synthesized and physicochemically characterized Sm₂O₃ nanoparticles functionalized with the iPSMA-BN heterodimeric peptide and studied the effects on their structural, biochemical and preclinical properties after activation by neutron irradiation for possible use in molecular dual-targeted radiotherapy of hepatocellular carcinoma. The Sm₂O₃ NPs were synthesized by the precipitation-calcination method and functionalized with iPSMA-BN peptide using the DOTA macrocycle as a linking agent. Analysis of physicochemical characterization via TEM, EDS, XRD, UV-Vis, FT-IR, DSL, and zeta potential results showed the formation of Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (94.23 ± 5.98 nm), and their physicochemical properties were not affected after neutron activation. The nanosystem showed a high affinity with respect to PSMA and GRPr in HepG2 cells ($K_d = 6.6 \pm 1.6$ nM) and GRPr in PC3 cells ($K_d = 10.6 \pm 1.9$ nM). ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs exhibited radioluminescent properties, making possible *in vivo* optical imaging of their biodistribution in mice. The results obtained from this research support further preclinical studies designed to evaluate the dosimetry and therapeutic efficacy of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles for *in vivo* imaging and molecular dual-targeted radiotherapy of liver tumors overexpressing PSMA and/or GRPr proteins.

KEYWORDS: Sm₂O₃ Nanoparticles, iPSMA-Bombesin, Heterodimeric Peptides, Targeted Radiotherapy, Radioluminescence.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is ranked second as a cause of mortality worldwide due to the limited availability of donors and the high sensibility of healthy hepatic tissue in response to current treatments [1].

Radioembolization of intrahepatic carcinomas is usually an option for patients with inoperable hepatic tumors.

Therapies that use glass/resin ⁹⁰Y-microspheres (20–30 μm), infused into the liver via a catheter located in the hepatic artery for radioembolization have demonstrated their ability to significantly improve the quality of life of patients with multifocal hepatocellular carcinoma and have even increased survival when no extrahepatic metastasis are present [2]. The maximum penetration of the beta(-) particles of ⁹⁰Y in tissue (11 mm) allows the radiation to reach the tumor in a manner similar to brachytherapy, although irradiation is not imparted on the tumor mass homogeneously, which gives way to the possibility of growth of new malignant lesions inside or outside of the liver. Therefore, the development of new radioactive nanoparticles (<100 nm) with dual molecular recognition

* Authors to whom correspondence should be addressed.
Emails: guillemina.ferro@inin.gob.mx, ferro_flores@yahoo.com.mx, emoralesav@uamex.mx
Received: 31 May 2020
Accepted: 30 July 2020

for proteins overexpressed in liver cancer cells could facilitate target-specific internalization of radioactivity within the neoplastic cells, thus increasing radiation doses at the cancer cell level for improved therapeutic response.

Due to its overexpression in different cancer cells (including those of hepatocellular carcinoma [3]), prostate-specific membrane antigen (PSMA protein) is a molecular target that has led to the successful development of systems based on radiolabeled PSMA inhibitor peptides (iPSMA) as agents for molecular imaging and radiotherapy [4]. The gastrin-releasing peptide receptor (GRPr), which selectively and specifically recognizes the bombesin (BN) peptide, is another protein overexpressed in several neoplastic cells, including hepatic carcinoma cells [5].

The development of metal oxide nanoparticles, especially in conjunction with internal transition metals such as lutetium, dysprosium, cerium, europium, and samarium, have unleashed a wide variety of applications in catalysis, electronics, optical sensors, high-performance luminescence and magnetic devices due to the rich valence states, excellent superficial area and considerable array of electronic structures in these materials [6, 7].

Samarium-153 is a therapeutic radionuclide (half-life of 46.27 h) that emits negative beta particles with energies of 0.81 MeV (20%), 0.71 MeV (30%), and 0.64 MeV (50%) and gamma photons of 103 keV (28%). These gamma photons are used in nuclear imaging. Samarium-153 is produced by irradiation of ¹⁵²Sm (a stable isotope present in natural samarium) in a nuclear reactor via the reaction ¹⁵²Sm(n,γ)¹⁵³Sm. The neutron activation cross-section of 206 barns is advantageous because large quantities of activity can be prepared even if irradiation is performed in medium flux research reactors. The ¹⁵³Sm specific activity obtained is sufficiently high for the preparation of therapeutic radiotracers such as bone pain palliation agents, among others [8, 9].

The objectives of this work were to synthesize and physicochemically characterize samarium oxide (Sm₂O₃) nanoparticles functionalized with the DOTA-PSMA(inhibitor)-Lys3-bombesin (iPSMA-BN) heterodimeric peptide and to study the effects on its structural, biochemical and preclinical properties once activated by neutron irradiation for possible use in molecular dual-targeted radiotherapy of hepatocellular carcinoma.

MATERIALS AND METHODS

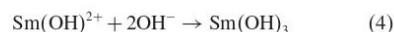
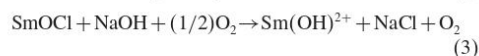
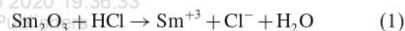
Sm₂O₃ Nanoparticle Synthesis

Using the precipitation-calcination method, 1 g of ^{nat}Sm₂O₃ (powder, purity of 99.999%, Sigma-Aldrich, Co., USA) was placed in 20 mL of injectable-grade H₂O (Pisa, Mexico), followed by the addition of 2 mL of concentrated HCl and homogenization induced by heating at a temperature no greater than 50 °C until the formation of a translucent solution with an approximate pH of 2 (formation of SmCl₃). Finally, the volume was adjusted to

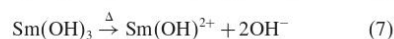
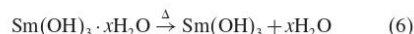
50 mL. The addition of Sm₂O₃ was continued until a pH of 6.2 was reached, and the solution was filtered through a 0.22 μm membrane. A concentrated solution of NaOH (3 M) was prepared, and 15 mL were added to the SmCl₃ solution until a white precipitate and a pH of 12 were obtained. The solution was allowed to homogenize for 30 min, and several washes of the suspension with type 1 water were performed by centrifugation at 2500 g/30 min until a pH of 7 was obtained. The resulting suspension was allowed to dry inside a crucible at 70 °C for a one night, leading to the appearance of a white powder corresponding to the nanoparticle precursor. Finally, the product was calcinated at 600 °C or 900 °C for 24 h.

The proposed sequence of reactions for Sm₂O₃ nanoparticle (NPs) formation is explained on oxychloride phase formation as an intermediate product. The oxide-lanthanide conversion to chloride-lanthanide results in an equilibrium of chloride and oxide forms because the intermediate [Sm–O–Cl] is the species that controls the kinetics of the reaction, grouping species of di- or tri-stable chlorides in a tetragonal monocapped antiprism disposition, and the addition of alkali increases the hydroxyl concentration to form the metallic hydroxide that has strong tendency towards hydration, resulting in the formation of the xH₂O complex. In general, preparation occurs as follows [10]:

(a) Sequence of precursor formation reactions (Eqs. (1)–(5)):



(b) Sequence of reactions for Sm₂O₃ nanoparticle (NPs) formation by calcination (Eqs. (6)–(8)):



Due to the reactive nature of the salt precursor of Sm, the minor and partial carbonated phases present from atmospheric carbon dioxide are not discarded [11, 12].

Preparation of Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs

To a 1 mM sodium citrate solution (10 mL), 10 mg of Sm₂O₃ NPs were added, followed by 100 μL of a 1 mg/mL solution of iPSMA-BN peptide (HO-Glu-CO-Lys{[Nal-Cys[Pyr-Gln-Lys(maleimidobutyl)]-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂]-DOTA}-OH

peptide) (Ontores Biotechnologies Inc., China). The formed suspension was placed in an ultrasonic bath for 3 h for posterior purification by ultracentrifugation (MWCO 100 kDa; Amicon Ultracel; Millipore, USA).

Preparation of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs

For neutron activation, 100 mg of ^{nat}Sm₂O₃ NPs calcinated at 600 °C were irradiated in a Triga MARK III nuclear reactor (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Mexico) for 20 h under a neutron flux of 1×10^{13} n/s·cm². Subsequently, functionalization with the iPSMA-BN peptide was conducted, as previously described, to obtain ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (Fig. 1).

Chemical Characterization

Thermogravimetric Analysis and Differential Scanning Calorimetry (TGA-DSC)

TGA-DSC analysis was performed at a range of 0–1000 °C under a nitrogen atmosphere using SDT Q600 V20.9 equipment with Build 20 software and a heating rate of 10 °C/min.

Via dynamic light scattering (DLS), the hydrodynamic diameter and zeta potential of Sm₂O₃ NPs (600 °C and 900 °C), Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs and ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (activated by neutron irradiation and analyzed after total radioactive decay) were measured using a Nanotracer analyzer (Nanotracer Wave, Microtract, USA) with the conditions of a wavelength of 657 nm, temperature of 21 °C, current of 15.79 mA, electric field of 14.38 V/cm and sampling time of 128 μs. The measurements were conducted with the nanoparticles suspended in a 1 mM sodium citrate solution.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The morphology and size of the Sm₂O₃ NPs (600 °C and 900 °C), Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs and ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (activated by neutron irradiation and analyzed

after total radioactive decay) were characterized by TEM using a JEOL JEM 2100 HT microscope operating at 200 kV. Samples were prepared for analysis by evaporating a drop of aqueous product on a carbon-coated TEM copper grid.

X-ray Diffraction (XRD)

The XRD patterns of the Sm₂O₃ NPs were acquired using a Bruker D8 Discover diffractometer, and the data were collected with a Diffrac Plus V4 file with CuKα radiation operating at 35 kV and 25 mA. The data were collected at 20-min intervals, from 13 to 100 grades. The precursor was dried at 90 °C, and the remaining samples were present in powder form after calcination.

UV-Vis Spectroscopy

To conduct surveillance of the changes in the nanoparticle conjugation reaction, UV-Vis analysis was implemented with an absorption spectrum of 200–320 nm using a PerkinElmer LambdaBio spectrometer (PerkinElmer; Waltham, Massachusetts, USA) and a 1-cm quartz cuvette.

FT-IR (Fourier Transform Infrared) Spectroscopy

The FT-IR spectra were obtained using a PerkinElmer System 2000 spectrometer with an ATR platform (Pike Technologies) and application of attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FT-IR) spectroscopy. Forty scans were performed, with a resolution of 1 cm⁻¹ and an operation range of 4000–400 cm⁻¹.

Biochemical Characterization

Cell Culture

The HepG2 human liver cancer cell line (PSMA-positive, GRPr-positive) was routinely cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/mL of penicillin and 100 μg/mL of streptomycin. The PC3 prostate cancer cell lines (PSMA-negative, GRPr-positive)

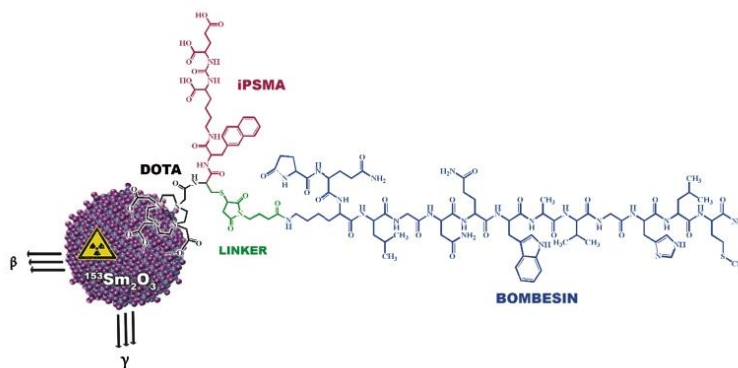


Figure 1. Scheme of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles.

were cultured in RPMI medium and supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin. The cells were incubated at 37 °C in humid environment and a 5% CO₂ atmosphere.

Cell-Binding Affinity

The affinity of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs was evaluated via saturation binding assay. In brief, HepG2 or PC3 cells were seeded and incubated (37 °C, 5% CO₂ and 85% humidity) in a 6-well plate at a density of 1 × 10⁶ cells per well 24 h prior to the experiment. The medium was replaced with cold medium, and the plates were placed on ice for 30 min. The cells were incubated for 2 h at 4 °C with increased concentrations (0.25 nM to 90 nM, *n* = 3) of the ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs. After this time, the supernatant (free nanosystem) and the cells were detached from the wells using 1 M NaOH (bound nanosystem). The samples were collected and measured in a NaI (TI) detector (MNL Inc.; Texas, USA). Standard solutions of each treatment were prepared, representing 100% of the initial activity. For the nonspecific binding, parallel assays were conducted under the same conditions but with “cold” iPSMA-Bombesin (1 mol/L) as a blocking agent. The difference between total binding and nonspecific binding was calculated to obtain the specific binding of each concentration. GraphPad Prism software was used to determine the *K_d* and *B_{max}* by nonlinear regression analysis.

Cell Internalization

¹⁵³Sm₂O₃ NPs and ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA NPs internalization by HepG2 and PC3 cells was evaluated using 4 × 10⁵ cells/500 µL (PBS) placed in test tubes. The cells were incubated for 1 h with 50 µL of each treatment (*n* = 3): (a) ¹⁵³Sm₂O₃ NPs (37 kBq), (b) ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA NPs (37 kBq), and (c) no treatment (control). After the incubation period, the different fractions were measured in a NaI (TI) detector (MNL Inc., USA). The initial activity (total volume of the test tube) represented 100%. To recover the internalized fraction, the samples were centrifuged (700 g/5 min), the bottom portion was incubated with 1 M NaOH for 5 min, centrifuged (700 g/5 min) again, and the supernatant was collected and used to calculate the cellular internalization percentages.

Clonogenic Assay

HepG2 or PC3 cells (1 × 10³) were seeded in a 6-well plate and incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO₂, and 85% humidity. For the experiment, three groups were formed (*n* = 3): (a) ¹⁵³Sm₂O₃ NPs, (b) Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs and (c) no treatment (control). All cells were treated with 3.7 kBq of the corresponding nanosystem for 24 h. The medium was replaced with fresh medium, and the cells were incubated for 14 d (when a confluent culture was obtained). The cells were fixed with a 4% paraformaldehyde solution for 10 min at room temperature and washed

thoroughly with type I water. Finally, cells were stained for 30 min with 0.1% crystal violet, washed with type I water, dried and photographed. Quantification was performed by adding 10% CH₃COOH for 5 min to extract the dye, and the absorbance of the samples was photometrically measured at 590 nm.

