



Universidad Autónoma del Estado de México



FACULTAD DE QUÍMICA

Síntesis, funcionalización y caracterización bioquímica
de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs como un nanosistema
teranóstico para cáncer hepatocelular.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

Q.F.B. DIANA SARAHÍ TRUJILLO BENÍTEZ

Dirigido por:

Dra. Guillermina Ferro Flores (ININ)

Dr. Enrique Morales Avila (UAEMéx)

Dr. Raúl Alberto Morales Luckie (UAEMéx-CCIQS)

Toluca Estado de México, octubre de 2020



ININ

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (LANIDER-CONACyT) de la Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares bajo la dirección académica de la Dra. en C. Guillermina Ferro Flores (proyecto **A1-S-36841**).

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
ABREVIATURAS	7
1 RESUMEN	9
2 ABSTRACT	10
3 INTRODUCCIÓN	11
4 OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5 JUSTIFICACIÓN	16
6 HIPÓTESIS	18
7 ANTECEDENTES	20
7.1 Carcinoma Hepatocelular	21
7.2 Tratamientos para el carcinoma Hepatocelular	24
7.3 Sobreexpresión molecular de PSMA y GRPr en Células del CHC.....	26
7.4 Uso de la nanotecnología y medicina nuclear en el tratamiento del Cáncer	32
7.5 Nanopartículas de Sm ₂ O ₃	35
7.6 Isótopo ¹⁵³ Sm.....	38
7.7 Funcionalización de nanopartículas de Sm ₂ O ₃	40
8 DISEÑO METODOLÓGICO	41
8.1 Síntesis nanopartículas de Sm ₂ O ₃	42
8.2 Preparación de Sm ₂ O ₃ -iPSMA-BN NPs.....	43
8.3 Preparación de ¹⁵³ Sm ₂ O ₃ - iPSMA-BN NPs.....	43
8.4 Caracterización química	43
8.5 Caracterización Biológica.....	44
8.5.1 Análisis <i>in vitro</i> :	44
8.5.2 Análisis <i>in vivo</i>	46
9 RESULTADOS	48
9.1 Artículo publicado	49
10 CONCLUSIONES	63
11 PERSPECTIVAS	66
12 REFERENCIAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura molecular de Sorafenib	25
Figura 2: (a) estructura molecular de PSMA; (b) sitio activo y de inhibición de PSMA; (c) iPSMA; (d) DOTA-HYNIC-iPSMA. Tomada y modificada de (84).	29
Figura 3: a) secuencia de aminoácidos del péptido GRP; b) secuencia de aminoácidos del péptido BN y c) GRPr.	30
Figura 4: Estructura de DOTA-iPSMA-Lys ³ -BN.....	31
Figura 5: EPR pasivo y EPR activo.	33
Figura 6: Interacción de los sistemas de nanopartículas funcionalizadas con moléculas de reconocimiento específico y marcadas con un radionúclido que puede tener decaimiento α , β , e^- y γ con daño y penetrabilidad diferente en el tejido biológico.	35
Figura 7: Representación de diagramas de Dieke para algunos lantánidos donde se muestra los cambios de niveles de mayor energía a niveles de menor energía que generan los espectros de luminiscencia. Tomada y modificada de (105).	37
Figura 8: Características físicas y radiativas de ¹⁵³ Sm.....	39
Figura 9: Esquema de ¹⁵³ Sm ₂ O ₃ -iPSMA-BN NPs.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de Child-Pugh, evalúa el estado de la función del hígado y la afectación sistémica en la cirrosis hepática (42).....	22
Tabla 2: Clasificación ECOG, presentando en grados PS (Por sus siglas en inglés performance status) de 0 a 5 en función al estado clínico del Paciente.	23
Tabla 3: Clasificación del CHC con base en el BCLC (42)	23
Tabla 4: Comparación entre ^{153}Sm , ^{90}Y y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ *DMP (Difosfato de metileno por sus siglas en inglés).....	39

ABREVIATURAS

AuNPs: Nanopartículas de Oro

BCLC: *Barcelona Clinic Liver Cancer*

BN: Bombesina

c[RGDFK(C)]: Ciclo Arg-Gly-Asp-Phe-Lys-Cys

CHC: Carcinoma Hepatocelular

CLIP: Cancer of liver Italian Program

CPa: Cáncer de próstata

CUPI: *Chinese University Prognostic Index*

DLS: (*ing*) Dispersión de luz dinámica

DOTA: 1,4,6,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico

ECM: (*ing*) Matriz Extracelular Provisional

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

EPR: (*ing*) efecto pasivo de permeabilidad y retención aumentada

FDA: *U.S. Food and Drug Administration*

FT-IR: (*ing*) Espectroscopía de Infrarrojo

GRP: (*ing*) Péptido Liberador de Gastrina

HPMR: (*ing*) reacción de plasma de hidrógeno-metal

HYNIC: hidrazinonicotinamida

iPSMA-BN: DOTA-iPSMA(inhibidor)Lys3-Bombesina

JIS: *Japan Integrated Staging*

Ln: lantánidos

MACK: Proteína Quinasa Activadora de Mitógeno

NPs: Nanopartículas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCa: Cáncer de próstata