Cell Viability Assay

The XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide inner salt) test was applied for determination of cell viability after treatment with ¹⁵³Sm₂O₃ NPs or ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs. HepG2 or PC3 cells (1 × 10⁴ cells/well) were plated and incubated for 24 h (37 °C, 5% CO₂ and 85% humidity) in a 96-well microplate (Corning, NY, USA). The medium was withdrawn, and the cells were treated as follows: (a) ¹⁵³Sm₂O₃ NPs (37 kBq) (*n* = 3), incubation for 1 h at 37 °C; (b) ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (37 kBq) (*n* = 3), incubation for 1 h at 37 °C; and (c) no treatment (control). Subsequently, the treatments were withdrawn, and the cells were washed twice with PBS. Growth medium was added, and the cells were incubated for 72 h (85% humidity, 5% CO₂ and 37 °C). Finally, 100 µL of PBS and 50 µL of XTT (Roche, Germany) were added. The cells were incubated for 4 h to allow the viable cells to perform the XTT-to-formazan (orange-colored dye) transformation. The absorbance (at 450 nm) was measured in a microplate reader (EPOCH; BioTek, USA), considering the untreated cells as 100% to obtain the cell viability percentages.

In Vivo Biocompatibility Assays

The biocompatibility of Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles was evaluated by acute injection of nanoparticulate matter. Three-month-old Balb-C male mice (30 g) were used. The animals were maintained under controlled conditions of temperature and 12 h dark-light periods, and a standard laboratory mice chow diet and water were available *ad libitum*. Animals were treated and housed under the specifications for laboratory animals detailed in Official Mexican Norm NOM-0062-ZOO-1999. Two groups of healthy Balb-C mice (25 g) were intraperitoneally treated using a single dose of 8.0 µg/g. One control group received the vehicle only. The mice were observed and dissected at 72 ± 2 h in search of signs of toxicity. The blood was collected to obtain serum. Liver, kidney and heart were processed for dehydration, clearing and embedding in parafilm blocks, and serial sections of 4 µm thickness were cut and stained with hematoxylin and eosin. Samples were finally mounted and analyzed under a light microscope.

Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured in serum using a Roche Diagnostics kit for UV assays. The catalytic activities of AST, ALT or LDH (transamination reactions and conversion of L-lactate to

pyruvate respectively) were determined through direct formation of NADH from NAD⁺ (Roche Diagnostics; Indianapolis, IN).

In Vivo Biodistribution

Following the *Ethical Rules and Regulations for the Care of Laboratory Animals* recommendations (062-ZOO-1999 Official Norm, Mexico), *in vivo* studies in Balb-C mice (weight of 18–20 g, 6–7 weeks old) were performed. The mice were injected with ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (tail vein, 100 μL, 74 MBq) and sacrificed at 0.5, 3, 24, and 96 h (*n* = 3 for each time point). Liver, heart, lungs, spleen, pancreas, kidney and blood samples were obtained for activity assessment in a NaI(Tl) detector to establish the percentage of the injected dose per gram of tissue (%ID/g) with respect to the total injected activity.

Optical Image

To verify the *in vivo* biodistribution and the luminescent properties of the ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs, optical images of the mice (*n* = 3) were acquired 3 h after administration of the radio nanosystem (92 MBq, 0.5 mg) using an optical image preclinical system (*In Vivo* X-Treme; Bruker, USA) without any emission filter. The X-ray and luminescent images of the whole body of mice in the prone position were collected by anesthetizing the mice with 2% isoflurane. Images of the ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs powder without and with emission filters (535, 600, 700, 750, 790 and 830 nm) were acquired to obtain the intensity spectrum (photons/sec/mm² vs. wavelength). X-ray images were also captured to corroborate the position of the powder and its associated luminescence.

RESULTS

Synthesis and Chemical Characterization

TGA-DSC

The thermal behavior of Sm(OH)₃ · xH₂O were studied via TGA-DSC. Figure 2 presents five consecutive weight-loss curves. The first, with a loss of 2.186%, occurs before 200 °C and is attributable to water physically absorbed onto the surface of the solids. The second band presents the greatest weight loss, with a percentage of 10.13%, at a temperature of 290 °C, corresponding to water loss from hydrated forms (Eq. (8)), and the band present at 391 °C is attributed to the loss of [OH]⁻ from the crystal lattice and remaining hydration mesh water (Eq. (9)). Finally, two bands appeared above 570 °C and were assigned to sesquioxide samarium formation (Eq. (10)) from hydroxide species and possibly from hydroxycarbonate precursor Sm₂(OH)₂(CO₃)₂ + O₂ → Sm₂O(CO₃)₂ + H₂O + CO₂ and Sm₂O(CO₃)₂ → Sm₂O₃ + 2CO₂, which have been reported at those temperatures for lanthanide carbonates [13, 14]. In all cases, calcination results in the formation of Sm₂O₃ as the only species, and these results correlate with the

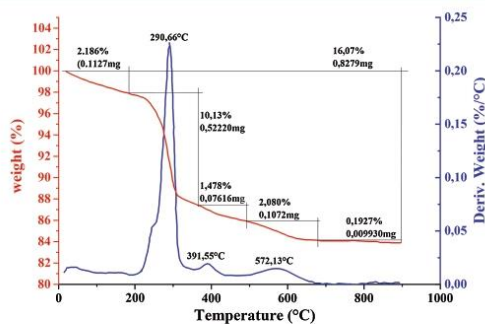


Figure 2. DSC-TGA spectrum of uncalcined Sm(OH)₃ · xH₂O precursor synthesized for preparation of Sm₂O₃ nanoparticles.

spectra obtained by XRD and FT-IR analyses, as shown later.

XRD

Figure 3(a) displays the XRD pattern of the precursor prior to calcination and corresponds to Sm(OH)₃ (in agreement with the JCPDS 06-0117 crystallographic standard), which presents a hexagonal structure (60). In Figures 3(b) and (c), the patterns for Sm₂O₃ NPs (obtained at 600 °C) and Sm₂O₃-NPs (obtained at 900 °C) are shown, where peaks corresponding in position and height to those of cubic Sm₂O₃ (JCPDS 15-0813 standard) can be observed. Additionally, at a higher temperature, the peaks are more defined in height and width, which indicates a greater crystalline state and purity [15].

Particle Size Analysis by DLS

As is shown in Figure 4, the Sm(OH)₃ precursor presented a mean nanoparticle size (hydrodynamic diameter)

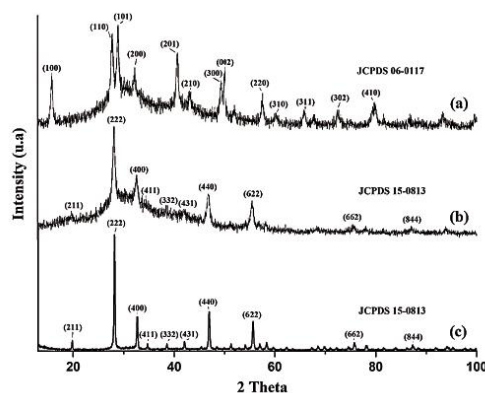


Figure 3. XRD spectrum: (a) Uncalcined Sm(OH)₃ · xH₂O precursor, (b) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C and (c) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 900 °C.

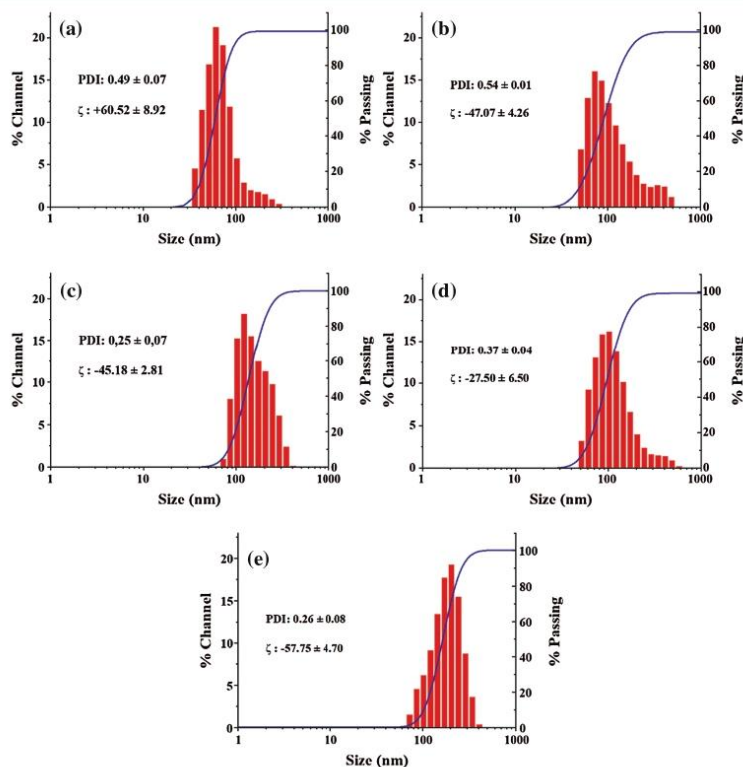


Figure 4. DLS, polydispersity index (PDI), and potential Z (ζ): (a) Uncalcined Sm(OH)₃ · xH₂O precursor, (b) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C, (c) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 900 °C, (d) Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (600 °C) and (e) Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (900 °C). (Mean ± SD, *n* = 4).

of 56.75 ± 6.91 nm (Fig. 4(a)), whereas in Sm₂O₃ NPs obtained at 600 °C and 900 °C the mean hydrodynamic diameter increased to 83.3 ± 3.54 nm (Fig. 4(b)) and 149.66 ± 16.16 nm (Fig. 4(c)), respectively, suggesting that as temperature is increased, the size is also increased. In the case of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs, a size of 94.2 nm was obtained for the NPs calcinated at 600 °C (Fig. 4(d)), and a size of 167.1 nm was obtained for the NPs calcinated at 900 °C (Fig. 4(e)), which confirms that after the addition of peptide, the system maintains its size, albeit with a slight increase, which can be attributed to the volume of the peptide. Although a significant change in the zeta potential of the Sm₂O₃ NPs at 600 °C (-46.09 mV) was observed after the functionalization process (Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs, -27.65 mV), the high negative value of the zeta potential continues to indicate a system with high colloidal stability. Most relevant for obtaining stable samarium nanoparticles (without a significant nanoparticle aggregation) is the presence of citrate ions covering the NP surface.

TEM

As shown in Figure 5(a), the precursor prior to calcination exhibits the form of nanorods, with sizes ranging from 50 to 400 nm long by 10–30 nm wide. Upon calcination at 600 °C, Figure 5(b) shows a change in shape from nanorods to spherical nanoparticles, with diameters that range from 20 to 80 nm. At 900 °C, a shape change is also observed, with the nanorods transforming to nanospheres but with an increase in diameter, with sizes that range from 40 to 200 nm (Fig. 5(c)). In Figure 5(d), the nanoparticles functionalized with the iPSMA-BN peptide are shown, and the shape and size of the nanoparticles was conserved, with diameters that range from 20 to 80 nm.

FT-IR

Figure 6(a) shows the FT-IR spectrum of the precursor Sm(OH)₃ prior to calcination, with a band at 690 cm⁻¹ that corresponds to the Sm–O–H vibrations [16]. A second band at 3610 cm⁻¹ corresponds to –OH vibration. The bands observed at 3413 cm⁻¹ and

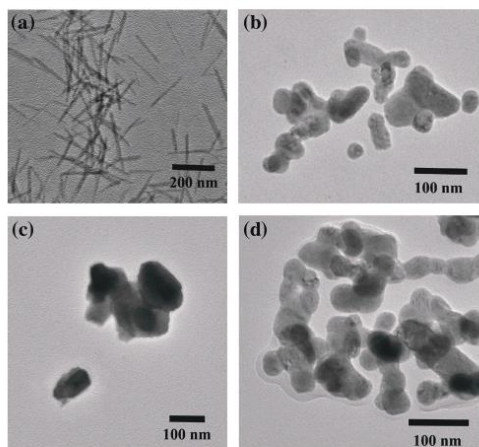


Figure 5. TEM micrograph: (a) Uncalcined Sm(OH)₃ · xH₂O precursor, (b) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C, (c) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 900 °C, and (d) Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs.

1646 cm⁻¹ correspond to the ν -OH and δ -OH vibrations of intramolecular H₂O [17]. The bands observed between 1400 and 700 cm⁻¹ could be attributed to ν (Cl-O-) residual groups and to ν_s (-C=O), ν_{as} (-C-O) and out-of-plane vibrations of the CO₂⁻ ion at 1500–800 cm⁻¹ from carbonate residues [16, 18, 19]. In the spectra of Sm₂O₃ NPs obtained at 600 °C (Fig. 6(b)) and at 900 °C (Fig. 6(c)), the bands at 529 cm⁻¹ and 528 cm⁻¹ correspond to the vibrations of Sm-O [15] and corroborate a change from

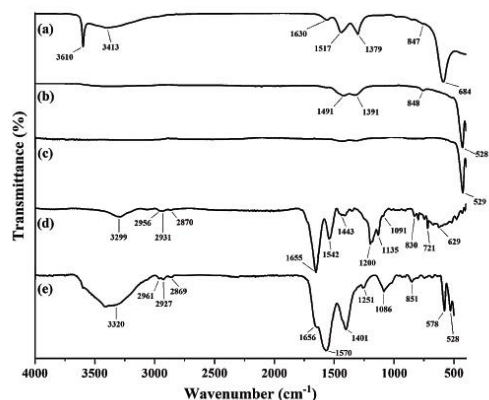


Figure 6. FT-IR spectrum: (a) Uncalcined Sm(OH)₃ · xH₂O precursor, (b) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C, (c) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 900 °C, (d) iPSMA-BN peptide and (e) Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs.

the Sm-O-H (690 cm⁻¹) precursor to Sm₂O₃, as well as a shift towards a region of lesser frequency, where vibrations are reported for the high-coordination metal-oxygen bonds [20]. Additionally, in both spectra (at 600 °C and at 900 °C), the disappearance of the bands associated with -OH vibration (at 3607 cm⁻¹ and 1646 cm⁻¹) indicates the complete oxidation and removal of H₂O. The only observable difference for both temperatures can be found in the intensity of the bands at 1497 cm⁻¹, 1390 cm⁻¹ and 848 cm⁻¹, which can be attributed to residual SmOCl, Sm(OH)₃ and Sm₂(OH)₂(CO₃) species, highlighting that at a higher temperature (spectrum for 900 °C), the intensity decreases until it is practically unobservable [21].

The iPSMA-BN spectrum (Fig. 6(d)) presents characteristic peptide bands such as those at 3299 cm⁻¹ (ν_s -N-H from primary amines), 1956 cm⁻¹, 2870 cm⁻¹, 2931 cm⁻¹ (ν_s -C-H and ν_{as} -C-H from methyl and methylene), and 1655 cm⁻¹ (the latter from the N-H bending vibration of the primary amine and the possible combination with C=O from amide I). At 1091 cm⁻¹ and 1200 cm⁻¹, the C-N stretching vibration from C-NH₂ and tertiary amines is observed. At 1542 cm⁻¹ and 1443 cm⁻¹, the bands assigned to ν_s -C-O and ν_{as} -C-O from O=C-O were also identified [22–24]. Finally, in the IR spectrum of Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (Fig. 6(e)), the bands at 3320 cm⁻¹, 2961 cm⁻¹, 2927 cm⁻¹, 2869 cm⁻¹, 1656 cm⁻¹ and 1086 cm⁻¹, which correspond to the stretching vibrations of NH₂, ν_s -CH₂, ν_{as} -CH₂, ν_{as} -CH₃, bending NH₂, and ν_s -C-N from NH₂, respectively, were identified. The appearance of two bands at 1570 cm⁻¹ and 1401 cm⁻¹ is associated with the shift of the free peptide bands at 1542 cm⁻¹ and 1443 cm⁻¹ to a higher and lower energy, respectively, which is indicative of the monodentate interaction of Sm coordination with the COO⁻ groups of DOTA. The appearance of a band at 1431 cm⁻¹ might be associated with the C-N-M (metal) interaction. In a similar manner, the band shift at 1200 cm⁻¹ to 1251 cm⁻¹

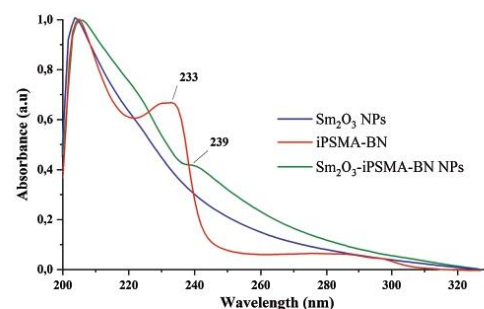


Figure 7. UV-Vis spectrum of Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C, iPSMA-BN peptide, and Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs.

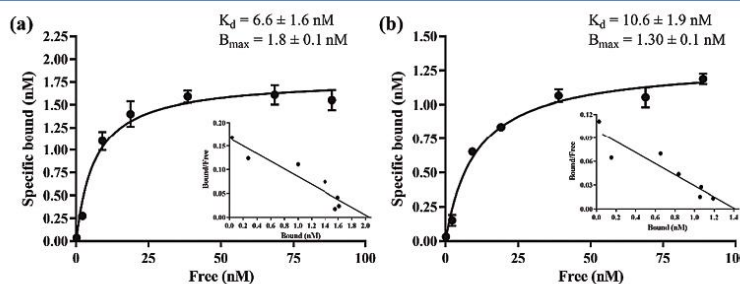


Figure 8. Saturation binding study on (a) GRPr/PSMA-positive HepG2 cells and (b) GRPr-positive PC3 cells of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles.

indicates the N interaction of the tertiary amines of DOTA with superficial Sm, and finally, the band at 528 cm⁻¹ corresponds to the Sm–O interaction (O from the COO⁻ of DOTA) [25].

UV-Vis

The UV-Vis spectra also demonstrated the functionalization of Sm₂O₃ NPs because the Sm₂O₃-iPSMA-BN NP spectrum presented an absorption band centered at 239 nm, which is associated with the presence of the peptide on the nanoparticle surface (more specifically due to the carboxylic acids from the DOTA group of said molecule). The band exhibited a slight blueshift compared with the spectrum of iPSMA-BN (233 nm), indicating a change in the chemical environment (Fig. 7) [25].

Physicochemical Evaluation of Sm₂O₃ NPs After Neutron Activation

The neutron irradiation of Sm₂O₃ NPs (100 mg) yielded an activity of 21 GBq. To verify that the physicochemical properties of the nanomaterial were not affected by the irradiation process, the Sm₂O₃ NP size, morphology, stability in solution and chemical composition were evaluated after one month of radioactive decay.

The TEM images showed that Sm₂O₃ NPs and ¹⁵³Sm₂O₃ NPs (after complete radioactive decay) had the same spherical morphology, with diameters that ranged from 20 to 80 nm, and a homogeneous and uniform distribution. The hydrodynamic diameter obtained by DLS was 85 ± 6 nm (PDI = 0.234), and the zeta potential was -46 mV. Finally, the FT-IR spectra showed no changes where the bands correlated to the samarium and iPSMA-BN peptide vibrations appear. These results demonstrated that the main physicochemical properties of the samarium oxide nanoparticles were adequately maintained, without significant changes after activation, to successfully prepare the ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanosystem.

Biochemical Characterization, Biodistribution and Imaging

In the saturation assay (Fig. 8), an adequate affinity of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs was observed for the GRPr and PSMA receptors in HepG2 cells, with a $K_d = 6.6 \pm 1.6$ and $B_{max} = 1.8 \pm 0.1$, showing a higher affinity compared with the assay conducted in PC3 cells ($K_d = 10.6 \pm 1.9$ and a $B_{max} = 1.3 \pm 0.1$) due to the expression of the two receptors (GRPr and PSMA) in HepG2 hepatocellular carcinoma cells.

The internalization results in both cell lines showed that ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs exhibit significantly higher internalization compared with ¹⁵³Sm₂O₃ NPs ($p < 0.05$, Student's *t*-test) (Fig. 9). It is important to mention that in most *in vitro* studies, nanoparticles show a high cellular uptake mediated by a passive mechanism [26]. However, the significant difference between functionalized and

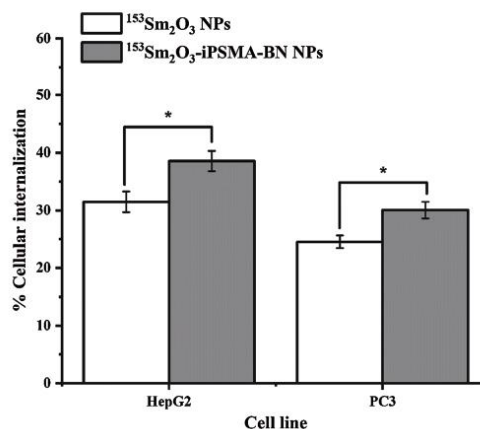


Figure 9. Cellular internalization of ¹⁵³Sm₂O₃ NPs and ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs in HepG2 and PC3 cells (incubation time = 1 h) (*statistically significant difference: $p < 0.05$, student's *t*-test).

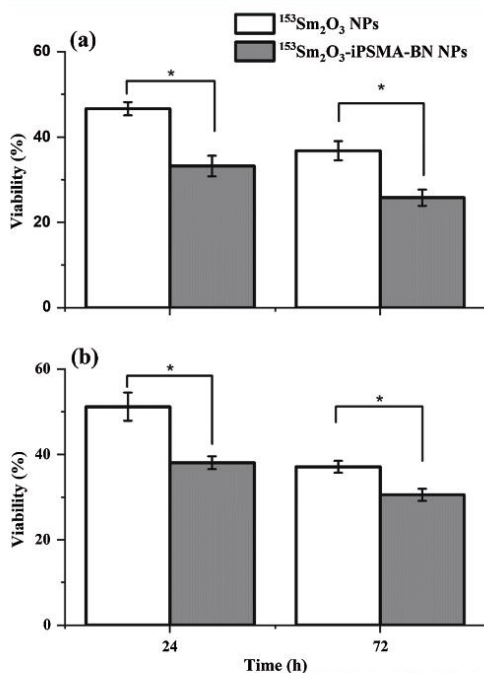


Figure 10. Effect of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs on HepG2 (a) and PC3 (b) viability at 24 and 72 h (*statistically significant difference: *p* < 0.05, student's *t*-test).

nonfunctionalized nanoparticles can be associated with the specific mechanism mediated by cell receptors that recognize the iPSMA and/or bombesin ligands bound to the surface of the nanoparticles.

The results of the viability (Fig. 10) and clonogenic (Fig. 11) assays correlated with the results of cellular internalization. Cells treated with ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs

showed a higher effect, both in viability and in proliferation of HepG2 and PC3 cells, than the group treated with ¹⁵³Sm₂O₃ NPs (statistically significant difference, *p* < 0.05; Student's *t*-test). The decrease in viability and proliferation as a result of the treatment with ¹⁵³Sm₂O₃ NPs is attributed to the passive mechanism uptake of radiolabeled nanoparticles and the crossfire effect produced by radiation in the medium.

As is well known, the AST and ALT enzymes present in a variety of tissues show a significant increase in enzyme activity after toxic exposure that affects liver cell integrity and occasionally an increase in heart failure. LDH is a stable cytosolic enzyme that is released upon cytotoxic damage or cell lysis. In this research, biocompatibility assays demonstrated no statistically significant changes (*p* < 0.05) in the enzyme activity between mice exposed to Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles and those of the control group (Fig. 12(a)).

The histopathological analysis did not show significant changes in the livers of the treated mice. The appearances of the cytoplasm and nucleus were similar to those of the control group, without the presence of any form of steatosis, cytoplasmic alterations or necrotic evidence. Hemorrhage and inflammatory infiltrations were absent. No evidence of cytotoxic degeneration was observed in non-parenchymal cells or hepatocytes (Figs. 12(b and c)). Kidney histopathology showed no histological changes with respect to the control group, and there was no evidence of pathological changes in the structure of glomeruli or tubules, as well as no necrosis, infiltration of inflammatory cells or edema (Figs. 12(d and e)). In conclusion, no significant cytotoxic effect is observed at the enzymatic or structural level in the function of organs involved in metabolism, elimination and or excretion. Regarding the possible metabolic mechanism of nanoparticles, it is expected that, as in the case of other radioactive NPs, their biological residence time in the liver exceeds the total radioactive decay time [26]. After approximately twenty days, aggregation of the nanoparticles can occur *in vivo*

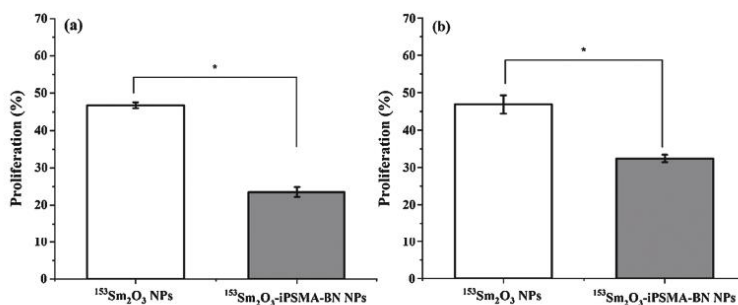


Figure 11. Effect of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs on HepG2 (a) and PC3 (b) proliferation (clonogenic assay) (* statistically significant difference: *p* < 0.05, student's *t*-test).

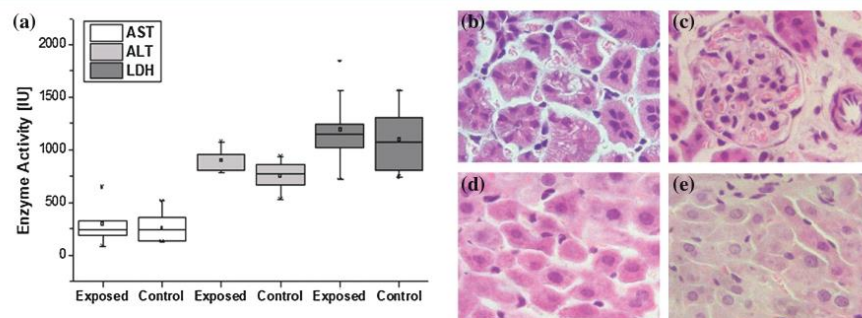


Figure 12. (a) Evaluation of AST, ALT and LDH enzyme activity between mice exposed to Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles and the control group. Microscopic views (b) $\times 100$, (c) $\times 200$ of renal tissue and (d, e) $\times 100$ hepatic tissue of mice exposed to Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles.

Table I. Biodistribution of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs in healthy Balb-C mice shown as percentage of radioactivity per gram of tissue (% ID/g) at different times (mean \pm SD, $n = 3$).

Tissue	Time (h)			
	0.5	3	24	96
Blood	1.18 \pm 0.51	0.58 \pm 0.23	0.14 \pm 0.05	0.05 \pm 0.03
Heart	1.12 \pm 0.15	0.45 \pm 0.13	0.18 \pm 0.11	0.07 \pm 0.02
Lung	1.87 \pm 0.95	1.16 \pm 0.49	0.64 \pm 0.13	0.25 \pm 0.11
Liver	12.04 \pm 2.91	11.78 \pm 1.95	10.15 \pm 0.94	4.46 \pm 0.74
Pancreas	1.98 \pm 0.91	1.62 \pm 0.24	1.38 \pm 0.29	1.25 \pm 0.19
Spleen	1.72 \pm 0.47	1.01 \pm 0.59	0.74 \pm 0.35	0.65 \pm 0.21
Kidney	1.28 \pm 0.31	1.11 \pm 0.41	0.79 \pm 0.40	0.49 \pm 0.18

Delivered by Ingenta

until they are removed as Sm⁺³ ions mainly via the hepatobiliary pathway.

As was expected, normal biodistribution data demonstrated that most of the nanoparticles accumulated in the

liver (Table I). After irradiation, ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs showed luminescent properties, making possible the *in vivo* acquisition of their biodistribution in mice via optical imaging (Fig. 13).

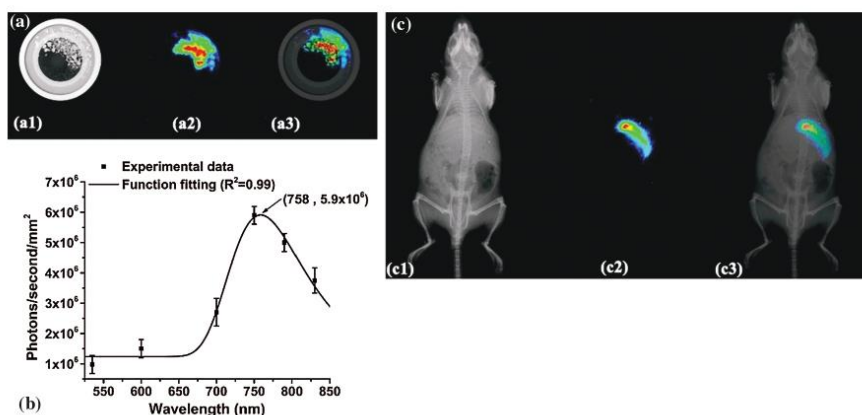


Figure 13. (a) ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles (powder): X-ray image (a1), luminescent image (a2) and merged images (a3); (b) ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles (powder) emission spectrum and (c) biodistribution of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles (92 MBq, 0.5 mg) in a mouse in the prone position at 3 h after administration from X-ray images (c1), luminescent image (c2) and merged images (c3).

DISCUSSION

Sm₂O₃ nanoparticle synthesis methods have been previously reported, such as supercritical antisolvent precipitation (SAS) [27], the hydrogen plasma-metal reaction technique (HPMR) [28], hydrothermal synthesis [29], bioreduction synthesis [15], electrochemical synthesis [30], and combustion synthesis [31], among others. However, the synthesis method used in this research was an easy route to obtaining the Sm₂O₃ NPs with the expected characteristics. Nanoparticle preparation using the precipitation-calcination process offers suitable characteristics such as relative technical ease and a short time requirement. Chemically, the synthesis can be conducted under ambient pressure and temperature, and furthermore, it is a much more straightforward method that avoids undesired byproducts because calcination of the precipitant species gives the formation of Sm₂O₃ as a unique species.

The ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs showed adequate affinity for PSMA and GRPr proteins expressed in HepG2 cells ($K_d = 6.6$ nM) and for GRPr expressed in PC3 cells ($K_d = 10.6$ nM). The higher affinity observed in HepG2 cells is due to the overexpression of both PSMA and GRPr [32]. Similarly, it was demonstrated that the heterodimeric peptide, despite its linkage to the nanoparticles, conserves its active sites, in agreement with data previously reported for the monomeric radiopeptide [33]. In accordance with the aforementioned observations, the cytotoxic effect produced by ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs on HepG2 and PC3 cells was demonstrated by the significant inhibition of cell viability and proliferation (Figs. 10 and 11).

The changes in phenotype and intrinsic heterogeneity of human malignant tumors cause different levels of expression of cell surface receptors [33]. Therefore, the use of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs as a dual-targeting nanosystem might improve the radiation doses and detection sensitivity to liver cancer cells expressing PSMA and GRPr.

Thus far, no reports exist of medical use of the Sm₂O₃ nanoparticles because the medical applications of ¹⁵³Sm are limited to the formation of complexes or aggregates, such as those reported for phosphonates, hydroxyapatite, thermosensitive carriers (e.g., poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)), or microparticles (5 μm) of Sm₂O₃ for radiosynoviothrosis and palliative treatment in bone metastasis [34, 35]. Hepatocellular carcinoma overexpresses PSMA and GRPr proteins [3, 5], and considering that internal radiotherapy treatment for this cancer is indicated when tumors have compromised two-thirds of the liver, ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs could have potential for use as specific agents in targeted radiotherapy. Nonetheless, it could be necessary to evaluate this new nanosystem in preclinical murine models using mice with orthotopic hepatic tumors and to establish the most appropriate route of administration (intratumoral, intra-arterial, etc.).

In the case of hepatocellular carcinoma therapy by radioembolization, ⁹⁰Y-glass microspheres (20 μm) are

commonly used to obstruct the hepatic artery, and from the artery where the radio-microspheres are trapped, ⁹⁰Y irradiates the tumor, although not homogeneously [2]. The advantage of the ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanosystem (<100 nm) could be its target-specific internalization into cancer cells and thus its capacity to deliver a maximum radiation dose in a selective and localized manner. Furthermore, ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs are not limited to their potential use in liver cancer but could also be applied to other types of tumors that overexpress GRPr and PSMA (e.g., prostate cancer).

The long luminescence half-life of lanthanides is associated with the electronic configuration of trivalent ions [36]. After neutron irradiation, ¹⁵³Sm₂O₃ NPs and ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs showed luminescent properties induced by interaction with ionizing radiation [37]. Another method of producing excitation of nanoparticles based on lanthanides (e.g., Sm³⁺ ions) is intramolecular energy transfer from the organic ligands of the NP system to the lanthanide ions [38]. Therefore, additional chemical studies must be performed to characterize the luminescent properties of the ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs. Most relevant in this study is the possibility of obtaining both optical and nuclear imaging for the development of novel nanoradio-pharmaceuticals based on radiolanthanides.

CONCLUSIONS

In this study, ¹⁵³Sm₂O₃ nanoparticles functionalized with the iPSMA-BN heterodimeric peptide were synthesized and biochemically characterized for molecular dual-targeted radiotherapy of hepatocellular carcinoma. The results showed good physicochemical properties that allowed the nanoparticles to be activated by neutron irradiation and functionalized with the iPSMA-BN peptide for biological assessment and optical *in vivo* imaging. The *in vitro* studies indicated good ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN affinity for PSMA and GRP receptor-specific targeting. The results obtained from this research validate further preclinical studies performed to evaluate the dosimetry and therapeutic efficacy of the ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles for *in vivo* imaging and molecular dual-targeted radiotherapy of liver tumors overexpressing PSMA and/or GRPr proteins.

Funding Statement

This study was supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACyT) grant CB2017-2018-A1-S-36841.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest in the publication of this paper.

Acknowledgments: This study was conducted as a component of the activities of the "Laboratorio Nacional

de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, CONA-CyT” (LANIDER).

REFERENCES

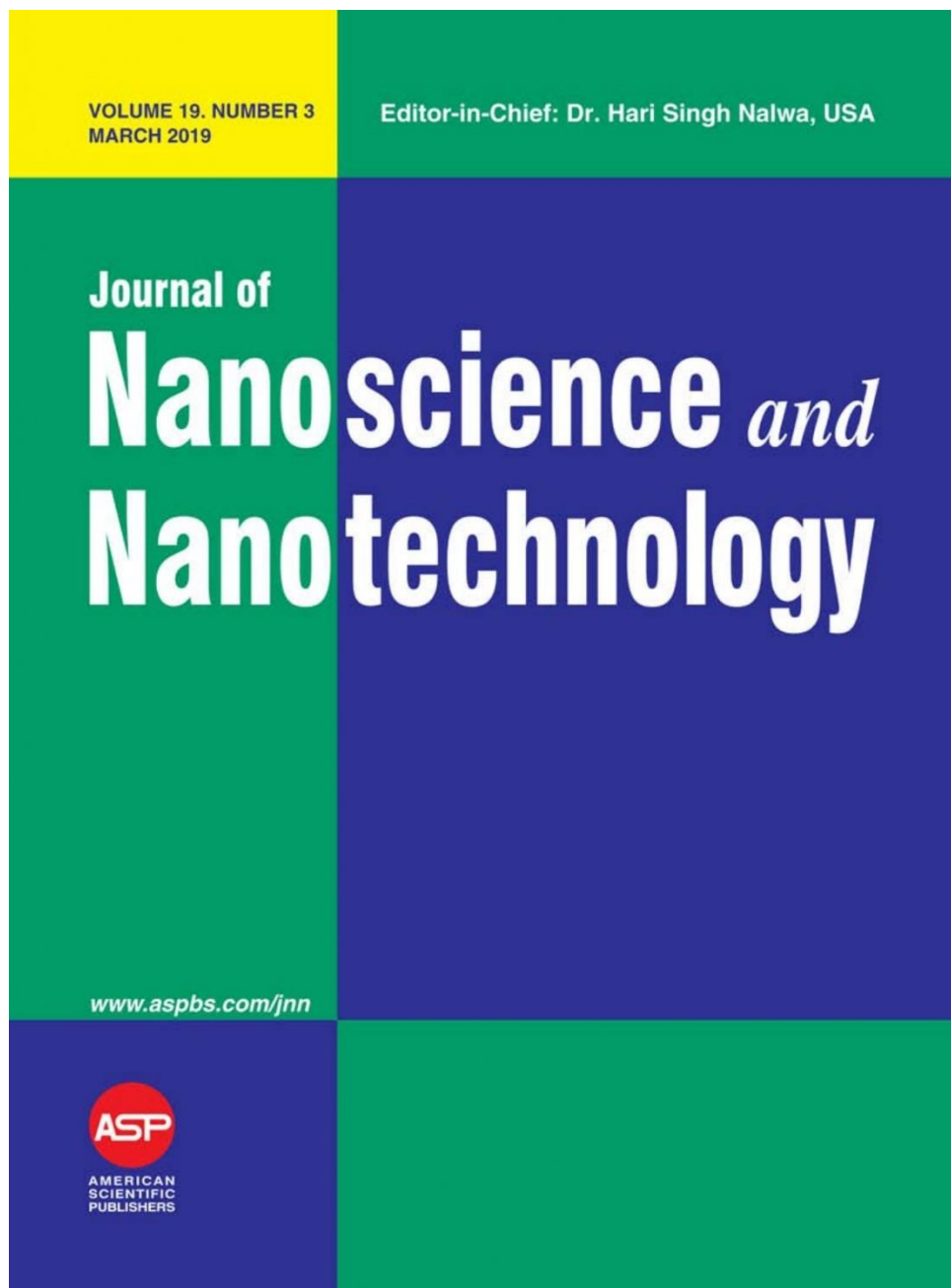
1. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin D.M., Piñeros, M., Znaor, A. and Bray, F., **2018**. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, *144*(8), pp.1941–1953.
2. Saini, A., Wallace, A., Alzubaidi, S., Grace, M., Naidu, S., Sheth R., Albadawi, H. and Oklu R., **2019**. History and evolution of yttrium-90 radioembolization for hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Medicine*, *8*(1), p.55.
3. Tolkach, Y., Goltz, D., Kremer, A., Ahmadzadehfar, H., Berghelm, D., Essler, M., Lam, M., de Keizer, B., Fischer, H. and Kristiansen, G., **2019**. Prostate-specific membrane antigen expression in hepatocellular carcinoma: Potential use for prognosis and diagnostic imaging. *Oncotarget*, *10*(44), pp.4149–4160.
4. Wüstemann, T., Haberkorn, U., Babich, J. and Mier, W., **2019**. Targeting prostate cancer: Prostate-specific membrane antigen-based diagnosis and therapy. *Medicinal Research Reviews*, *39*(1), pp.40–69.
5. Li, X., Zhang, L., Ke, X. and Wang, Y., **2013**. Human gastrin-releasing peptide triggers growth of HepG2 cells through blocking endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Biochemistry (Moscow)*, *78*(1), pp.102–110.
6. Dong, H., Du, S., Zheng, X., Lyu, G., Sun, L., Li, L., Zhang, P., Zhang, C. and Yan, Y., **2015**. Lanthanide nanoparticles: From design toward bioimaging and therapy. *Chemical Reviews*, *115*(19), pp.10725–10815.
7. Singh, S., Srivastava, P., Kapoor, and Singh, G., **2013**. Preparation, characterization, and catalytic activity of rare earth metal oxide nanoparticles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *111*(2), pp.1073–1082.
8. Ramamoorthy, N., Saraswathy, P., Das, M.K., Mehra, K.S. and Ananthkrishnan, M., **2002**. Production logistics and radionuclidic purity aspects of ¹⁵³Sm for radionuclide therapy. *Nuclear Medicine Communications*, *23*, pp.83–89.
9. Islami, S., Peyvandi, R. and Taheri, A., **2016**. Production of ¹⁵³Sm using natural samarium target in Tehran research reactor for radiotherapy purposes. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, *310*(1), pp.53–58.
10. Jacob, K.T., Dixit, A. and Rajput, A., **2016**. Stability field diagrams for Ln-O-Cl systems. *Bulletin of Materials Science*, *39*(3), pp.603–611.
11. Adachi, G.Y. and Imanaka, N., **1998**. The binary rare earth oxides. *Chemical Reviews*, *98*(4), pp.1479–1514.
12. Kùlah, E., Marot, L., Steiner, R., Romanyuk, A., Jung, T.A., Wàckerlin, A. and Meyer, E., **2017**. Surface chemistry of rare-earth oxide surfaces at ambient conditions: Reactions with water and hydrocarbons. *Scientific Reports*, *7*(1), p.43369.
13. Xue, H., Li, X., Zhang, W., Chen, Y., You, X., Rao, J. and Pan, F., **2017**. Microwave-assisted hydrothermal synthesis of Sm₂O₃ nanoparticles and their optical properties. *Journal of Nano Research*, *46*, pp.100–110.
14. Hämmer, M. and Höpfe, H.A., **2019**. Crystalline orthorhombic Ln[CO₃][OH] (Ln = La, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd) compounds hydrothermally synthesized with CO₂ from air as carbonate source. *Zeitschrift für Naturforschung B*, *74*(1), pp.59–70.
15. Sone, B.T., Manikandan, E. and Maaza, M., **2015**. Sm₂O₃ nanoparticles green synthesis via callistemon viminalis' extract. *Journal of Alloys and Compounds*, *650*, pp.357–362.
16. Kang, J.G., Min, B.K. and Sohn, Y., **2015**. Synthesis and characterization of Sm(OH)₃ and Sm₂O₃ nanoroll sticks. *Journal of Materials Science*, *50*(4), pp.1958–1964.
17. Hadjiivanov, K., **2014**. Identification and characterization of surface hydroxyl groups by infrared spectroscopy. *Advances in Catalysis*, *57*, pp.99–318.
18. Coenen, K., Gallucci, F., Mezari, B., Hensen, E. and van Sint Annaland, M., **2018**. An in-situ IR study on the adsorption of CO₂ and H₂O on hydrotalcites. *Journal of CO₂ Utilization*, *24*, pp.228–239.
19. Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S.M., Aghazadeh, M., Ganjali, M.R., Sadeghpour Karimi, M. and Novrouzi, P., **2017**. Samarium carbonate and samarium oxide; synthesis, characterization and evaluation of the photo-catalytic behavior. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, *28*(7), pp.5574–5583.
20. Fielicke, A., Gruene, P., Haertel, M., Harding, D.J. and Meijer, G., **2010**. Infrared spectroscopy and binding geometries of oxygen atoms bound to cationic tantalum clusters. *Journal of Physical Chemistry A*, *114*(36), pp.9755–9761.
21. Shalini, K. and Shivashankar, S.A., **2005**. Oriented growth of thin films of samarium oxide by MOCVD. *Bulletin of Materials Science*, *28*(1), pp.49–54.
22. Tudisco, C., Oliveri, V., Cantarella, M., Vecchio, G. and Condorelli, G.G., **2012**. Cyclodextrin anchoring on magnetic Fe₃O₄ nanoparticles modified with phosphonic linkers. *European Journal of Inorganic Chemistry*, *2012*(32), pp.5323–5331.
23. Smidt, E. and Meissl, K., **2007**. The applicability of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in waste management. *Waste Management*, *27*(2), pp.268–276.
24. Coates, J., **2006**. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd., pp.10815–10837.
25. Świdorski, G., Wilczewska, A.Z., Swisłocka, R., Kalinowska, M. and Lewandowski, W., **2018**. Spectroscopic (IR, raman, UV-Vis) study and thermal analysis of 3d-metal complexes with 4-imidazolecarboxylic acid. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *134*(1), pp.513–525.
26. Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Morales-Avila, E. and Azorín-Vega, E., **2013**. Multifunctional radiolabeled nanoparticles for targeted therapy. *Current Medicinal Chemistry*, *21*(1), pp.124–138.
27. Reverchon, E., Porta, D., Sannino, D., Lisi, L. and Ciambelli, P., **1998**. Supercritical antisolvent precipitation: A novel technique to produce catalyst precursors. Preparation and characterization of samarium oxide nanoparticles. *Studies in Surface Science and Catalysis*, *118*, pp.349–358.
28. Liu, T., Zhang, Y., Shao, H. and Li, X., **2003**. Synthesis and characteristics of Sm₂O₃ and Nd₂O₃ nanoparticles. *Langmuir*, *19*(18), pp.7569–7572.
29. Nguyen, T.-D., Mrabet, D. and Do, T., **2008**. Controlled self-assembly of Sm₂O₃ nanoparticles into nanorods: Simple and large scale synthesis using bulk Sm₂O₃ powders. *Journal of Physical Chemistry C*, *112*(39), pp.15226–15235.
30. Shiri, H.M., Ehsani, A. and Khaled, M.J., **2017**. Electrochemical synthesis of Sm₂O₃ nanoparticles: Application in conductive polymer composite films for supercapacitors. *Journal of Colloid and Interface Science*, *505*(1), pp.940–946.
31. Morris, M. and Israel, S., **2017**. Synthesis and characterization of Sm₂O₃ nanoparticles using combustion method. *International Research Journal of Engineering and Technology*, *1*(181), pp.276–279.
32. Lazaretti, N.S., Macedo, B.R., Izetti, P., Meurer, L., Rodriguez, R. and Schwartzmann, G., **2018**. Gastrin-releasing peptide receptor expression in human hepatocellular carcinoma, cirrhosis and normal hepatic tissue. *Clinical Research Trials*, *4*(6), pp.1–5.
33. Escudero-Castellanos, A., Ocampo-García, B., Ferro-Flores, G., Santos-Cuevas, C., Ávila, E.M., Luna-Gutiérrez, M. and Isaac-Olivé, K., **2019**. Synthesis and preclinical evaluation of the 177Lu-DOTA-PSMA(inhibitor)-Lys3-bombesin heterodimer designed as a

- radiotheranostic probe for prostate cancer. *Nuclear Medicine Communications*, 40(3), pp.278–286.
34. Vigna, L., Matheoud, R., Ridone, S., Arginelli, D., Della Monica, P., Rudoni, M., Inglese, E. and Brambilla, M., **2011**. Characterization of the [¹⁵³Sm]Sm-EDTMP pharmacokinetics and estimation of radiation absorbed dose on an individual basis. *European Journal of Medical Physics*, 27(3), pp.144–152.
 35. Hashikin, N.A., Yeong, C.H., Abdullah, B.J.J., Ng, K.H., Chung, L.Y., Dahalan, R. and Perkins, A.C., **2015**. Neutron activated samarium-153 microparticles for transarterial radioembolization of liver tumour with post-procedure imaging capabilities. *PLOS One*, 10(9), pp.1–17.
 36. Heffern, M.C., Matosziuk, L.M. and Meade, T.J., **2014**. Lanthanide probes for bioresponsive imaging. *Chemical Reviews*, 114(8), pp.4496–4539.
 37. Klein, J.S., Sun, C. and Pratz, G., **2019**. Radioluminescence in biomedicine: Physics, applications, and models. *Physics in Medicine & Biology*, 64(4), p.04TR01.
 38. Binnemans, K., **2009**. Lanthanide-based luminescent hybrid materials. *Chemical Reviews*, 109(9), pp.4283–4374.

IP: 189.251.162.243 On: Tue, 15 Sep 2020 19:36:33
Copyright: American Scientific Publishers
Delivered by Ingenta

11.2. Artículo de co-autoría

Omar Canseco-Hernández, Guillermina Ferro-Flores, Nallely Jiménez-Mancilla, Liliana Aranda-Lara, Blanca Ocampo-García, Diana Trujillo-Benítez, **Alejandra Ancira-Cortez**, Clara Santos-Cuevas. **2021**. Preparation and Dosimetry Assessment of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA Nanoparticles for Targeted Hepatocarcinoma Radiotherapy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*.



Preparation and Dosimetry Assessment of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA Nanoparticles for Targeted Hepatocarcinoma Radiotherapy

Omar Canseco-Hernández^{1,2}, Guillermina Ferro-Flores^{1,*}, Nallely Jiménez-Mancilla^{3,*}, Liliana Aranda-Lara², Blanca Ocampo-García¹, Diana Trujillo-Benítez^{1,4}, Alejandra Ancira-Cortés¹, Enrique Morales-Ávila¹, and Clara Santos-Cuevas¹

¹Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico

²Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Mexico

³Cátedras CONACyT, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac 52750, Mexico

⁴Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50180, Mexico

This research aimed to prepare $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA/ $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles ($^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs) and assess the radiation absorbed dose produced by the nanosystem to hepatic cancer cells by using experimental *in vitro* and *in vivo* biokinetic data. Dy_2O_3 NPs were synthesized and functionalized with the prostate-specific membrane antigen inhibitor peptide (iPSMA). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, transmission electron microscope (TEM), dynamic light scattering (DSL) and zeta potential analyses indicated the formation of Dy_2O_3 -iPSMA NPs (46.11 ± 13.24 nm). After neutron activation, a stable $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem was obtained, which showed adequate affinity to the PSMA receptor in HepG2 cancer cells ($K_d = 9.87 \pm 2.27$ nM). *In vitro* studies indicated high $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA internalization in cancer cells, with high radiation doses to cell nuclei (107 Gy) and cytotoxic effects, resulting in a significant reduction in HepG2 cell viability (decreasing to $2.12 \pm 0.31\%$). After intratumoral administration in mice, the nanosystem biokinetic profile indicated significant retention into the tumoral mass, producing ablative radiation doses (>70 Gy).

Keywords: Dy_2O_3 Nanoparticles, iPSMA, $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA Nanosystem, Targeted Radiotherapy.

1. INTRODUCTION

Hepatic cancer is the second leading cause of death worldwide [1]. In hepatocarcinoma, liver radioembolization (RE) treatment is indicated when the tumor mass exceeds a diameter of 6.5–8 cm (>270 g) since it can be often be used as an overpass to liver transplantation [2]. RE consists of the administration of ^{90}Y -microspheres (20 μm), ^{166}Ho -microspheres (20 μm), or ^{131}I -lipiodol via the hepatic artery, which, when trapped in the distal arterioles, irradiate the malignant mass in a manner similar to the brachytherapy procedure [3, 4]. Our research group has demonstrated that therapeutic radiopharmaceuticals based on samarium-153 oxide or lutetium-177 oxide

nanoparticles (<100 nm) functionalized on their surface with prostate-specific membrane antigen inhibitor peptides (iPSMA) can be internalized into the cytoplasm of hepatic cancer cells that overexpress the PSMA protein [5], useful for molecular target-specific radiotherapy [6, 7].

In this study, $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles (NPs) were synthesized and irradiated at the Triga Mark III reactor for neutron activation. Double neutron capture produces $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs ($E_{\text{Max}}\beta = 399$ keV; $t_{1/2} = 81.6$ h) which during physical decay form a generator system of $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs ($E_{\text{Max}}\beta = 1.84$ MeV; $E_\gamma = 80$ keV; $t_{1/2} = 26.8$ h), so the nanosystem can be administered through the hepatic artery as an *in vivo* $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA/ $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA

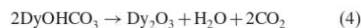
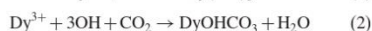
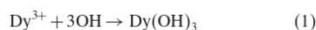
* Authors to whom correspondence should be addressed.

($^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA) radionuclide generator in transient equilibrium [8].

The current research aimed to prepare $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles and assess the nanosystem-produced radiation absorbed dose to hepatic cancer cells by using experimental *in vitro* and *in vivo* biokinetic studies in HepG2 hepatocarcinoma cells (PSMA-positive).

2. EXPERIMENTAL DETAILS

The precipitation-calcination procedure was used for the synthesis of dysprosium oxide nanoparticles. $^{164}\text{Dy}_2\text{O}_3$ (100 mg, ^{164}Dy 99% enriched, Oak Ridge National Laboratory, USA) was suspended in type 1 water (2 mL), followed by the addition of HCl (0.2 mL, 12 M) and heating at 50 °C until the formation of DyCl_3 (clear solution) was achieved. Then, a solution of 3 M NaOH (1.5 mL) was added until a precipitate was obtained. The suspended precipitate was washed three times with water by centrifugation (30 min at 2500 g). The product was dried overnight at 70 °C inside a crucible. Finally, the powder was calcinated at 600 °C for 24 h. The sequence of reactions for Dy_2O_3 nanoparticle (NP) formation by calcination occurs as follows (Eqs. (1–4)):



2.1. Preparation of Dy_2O_3 -iPSMA NPs

Ten milligrams of Dy_2O_3 NPs was added to a 1 mM sodium citrate solution (10 mL), followed by 100 μL of a 1-mg/mL solution of DOTA-HYNIC-iPSMA peptide (iPSMA) (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-hydrazinonicotinyl-Lys(β -naphthylalanine)-NH-CO-NH-Glu (Ontores Biotechnologies Inc.) [9]. The suspension was placed in an ultrasonic bath for 3 h for posterior purification by ultracentrifugation (MWCO 100 kDa; Amicon Ultracel; Millipore, USA) to obtain Dy_2O_3 -iPSMA NPs (Fig. 1).

2.2. Preparation of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs

For neutron activation, 50 mg of $^{164}\text{Dy}_2\text{O}_3$ NPs was irradiated in a Triga MARK III nuclear reactor (Mexico-ININ) for 20 h, under a neutron flux of 3×10^{13} n/s \cdot cm 2 . Afterward, the functionalization with the iPSMA peptide was carried out, as previously described (2.2), to obtain the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs. For comparative purposes, 50 mg of $^{164}\text{Dy}_2\text{O}_3$ (reactive powder, not as NPs) was also irradiated under the same conditions. The activity produced by ^{166}Dy and ^{166}Ho was calculated using the Origin 2 code (Triga Mark reactors), and experimentally,

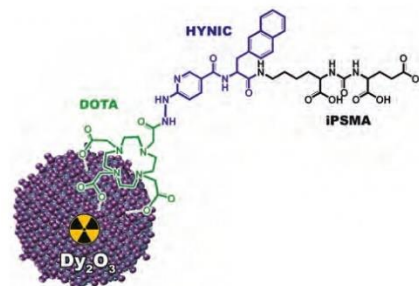


Figure 1. Scheme of the Dy_2O_3 -iPSMA nanoparticles.

it was evaluated by gamma-ray spectrometry, employing a multichannel analyzer with an HPGe detector (ORTEC).

To observe size and morphology, Dy_2O_3 NPs and Dy_2O_3 -iPSMA NPs were analyzed under a JEOL JEM 2010 HT microscope (transmission electron microscopy, TEM) at 200 kV. Samples were fixed by evaporating aqueous nanoparticles (a drop) on a copper grid (carbon-coated). The mean diameter of the nanoparticles was obtained from the measurement of six hundred nanoparticles using the ImageJ software. The zeta potential (ζ) and hydrodynamic diameter were obtained in a Nanotracer analyzer (dynamic laser scattering, DLS; Nanotracer Wave).

Infrared spectra (50 scans from 4000 to 400 cm^{-1} and at a 1- cm^{-1} resolution) from Dy_2O_3 NPs, Dy_2O_3 -iPSMA NPs and iPSMA peptide (powder samples) were obtained by using a FTIR (Fourier transform infrared) and ATR (attenuated total reflection) platforms (PerkinElmer2000, Pike Technologies).

2.3. Affinity Assessment in Cells

The HepG2 cells (HB-8065 $^{\text{TM}}$; PSMA-positive) of hepatocellular carcinoma were obtained from ATCC $^{\text{®}}$. The cells were incubated at 37 °C, CO $_2$ (5%), and 85% humidity, in Dulbecco's modified Eagle's medium enriched with fetal bovine serum (10%), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 100 units/mL penicillin. $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA affinity was evaluated by a saturation binding assay. HepG2 cells (suspension, 1×10^6 cells/100 μL) were grown in 6-well plates (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) for 24 h (5% CO $_2$, 85% humidity, and 37 °C). Then, the cells were incubated with $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles (200 μL) at various concentrations (from 90 nM to 0.25 nM) ($n = 3$) at 4 °C for 2 h. In parallel, the nonspecific binding was determined by adding the nonradioactive peptide (10 mM iPSMA). The free (supernatant) and bound radioactivity (radionanoparticles) fractions were measured in a gamma detector (NaI(Tl) detector MNL Inc.) and analyzed to determine of the specific and nonspecific binding.

B_{\max} and K_d were established by nonlinear regression analysis (Prism software).

2.4. Cell Internalization

$^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ and $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticle internalization by cancer cells (HepG2) was assessed using 4×10^5 cells/PBS (500 μL /test tube). The cells were separately incubated at 0.5, 3, and 24 h, with each treatment (50 μL , $n = 3$): (a) $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ nanoparticles (37 kBq), (b) $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles (37 kBq), (c) $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ (reactive powder, not as nanoparticles) (37 kBq), and (d) control (no treatment). The total volume of each test tube (initial activity measured in a NaI(Tl) detector) represented 100%. The internalized activity in cells was calculated after centrifugation of tubes (5 min \times 700 g), addition of 1 mL of 1 M NaOH to the bottom portions followed by an additional centrifugation (5 min \times 700 g). The collected supernatant was used to evaluate the percentages of cellular internalization.

2.5. Cell Dosimetry and Cell Viability Assay

The XTT assay (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide sodium salt assay) was used to evaluate cell viability. Cancer cells (HepG2, 1×10^4 cells/well) were seeded and incubated for 24 h in a 96-well microplate (5% CO_2 , 85% humidity, and 37 $^\circ\text{C}$). The treatments added to the well plates containing HepG2 cells in fresh culture medium (150 μL , 1×10^4 cells/well) were the following: (a) 20.7 kBq of $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ NPs and 16.3 kBq of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ NPs mixed in a total volume of 37 μL ($n = 6$); (b) 20.7 kBq of $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs and 16.3 kBq of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs mixed in a total volume of 37 μL ($n = 6$); (c) 20.7 kBq of $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ (reactive powder, not as NPs) and 16.3 kBq of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ (reactive powder, not as NPs) mixed in a total volume of 37 μL ($n = 6$); and (d) 37 μL of 0.9% NaCl (untreated control) ($n = 6$). The suspended cells were incubated for 24 h with the $^{166}\text{Dy}/^{166}\text{Ho}$ radionuclide systems. The treatment was withdrawn, and the XTT assay evaluated the cell viability at 36 and 48 h, which were correlated with the radiation doses calculated under the following considerations and steps:

(a) The decay of the $^{166}\text{Dy}/^{166}\text{Ho}$ radionuclide presents a transient equilibrium (generator system); thus, the activities (Bq) of ^{166}Dy and ^{166}Ho radionuclides at 36 and 48 h were calculated as follows (Eqs. (5) and (6)):

$$A_{\text{Dy}-166}(t) = A_{\text{Dy}-166}^0 e^{-\lambda_{\text{Dy}-166} t} \quad (5)$$

$$A_{\text{Ho}-166}(t) = \frac{\lambda_{\text{Ho}-166} A_{\text{Dy}-166}^0}{\lambda_{\text{Ho}-166} - \lambda_{\text{Dy}-166}} (e^{-\lambda_{\text{Dy}-166} t} - e^{-\lambda_{\text{Ho}-166} t}) + A_{\text{Ho}-166}^0 e^{-\lambda_{\text{Ho}-166} t} \quad (6)$$

J. Nanosci. Nanotechnol. 21, 1–10, 2021

(b) The HepG2 cell proliferation ($\# \text{cell}(t)$) during the incubation time was fitted from data previously reported³ as follows (Eq. (7)):

$$\# \text{cell}(t) = \# \text{cell}^0 (0.9839 e^{0.0192t}) \quad (7)$$

(c) Biokinetic models ($q(t)$) were corrected by decay ($e^{-\lambda t}$) to obtain the radiobiokinetic models [$A(t) = q(t) e^{-\lambda t}$], which, when integrated over time ($t = 36$ h, $t = 48$ h, and $t = 96$ h), give the total number of disintegrations (N) (Bq \cdot s) per unit of activity (Bq \cdot s/Bq). This latter value, multiplied by the overall radionuclide activity (Eqs. (5) and (6)) and divided by the total number of cells (Eq. (11)) at $t = 36$ h, $t = 48$ h, and $t = 96$ h ($A/\# \text{cell}$) (Bq/cell), yielded the total number of disintegrations (N) (Bq \cdot s) of the nanosystem that occurred in the cytoplasm of HepG2 cells (Eqs. (8)–(11)).

$$N_{\text{Dy}_2\text{O}_3 \text{ NPs}} = \frac{A_{\text{Dy}-166}(t)}{\# \text{cell}(t)} \times \int_0^t (q_{\text{Dy}_2\text{O}_3 \text{ NPs}}(t) * e^{-\lambda_{\text{Dy}-166} t}) dt \quad (8)$$

$$N_{\text{Dy}_2\text{O}_3 \text{-iPSMA NPs}} = \frac{A_{\text{Dy}-166}(t)}{\# \text{cell}(t)} \times \int_0^t (q_{\text{Dy}_2\text{O}_3 \text{-iPSMANPs}}(t) * e^{-\lambda_{\text{Dy}-166} t}) dt \quad (9)$$

$$N_{\text{Ho}_2\text{O}_3 \text{ NPs}} = \frac{A_{\text{Ho}-166}(t)}{\# \text{cell}(t)} \times \int_0^t (q_{\text{Ho}_2\text{O}_3 \text{ NPs}}(t) * e^{-\lambda_{\text{Ho}-166} t}) dt \quad (10)$$

$$N_{\text{Ho}_2\text{O}_3 \text{-iPSMANPs}} = \frac{A_{\text{Ho}-166}(t)}{\# \text{cell}(t)} \times \int_0^t (q_{\text{Ho}_2\text{O}_3 \text{-iPSMANPs}}(t) * e^{-\lambda_{\text{Ho}-166} t}) dt \quad (11)$$

(d) To evaluate the dose delivered to cell nuclei by the crossfire effect from the $^{166}\text{Dy}/^{166}\text{Ho}$ that remains in the culture medium during the 24 h of treatment incubation (activity not internalized in cells) or outside the target cell by the proliferation effect (cellular division), the total number of disintegrations (N) (Bq \cdot s) was calculated by integration of Eqs. (5) and (6) as follows (Eqs. (12)–(15)):

$$N_{\text{Dy}-166} = \int_0^t A_{\text{Dy}-166}^0 e^{-\lambda_{\text{Dy}-166} t} dt \quad (12)$$

$$N_{\text{Dy}-166} = \frac{A_{\text{Dy}-166}^0}{\lambda_{\text{Dy}-166}} (1 - e^{-\lambda_{\text{Dy}-166} t}) \quad (13)$$

3

$$N_{\text{Ho-166}} = \int_0^t \frac{\lambda_{\text{Ho-166}} A_{\text{Dy-166}}^0}{\lambda_{\text{Ho-166}} - \lambda_{\text{Dy-166}}} \times (e^{-\lambda_{\text{Dy-166}} t} - e^{-\lambda_{\text{Ho-166}} t}) dt \quad (14)$$

$$N_{\text{Ho-166}}(0, t) = \frac{\lambda_{\text{Ho-166}} A_{\text{Dy-166}}^0}{\lambda_{\text{Ho-166}} - \lambda_{\text{Dy-166}}} \times \left(\frac{1 - e^{-\lambda_{\text{Dy-166}} t}}{\lambda_{\text{Dy-166}}} - \frac{1 - e^{-\lambda_{\text{Ho-166}} t}}{\lambda_{\text{Ho-166}}} \right) \quad (15)$$

The absorbed dose fraction (DF)(Gy/Bq·s) from the cytoplasm (Cy) to cell nuclei (n) and the DF of the crossfire effect to the cell nucleus were calculated with *MIRDcell* software (<http://mirdcell.njms.rutgers.edu>) (cells: 20 μm in diameter, nucleus radius of 3 μm , density = 1 mg/mL). Finally, the average absorbed dose was calculated as $\bar{D} = N \times \text{DF}$ (Gy) (Eqs. ((16)–(19))).

$$\bar{D}_{\text{Ho}_2\text{O}_3\text{-iPSMA NPs}(n \leftarrow \text{Cy})} = N_{\text{Ho}_2\text{O}_3\text{-iPSMA NPs}} * DF_{\text{Ho-166}(n \leftarrow \text{Cy})} \quad (16)$$

$$\bar{D}_{\text{Dy}_2\text{O}_3\text{-iPSMA NPs}(n \leftarrow \text{Cy})} = N_{\text{Dy}_2\text{O}_3\text{-iPSMA NPs}} * DF_{\text{Dy-166}(n \leftarrow \text{Cy})} \quad (17)$$

$$\bar{D}_{\text{Ho}_2\text{O}_3\text{ NPs}(n \leftarrow \text{Cy})} = N_{\text{Ho}_2\text{O}_3\text{ NPs}} * DF_{\text{Ho-166}(n \leftarrow \text{Cy})} \quad (18)$$

$$\bar{D}_{\text{Dy}_2\text{O}_3\text{ NPs}(n \leftarrow \text{Cy})} = N_{\text{Dy}_2\text{O}_3\text{ NPs}} * DF_{\text{Dy-166}(n \leftarrow \text{Cy})} \quad (19)$$

The total cell nucleus dose was the sum of the calculated dose for each radionuclide and the dose due to the crossfire effect. Thus, the DF values for the self-dose were: $DF_{\text{Ho-166}(n \leftarrow \text{Cy})} = 2.54\text{E} - 04$ Gy/Bq·s and $DF_{\text{Dy-166}(n \leftarrow \text{Cy})} = 1.65\text{E} - 04$ Gy/Bq·s; and the DF values for the cross-dose were: $DF_{\text{Ho-166}(n \leftarrow \text{OUT OF THE CELL})} = 2.31\text{E} - 06$ Gy/Bq·s and $DF_{\text{Dy-166}(n \leftarrow \text{OUT OF THE CELL})} = 1.98\text{E} - 06$ Gy/Bq·s.

BALB/c mice (weight of 18–20 g; 6–7 weeks old) were used for *in vivo* studies (biodistribution) according to the 062-ZOO-1999 Official Mexican Norm entitled *Care of Laboratory Animals: Regulations and Ethical Rules*. Mice were injected into the tail vein with $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles (50 μL , 3.7 MBq; 1.63 MBq of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA and 2.07 MBq of $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA) and dissected at 30 min, 3 h, 24 h, and 96 h ($n = 3$). The spleen, heart, lungs, kidney liver, and pancreas were removed for activity measurement (NaI(Tl) detector). The percentage of the injected activity per organ (%IA) with regard to the total injected activity was determined. Athymic mice with induced HepG2 tumors (mass of 0.30 ± 0.05 g) were also injected intratumorally

with $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles (25 μL , 3.7 MBq; 1.63 MBq of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA and 2.07 MBq of $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA) and sacrificed at 0.5, 3, 24, and 96 h ($n = 3$). As a control, $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ powder (non-nano particle form) was administered to mice intratumorally (25 μL , 3.7 MBq), and the mice were dissected at 24 h ($n = 3$). In all mice, the pancreas, kidney, heart, liver, lungs, spleen, and tumors were removed for activity measurement in the gamma counter to determine the percentage of the injected activity per organ (%IA) with regard to the total injected activity. The %IA values of each organ or tumor at different times were adjusted to a triexponential function to obtain biokinetic models ($q(t)$). Considering that the total activity was in a $^{166}\text{Dy}/^{166}\text{Ho}$ ratio of 0.44/0.56, the $q(t)$ function in each organ was obtained in agreement with the respective radionuclide fraction. The $A_h(t)$ functions [$A_h(t) = q_h(t)e^{-\lambda_h t}$] were integrated (from $t = 0$ to $t = \infty$) to obtain the total number of nuclear transitions (N) occurring in the primary source regions. Finally, the total disintegrations of ^{166}Ho generated *in vivo* were also considered taking into account that until total decay $N_{\text{Dy-166}} = N_{\text{Ho-166}}$.

The absorbed doses to the tumor and different organs were assessed in agreement with the general equation:

$$\bar{D}_{\text{target} \leftarrow \text{source}} = \sum_{\text{sources}} N_{\text{source}} \times DF_{\text{target} \leftarrow \text{source}} \quad (20)$$

where $\bar{D}_{\text{target} \leftarrow \text{source}}$ is the average absorbed dose from a source organ to a target organ and $DF_{\text{target} \leftarrow \text{source}}$ is a dose factor:

$$DF_{\text{target} \leftarrow \text{source}} = \sum_i \Delta_i \Phi_i(\text{target} \leftarrow \text{source}) \quad (21)$$

Δ_i is defined as $\sum n_i E_i$, which represents the energy emitted per nuclear transition for the i -type radiations. The Φ_i terms are the absorbed fractions that depend on the i -type emission properties, separation of the source and target organs and their shape and size. The DF values were obtained from the OLINDA 2.0 code for a mouse model of 20 g.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The nanoparticles were obtained as a fine powder. The TEM analyses showed a spherical morphology with uniform and homogeneous distribution. The diameter of Dy_2O_3 nanoparticles determined by TEM was $45.85 \text{ nm} \pm 14.67 \text{ nm}$, with a monodisperse and monomodal distribution, as observed in Figure 2.

After functionalization of Dy_2O_3 nanoparticles with the biomolecule (peptide), the nanosystem displayed a mean diameter of $46.11 \text{ nm} \pm 13.24 \text{ nm}$. A homogeneous profile of the size distribution with a monomodal and monodisperse histogram was also maintained. The TEM micrographs revealed that the morphology of the nanoparticles was retained, as shown in Figure 3.

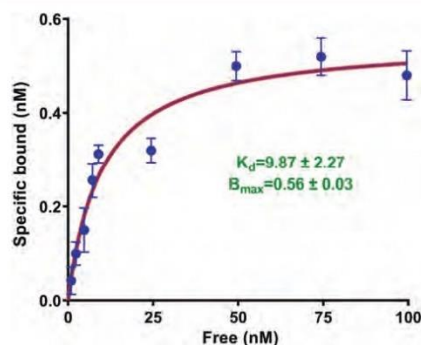


Figure 5. Saturation binding assay results of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles on HepG2 cancer cells (PSMA+).

The saturation binding analysis of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles on HepG2 cancer cells (PSMA+) indicated K_d and B_{\max} values of 9.87 ± 2.27 nM and 0.56 ± 0.03 nM, respectively, which demonstrated that the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem exhibited an adequate biological affinity for PSMA receptors (Fig. 5).

The cellular internalization results showed a statistically higher internalization of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA than the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ nanoparticles in HepG2 cells (Fig. 6). The $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ powder, in non-nano particle form, showed a negligible internalization of $0.4 \pm 0.2\%$ at all evaluated times.

The percentages of cellular internalization (%Int.) of Dy_2O_3 NPs, Dy_2O_3 -iPSMA NPs, Ho_2O_3 NPs, and Ho_2O_3 -iPSMA NPs to the HepG2 cell cytoplasm at different times adjusted to an exponential function yielded the following

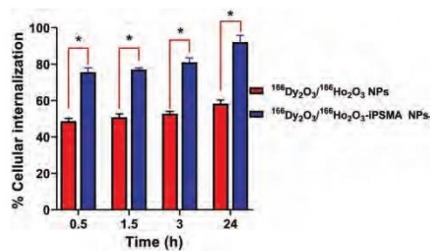


Figure 6. Internalization of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ NPs and $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs at different times in PSMA-positive HepG2 cells (* statistically significant difference: $p < 0.05$, student's t -test). The $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ powder (non-nano particle form) showed low internalization of $0.4 \pm 0.2\%$ at all evaluated times (not shown in the graphic).

6

biokinetic models (Eqs. (22–25)):

$$q_{\text{Dy}_2\text{O}_3 \text{ NPs}}(t) = 0.255e^{-0.014t} - 0.198e^{-0.123t} + 0.414e^{-0.0002t} \quad (22)$$

$$q_{\text{Dy}_2\text{O}_3 \text{ -iPSMA NPs}}(t) = 0.374e^{-4.5E-7t} - 0.186e^{-0.151t} + 0.551e^{-2.8E-8t} \quad (23)$$

$$q_{\text{Ho}_2\text{O}_3 \text{ NPs}}(t) = 0.319e^{-0.319t} - 0.425e^{-0.291t} + 0.583e^{-4.9E-9t} \quad (24)$$

$$q_{\text{Ho}_2\text{O}_3 \text{ -iPSMANPs}}(t) = 0.084e^{-1.09t} - 0.243e^{-0.25t} + 0.922e^{-2.1E-8t} \quad (25)$$

Table I shows the calculated total number of disintegrations (N) in the cell cytoplasm and the crossfire effect of radioactivity outside the target cell or in other cells as a consequence of their proliferation (cellular division and therefore radioactivity partition). The DF values used for the self-dose calculations were $DF_{\text{Ho}-166(n \leftarrow C)} = 2.54E - 04$ Gy/Bq·s and $DF_{\text{Dy}-166(n \leftarrow C)} = 1.65E - 04$ Gy/Bq·s;

Table I. (a) Average total disintegration (N) occurring in the HepG2 cell cytoplasm and outside of the cell (crossfire effect of radioactivity outside the cell or in other cells, as a consequence of their proliferation) (Bq·s per cell) produced by 37 kBq/well of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/\text{Ho}_2\text{O}_3$ or $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMANPs (10^4 cells/well at $t = 0$); (b) average radiation absorbed dose to cell nuclei considering the cell proliferation (Gy) (in brackets), and (c) total radiation doses of the nanosystems (Gy) (mean \pm SD, $n = 3$).

Nanosystem	Time (h)		
	24	36	48
Dy_2O_3 NPs	45413 [21.38]	51814 [23.03]	52010 [23.29]
Ho_2O_3 NPs	70193 [34.04]	81057 [44.69]	82589 [44.49]
Dy_2O_3 -iPSMA NPs	36907 [33.04]	65201 [36.03]	64445 [36.98]
Ho_2O_3 -iPSMA NPs	57825 [53.33]	102386 [70.18]	101308 [69.94]
Cross-dose of Dy_2O_3 NPs	26582 [0.06]	51612 [0.12]	78707 [0.18]
Cross-dose of Dy_2O_3 -iPSMA NPs	41087 [0.09]	80742 [0.19]	124983 [0.29]
Cross-dose of Ho_2O_3 NPs	21603 [0.04]	64947 [0.13]	97526 [0.19]
Cross-dose of Ho_2O_3 -iPSMA NPs	33848 [0.07]	101987 [0.20]	153310 [0.30]
The total radiation dose (Gy) delivered by the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/\text{Ho}_2\text{O}_3$ nanosystem considering the cross-dose	55.52 \pm 4.77	67.97 \pm 3.98	68.15 \pm 5.11
The total radiation dose (Gy) delivered by the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem considering the cross-dose	86.54 \pm 5.48	106.60 \pm 5.01	107.51 \pm 6.37

J. Nanosci. Nanotechnol. 21, 1–10, 2021

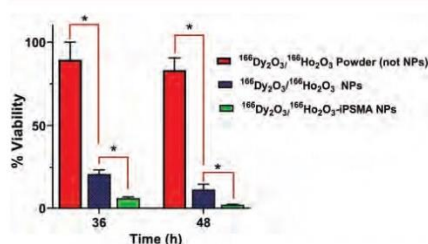


Figure 7. Effect of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ powder (non-nano particle form), $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ nanoparticles, and $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles on HepG2 cell (PSMA+) viability at 36 and 48 h (* statistically significant difference: $p < 0.05$, student's t -test).

and the DF values used for the cross-dose calculations were: $DF_{\text{Ho-166}(n \leftarrow C)} = 2.54\text{E} - 04 \text{ Gy/Bq} \cdot \text{s}$ and $DF_{\text{Dy-166}(n \leftarrow C)} = 1.65\text{E} - 04 \text{ Gy/Bq} \cdot \text{s}$. Table I shows the delivered radiation doses to the cell nucleus for each nanosystem.

The cell internalization data correlated with the cytotoxicity results since a higher decrease in viability of HepG2 cells was observed for the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem (Fig. 7). That is, cells treated with $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (48 h after treatment) exhibited viability of $2.12 \pm 0.31\%$ (radiation dose of 107.51 Gy, Table I) with a statistically significant difference ($p < 0.05$, Student's t -test) relative to the group treated with $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ NPs ($11.23 \pm 3.21\%$) (68.15 Gy, Table I) and the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ powder (not as NPs) ($83.26 \pm 7.31\%$). The $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ NP treatment decreased cell viability, which was attributed to nonspecific uptake because of the size range of the nanosystem [10, 11] and to the crossfire effect generated by radiation in the medium. However, *in vivo* internalization and uptake of nonfunctionalized NPs at the cellular level are expected to be lower than those observed *in vitro* due to the lack of a recognition biomolecule that specifically targets malignant cells in the human system [11, 12].

In agreement with previous studies [11, 13], the biodistribution profile of the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA

Table II. Biodistribution of the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem in healthy BALB/c mice (percentage of the injected radioactivity per organ, %IA) at different times (mean \pm SD, $n = 3$) after intravenous administration.

Tissue	Time (h)			
	0.5	3	24	96
Heart	1.11 \pm 0.31	0.73 \pm 0.19	0.34 \pm 0.18	0.14 \pm 0.09
Liver	22.24 \pm 1.83	18.09 \pm 1.57	12.35 \pm 1.19	6.09 \pm 0.67
Lung	2.36 \pm 0.92	1.13 \pm 0.45	0.71 \pm 0.18	0.31 \pm 0.09
Pancreas	0.15 \pm 0.09	0.14 \pm 0.05	0.11 \pm 0.07	0.07 \pm 0.03
Spleen	3.08 \pm 0.82	1.43 \pm 0.96	0.93 \pm 0.78	0.69 \pm 0.23
Kidney	2.01 \pm 0.62	1.25 \pm 0.85	0.98 \pm 0.47	0.69 \pm 0.21

nanosystem in healthy mice, after intravenous administration, showed that nanoparticles were captured mainly by the liver (Table II). For this reason, nanoparticles for target-specific treatment must be administered in small volumes within the artery closest to the affected organ by using, for example, stereotactic surgery, which would permit high uptake by the tumor and its micrometastases [12].

In mice with induced HepG2 tumors, the biodistribution profile of the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem after intratumoral administration demonstrated that the nanoparticles were significantly retained inside the malignant mass (Table III), which, consequently, produced a high number of disintegrations in the tumoral mass that were capable of generating ablative radiation doses (Table IV). When $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ powder in aqueous suspension (not NPs) was administered intratumorally in mice, 85% of the activity was found in the liver after 24 h, and less than 10% was retained by the tumor.

It is relevant to emphasize that in addition to the number of disintegrations of ^{166}Ho produced by the decay of its initial injected activity, by each ^{166}Dy transition, one atom of ^{166}Ho is produced; therefore, the total number of disintegrations that occur in each organ and the tumor is the same for both radionuclides ($^{166}\text{Dy}/^{166}\text{Ho}$ *in vivo* generated system), $N_{\text{Dy-166}} = N_{\text{Ho-166}}$. As activity is $A = \lambda N$, the activity of ^{166}Ho produced *in vivo* is adjusted as follows (Eq. (26)) [8]:

$$A_{\text{Ho-166}} = \frac{\lambda_{\text{Ho-166}} A_{\text{Dy-166}}^0}{\lambda_{\text{Dy-166}}} = 3.06 \text{ MBq} \quad (26)$$

The estimated radiation dose to the tumor produced by the *in vivo* generator nanosystem is the energy delivered by units of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA radioactivity taken up by the tumoral cells, in addition to the energy delivered by 3.06 units of $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA radioactivity generated *in vivo* (Fig. 8). Therefore, the absorbed radiation dose values produced in mice by the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem to the tumor, liver, kidney, and spleen were 73.73 Gy/MBq, 0.132 Gy/MBq, 0.607 Gy/MBq, and 0.358 Gy/MBq, respectively (Table IV). If $^{177}\text{Lu}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles, previously reported [6], follow the

Table III. Biodistribution of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticles in athymic mice with induced HepG2 tumors (percentage of the injected radioactivity per organ, %IA) at different times (mean \pm SD, $n = 3$) after intratumoral administration.

Tissue	Time (h)			
	0.5	3	24	96
Heart	1.87 \pm 0.25	0.37 \pm 0.12	0.09 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01
Lung	0.26 \pm 0.11	0.18 \pm 0.09	0.11 \pm 0.06	0.03 \pm 0.01
Liver	1.98 \pm 0.72	1.72 \pm 0.51	1.11 \pm 0.45	0.51 \pm 0.05
Pancreas	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Spleen	0.95 \pm 0.32	0.57 \pm 0.24	0.21 \pm 0.12	0.02 \pm 0.01
Kidney	1.76 \pm 0.54	1.39 \pm 0.46	1.08 \pm 0.32	0.53 \pm 0.28
Tumor	81.87 \pm 8.94	72.21 \pm 6.87	62.58 \pm 9.25	41.32 \pm 6.25

Table IV. Radiation absorbed dose of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs to HepG2 tumors, liver, kidney, and spleen in mice (intratumoral administration) normalized to unit administered activity (MBq).

Nanosystem (organ)	Biokinetic model	$\int_0^\infty q_b(t)dt$ Biological residence time (h)	$\int_0^\infty A_b(t)dt$ (total) disintegrations	Absorbed dose (Gy/MBq)
$^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (tumor)	$^*q_b(t) = 89.2e^{-6.41t} + 11.4e^{-0.0149t} + 21.1e^{-0.0032t}$ $A_b(t) = 89.2e^{-6.415t} + 11.4e^{-0.0234t} + 21.1e^{-0.017t}$	73.11	8.280E+10	12.800
$^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (tumor)	$^*q_b(t) = 44.6e^{-4.790t} + 40.2e^{-0.0058t} + 1.87e^{-0.246t}$ $A_b(t) = 44.6e^{-4.816t} + 40.2e^{-0.032t} + 1.87e^{-0.272t}$	69.83	4.644E+10 + 8.280E+10^a	60.930
$^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (liver)	$^*q_b(t) = 19.5e^{-11.3t} + 0.313e^{-0.0601t} + 0.509e^{-0.0086t}$ $A_b(t) = 19.5e^{-11.3085t} + 0.313e^{-0.0686t} + 0.509e^{-0.0171t}$	0.79	1.299E+09	0.019
$^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (liver)	$^*q_b(t) = 5.14e^{-11.2t} + 0.798e^{-0.011t} + 0.325e^{-0.179t}$ $A_b(t) = 5.14e^{-11.226t} + 0.798e^{-0.037t} + 0.325e^{-0.205t}$	0.77	8.600E+08 + 1.299E+09 ^a	0.113
$^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (kidney)	$^*q_b(t) = 42.3e^{-11.4t} + 0.087e^{-0.0415t} + 0.55e^{-0.009t}$ $A_b(t) = 42.3e^{-11.4085t} + 0.087e^{-0.05t} + 0.55e^{-0.0175t}$	1.05	1.325E+09	0.114
$^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (kidney)	$^*q_b(t) = 13.5e^{-11.3t} + 0.767e^{-0.0098t} + 0.244e^{-0.662t}$ $A_b(t) = 13.5e^{-11.326t} + 0.767e^{-0.0358t} + 0.244e^{-0.688t}$	0.79	8.280E+08 + 1.325E+09^a	0.544
$^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (spleen)	$^*q_b(t) = 24.8e^{-11.7t} + 0.176e^{-0.323t} + 0.202e^{-0.0326t}$ $A_b(t) = 24.8e^{-11.7085t} + 0.176e^{-0.3315t} + 0.202e^{-0.0411t}$	0.089	2.720E+08	0.063
$^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs (spleen)	$^*q_b(t) = 6.47e^{-12.2t} + 0.259e^{-0.027t} + 0.326e^{-0.447t}$ $A_b(t) = 6.47e^{-12.226t} + 0.259e^{-0.057t} + 0.326e^{-0.473t}$	0.092	2.030E+08 + 2.720E+08^a	0.295

Notes: $^*q_b(t)$ = Activity corrected by decay, biological behavior [$q_b(t) = A_b(t)e^{t/\tau}$]; ^aHo-166 generated *in vivo*.

same biokinetic behavior in the tumor ($q_b(t)$) as that of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs shown in Table IV, after correcting for ^{177}Lu radioactive decay ($[A_b(t) = q_b(t)e^{-\lambda_{Lu}t - 177t}]$), it is possible to estimate a radiation dose of 16.72 Gy/MBq, which indicates a dose value 4.7 times lower than that obtained with the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem. Following the same reasoning, the tumoral radiation dose with ^{90}Y -nanoparticles is estimated at 37 Gy/MBq, half the radiation dose produced

by the *in vivo* generator nanosystem. However, in the case of hepatocellular carcinoma therapy by radioembolization, ^{90}Y is not chemically used as nanoparticles; it is used as ^{90}Y -glass microspheres (20 μm) to obstruct the hepatic artery. From the distal arterioles, where the radiomicrospheres are trapped, ^{90}Y irradiates the malignant mass without penetrating cells [2–4]. The advantage of the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem (<100 nm) could be its target-specific internalization into hepatic cancer

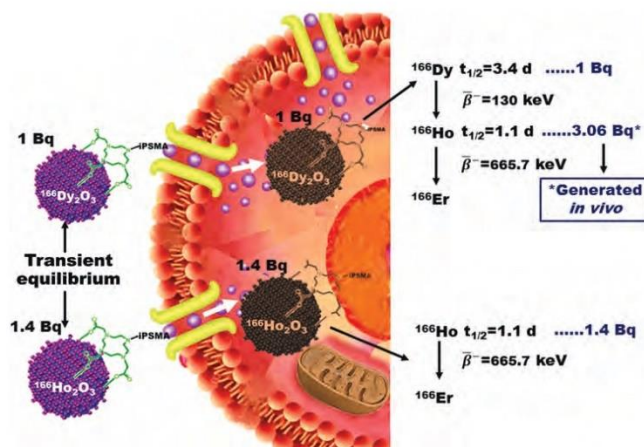


Figure 8. Summary of the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem advantages developed in this research: (a) specific target-cell internalization (specific molecular recognition by the PSMA protein), (b) production of ablative radiation doses due to the activity of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA taken up by the tumoral cells, and (c) additional radiation dose delivered by the ^{166}Ho activity generated *in vivo* due to the physical decay of ^{166}Dy .

cells and thus its capacity to deliver radiation doses in a localized and selective mode (Fig. 8). Compared with ^{90}Y -glass microspheres, $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3$ and $^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ nanoparticles have the benefit of possessing a gamma emission (^{166}Dy 82.5 keV, 12.9%; ^{166}Ho 80.6 keV, 6.2%) suitable for SPECT imaging [8]. Nevertheless, $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs have to be evaluated in mice with orthotopic hepatic tumors. It is important to mention that the use of $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs is limited not only to liver cancer or secondary hepatic metastases but also to tumors in which PSMA protein is heavily expressed, analyzing in each case the best route of injection (intratumorally, intra-arterially, and so forth) to enhance the radiation dose delivered to tumors.

Thus far, no reports of neutron-irradiated $\text{Dy}_2\text{O}_3/\text{Ho}_2\text{O}_3$ nanoparticles as a possible radiotherapy system exist because the applications of $^{166}\text{Dy}/^{166}\text{Ho}$ are limited to the formation of simple complexes or aggregates, such as those reported for biotin, phosphonates, or microparticles (5 μm) for radiosynoviothetis and treatment in bone metastasis [14, 15]. Hepatocellular carcinoma overexpresses PSMA significantly [5], and since radiotherapy treatment for this malignancy is recommended when tumor masses have invaded two-thirds of the liver, $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA could possibly be used as a specific nanosystem in targeted radiotherapy.

4. CONCLUSIONS

In this research, a $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem was synthesized and assessed as a possible targeted radiotherapy device. The results demonstrated adequate properties that permitted the $\text{Dy}_2\text{O}_3/\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem to be neutron-activated and to maintain the nanoparticle properties after radioactive decay. The *in vitro* results showed a good $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanoparticle affinity to cells that highly express the PSMA protein. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated the potential of these $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs to generate ablative radiation doses to HepG2 liver cancer cells. The results obtained from this research support further preclinical studies designed to evaluate the therapeutic efficacy of the $^{166}\text{Dy}_2\text{O}_3/^{166}\text{Ho}_2\text{O}_3$ -iPSMA nanosystem for targeted radiotherapy of liver tumors overexpressing PSMA.

Ethical Compliance

Research experiments conducted in this article with animals were approved by the Ethical Committee and responsible authorities of our research organizations following all guidelines, regulations, legal, and ethical standards as required for animals.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

J. Nanosci. Nanotechnol. 21, 1–10, 2021

Acknowledgments: This research was supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACyT) grant CB2017-2018-A1-S-36841. This study was conducted as a component of the activities of the “Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos, CONACyT” (LANIDER).

References and Notes

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), pp.394–424.
- Zori, A.G., Ismael, M.N., Limaye, A.R., Firpi, R., Morelli, G., Soldevila-Pico, C., Suman, A., Vogel, J.D., Lazarowicz, M., Geller, B.S., Toskich, B., Gonzalo, D.H., Johnson, M.W. and Cabrera, R., 2020. Locoregional therapy protocols with and without radioembolization for hepatocellular carcinoma as bridge to liver transplantation. *American Journal of Clinical Oncology*, 43(5), pp.325–333.
- Bouvry, C., Palard, X., Edeline, J., Ardisson, V., Loyer, P., Garin, E. and Lepareur, N., 2018. Transarterial radioembolization (TARE) agents beyond ^{90}Y -microspheres. *BioMed Research International*, 1435302(4), pp.1–14.
- Kunnen, B., Dietze, M.M.A., Braat, A.J.A.T., Lam, M.G.E.H., Viergever, M.A. and de Jong, H.W.A.M., 2020. Feasibility of imaging ^{90}Y microspheres at diagnostic activity levels for hepatic radioembolization treatment planning. *Medical Physics*, 47(3), pp.1105–1114.
- Tolkach, Y., Goltz, D., Kremer, A., Ahmadzadehfard, H., Bergheim, D., Essler, M., Lam, M., de Keizer, B., Fischer, H.-P. and Kristiansen, G., 2019. Prostate-specific membrane antigen expression in hepatocellular carcinoma: Potential use for prognosis and diagnostic imaging. *Oncotarget*, 10(41), pp.4149–4160.
- Ancira-Cortez, A., Ferro-Flores, G., Jiménez-Mancilla, N., Morales-Avila, E., Trujillo-Benítez, D., Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Escudero-Castellanos, A. and Luna-Gutiérrez, M., 2020. Synthesis, chemical and biochemical characterization of Lu_2O_3 -iPSMA nanoparticles activated by neutron irradiation. *Materials Science and Engineering C*, 111335(117), pp.1–11.
- Trujillo-Benítez, D., Ferro-Flores, G., Morales-Avila, E., Jiménez-Mancilla, N., Ancira-Cortez, A., Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Escudero-Castellanos, A., Luna-Gutiérrez, M. and Azorín-Vega, E., 2020. Synthesis and biochemical evaluation of samarium-153 oxide nanoparticles functionalized with iPSMA-Bombesin heterodimeric peptide. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 16(5), pp.689–701.
- Ferro-Flores, G., Hernández-Oviedo, O., Arteaga de Murphy, C., Tendilla, J.I., Monroy-Guzmán, F., Pedraza-López, M. and Aldama-Alvarado, K., 2004. [^{166}Dy] ^{166}Ho hydroxide macroaggregates: An *in vivo* generator system for radiation synovectomy. *Applied Radiation and Isotopes*, 61(6), pp.1227–1233.
- Hernández-Jiménez, T., Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B., Morales-Avila, E., Escudero-Castellanos, A., Azorín-Vega, E., Santos-Cuevas, C., Luna-Gutiérrez, M., Jiménez-Mancilla, N., Medina, L.A., Ramírez, F. de M. and Pedraza-López, M., 2018. ^{177}Lu -DOTA-HYNIC-Lys(Nal)-Urea-Glu: Synthesis and assessment of the ability to target the prostate-specific membrane antigen. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 318(3), pp.2059–2066.
- Huang, L.-Y., Yu, Y.-S., Lu, X., Ding, H.-M. and Ma, Y.-Q., 2019. Designing a nanoparticle-containing polymeric substrate for detecting cancer cells by computer simulations. *Nanoscale*, 11(5), pp.2170–2178.
- Vilchis-Juárez, A., Ferro-Flores, G., Santos-Cuevas, C., Morales-Avila, E., Ocampo-García, B., Díaz-Nieto, L., Luna-Gutiérrez, M.,

9

- Jiménez-Mancilla, N., Pedraza-López, M. and Gómez-Oliván, L., **2014**. Molecular targeting radiotherapy with cyclo-RGDFK(C) peptides conjugated to ^{177}Lu -labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *10*(3), pp.393–404.
12. Ferro-Flores, G., Ocampo-García, B.E., Santos-Cuevas, C.L., Morales-Avila, E. and Azorín-Vega, E., **2014**. Multifunctional radio-labeled nanoparticles for targeted therapy. *Current Medicinal Chemistry*, *21*(1), pp.124–138.
13. Bartucci, R., Paramanandana, A., Boersma, Y.L., Olinga, P. and Salvati, A., **2020**. Comparative study of nanoparticle uptake and impact in murine lung, liver, and kidney tissue slices. *Nanotoxicology*, *14*(6), pp.847–865.
14. Pedraza-López, M., Ferro-Flores, G., Arteaga de Murphy, C., Morales-Ramírez, P., Piedras-Ross, J., Murphy-Stack, E. and Hernández-Oviedo, O., **2004**. Cytotoxic and genotoxic effect of the $^{166}\text{Dy}/^{166}\text{Ho}$ -EDTMP in vivo generator system in mice. *Nuclear Medicine and Biology*, *31*(8), pp.1079–1085.
15. Ferro-Flores, G., Arteaga de Murphy, C., Pedraza-López, M., Monroy-Guzmán, F., Meléndez-Alafort, L., Tendilla, J.I. and Jiménez-Varela, R., **2003**. Labeling of biotin with $^{166}\text{Dy}/^{166}\text{Ho}$ as a stable in vivo generator system. *International Journal of Pharmaceutics*, *255*(1–2), pp.129–138.

Received: 14 February 2021. Accepted: 26 February 2021.

11.3. Presentación en congreso

International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals (ISTR-2019).

FERRO-FLORES, Guillermina, **ANCIRA-CORTEZ, Alejandra**, JIMÉNEZ-MANCILLA, Nallely, LUNA-GUTIERREZ, Myrna, MORALES-AVILA, Enrique, OCAMPO-GARCIA, Blanca. Presentación oral. *Synthesis and neutron activation of Lu₂O₃ nanoparticles functionalized with target specific peptides.*

Synthesis and neutron activation of Lu₂O₃ nanoparticles functionalized with target specific peptides

Content

Background

The preparation of ¹⁷⁷Lu-peptides for targeted radionuclide therapy requires the use of lutetium-177 from medium to high specific activity (from 400 to 3000 GBq/mg), which cannot be obtained in low flux research nuclear reactors [1,2]. However, the synthesis of ¹⁷⁶Lu in the form of injectable nanoparticles functionalized with target-specific peptides, would allow to irradiate in the TRIGA (Training, Research, Isotopes, General Atomics) Mark III reactor a mass of lutetium enough to obtain radiopharmaceuticals with activities suitable for direct medical use.

Objective

To synthesize and characterize, Lu₂O₃ nanoparticles functionalized with the RGD peptide, as well as to study the effect on their structural properties after neutron irradiation in the Triga Mark III reactor.

Methodology

Lu₂O₃ tablets were prepared and immersed in an injectable solution containing the DOTA-RGD peptide. The sample was irradiated in a Nd:YAG laser equipment (Q-Smart-100, quantel laser)(50 mJ) with a repetition rate of 10 Hz (irradiance of 16 Watts/cm²), producing instantaneously a turbid solution containing the lanthanide oxide nanoparticles with the peptide (Lu₂O₃-NPs-peptide) attached on their surface. The solution was purified and concentrated by ultracentrifugation and filtered through a 0.22 μm membrane (Millipore). The nanosystem was analyzed by TEM, DLS, UV-Vis and IR techniques. The Lu₂O₃-NPs-peptide solution (1 mg/mL), contained in a sealed vial of pharmaceutical grade plastic, was irradiated in the Triga Mark III reactor (3x10¹³ n.cm⁻².s⁻¹) for 20 h. After decay, the sample was reanalyzed by TEM, DLS, UV-Vis and IR techniques.

Results and discussion

TEM, DLS, UV-Vis and IR analyses of the Lu₂O₃-NPs-peptide sample, showed that the method of synthesis by laser irradiation (thermo-reduction) is suitable for the preparation of nanosystems based on lutetium oxide functionalized with target-specific peptides (size from 2 to 100 nm), which were not significantly affected when subjected to neutron irradiation in the Triga Mark III reactor. The irradiation of the Lu₂O₃-NPs-peptide (sterile solution) for 20 h, yielded 9.2 GBq useful for direct clinical use. The Lu₂O₃-NPs-RGD system could potentially be applied in targeted radiotherapy of intrahepatic carcinomas. In order to produce significant amounts of Lu₂O₃-NPs, other methods of synthesis can be applied, such as for example the thermo-reduction by calcination.

Conclusions

Laser irradiation is suitable for the synthesis of lutetium oxide nanoparticles functionalized with target-specific peptides, which are not significantly affected after neutron irradiation. The Lu₂O₃-NPs-RGD nanosystem is potentially useful for targeted radiotherapy purposes.

Acknowledgment

This study was supported by the Mexican National Council of Science and Technology ("Laboratorios Nacionales" and CONACyT-SEP-CB-2018, A1-S-36841).

Primary author(s) : Dr FERRO-FLORES, Guillermina (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES); Ms ANCIRA-CORTÉS, Alejandra (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Universidad Autónoma del Estado de México); Dr JIMÉNEZ-MANCILLA, Nallely (CONACyT. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares); Dr LUNA-GUTIÉRREZ, Myrna (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES); Dr MORALES-AVILA, Enrique (Universidad Autónoma del Estado de México); Dr OCAMPO-GARCÍA, Blanca (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES)

Presenter(s) : Dr FERRO-FLORES, Guillermina (INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES)

Track Classification : R&D - Research and development related to the production of medical

radioisotopes and radiopharmaceuticals

Contribution Type : Oral

Submitted by Dr OCAMPO-GARCÍA, Blanca on Friday 25 January 2019



Atoms for Peace and Development

الوكالة الدولية للطاقة الذرية
国际原子能机构
International Atomic Energy Agency
Agence internationale de l'énergie atomique
Международное агентство по атомной энергии
Organismo Internacional de Energía Atómica

Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Vienna, Austria
Phone: (+43 1) 2600 • Fax: (+43 1) 26007
Email: Official.Mail@iaea.org • Internet: <https://www.iaea.org>

In reply please refer to **CN-276**
Dial directly to extension: (+43 1) 2600-21321

1 November 2019

TO WHOM IT MAY CONCERN

This is to certify that Ms Guillermina Ferro-Flores from Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Mexico, attended the **International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals, ISTR 2019**, which took place at the IAEA's Headquarters in Vienna, Austria, from **28 October to 1 November 2019**.



Julie Zellinger
Conference Services Section
Division of Conference and Document Services