PET: (*ing*) tomografía por emisión de positrones

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

PKC: Proteína C quinasa

PSA: Antígeno Prostático Específico

PSMA: Antígeno Prostático Específico de Membrana

PVA: alcohol polivinílico

PS: *performance status*

RGPr: Receptor del Péptido Liberador de Gastrina

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SAS: (*ing*) precipitación supercrítica por antisolvente

SNC: Sistema nervioso Central

SNP: Sistema nervioso Periférico

SPECT: (*ing*) tomografía por emisión de fotón único

TACE: Quimio-embolización transarterial

TEM: Microscopia Electrónica de Transmisión

TGA: (*ing*) Análisis Termogravimétrico

TNM: *Tumor, node, metastasis*

UV-Vis: Espectroscopia en el rango del Ultravioleta-Visible

XRD: Difracción de Rayos X

XTT: (2,3-bis- [2-methoxy-4-nitro-5- sulfofenil]-2H-tetrazol-5-carboxilánilinda)

1 RESUMEN

El carcinoma hepatocelular (CHC) presenta limitadas alternativas de tratamiento a causa de la poca sintomatología que la enfermedad exhibe en estadios tempranos, cuando las intervenciones quirúrgicas son posibles. La alta sensibilidad que tiene el hígado a los agentes quimioterapéuticos hace que las alternativas farmacológicas sean pocas, por lo que la tasa de mortalidad del CHC es del 95%, posicionándose en los primeros lugares de muertes por cáncer.

Existen sistemas farmacológicos basados en blancos moleculares de reconocimiento específico que buscan disminuir el daño a los tejidos sanos. Estos sistemas están constituidos por compuestos que interactúan sólo con proteínas que se encuentran sobre expresadas en las células tumorales. Un ejemplo de ello es el péptido inhibidor del antígeno prostático específico de membrana (iPSMA) que interactúa con la proteína PSMA que se encuentra sobre expresada principalmente en el cáncer de próstata, pero también en otros tumores incluido el CHC. Otro ejemplo es el péptido bombesina (BN) que interactúan con la proteína del receptor del péptido liberador de gastrina (GRPr) que igualmente se encuentra sobre expresado en células de diferentes tipos de cáncer entre ellos el CHC.

En este proyecto se realizó la síntesis de nanopartículas de óxido de samario ($^{nat}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs) a través de la metodología de precipitación/calcinación, las Sm_2O_3 NPs presentaron forma cuasi-esféricas con tamaños hidrodinámicos de 83 nm para las calcinadas a 600 °C y de 149.6 nm para las calcinadas a 900 °C; ambos sistemas mostraron estabilidad en medio acuoso con un potencial Z mayor a -20 mV.

Las $^{nat}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs se activaron por irradiación neutrónica y se funcionalizaron con el péptido heterodimérico iPSMA-BN para obtener el nanosistema de radioterapia de blancos moleculares específicos $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN, el cual se evaluó en las líneas celulares HepG2 (PSMA+, RGPr +) y PC3 (PSMA-, RGPr +). El nanosistema mostró mayor internalización, toxicidad y afinidad para las células de Carcinoma Hepatocelular (HepG2). Debido a las propiedades radioluminiscentes observadas en $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN, fue posible obtener imágenes ópticas de su biodistribución en ratones Balb-C, las cuales mostraron una mayor acumulación del nanosistema en el Hígado.

Estos resultados sustentan el posible uso de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs como un nuevo radiofármaco en la terapia dirigida e imagen molecular del CHC.

2 ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) presents limited treatment alternatives due to the few symptoms that the disease exhibits in early stages when surgical interventions are possible. 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 (mortality rate of 95%).

There are pharmacological systems based on specific recognition molecular targets that seek to reduce damage to healthy tissues. These systems are made up of compounds that interact specifically with proteins that are over-expressed in tumor cells. For example, the protein-specific membrane antigen inhibitor (iPSMA) peptide, which interacts with the PSMA protein overexpressed mainly in prostate cancer, but also in other tumors including HCC. Another example is the peptide bombesin (BN), which interact with the GRPr protein that is also over-expressed in cells of different types of cancer including the CHC.

In this project, the synthesis of samarium oxide nanoparticles ($^{nat}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs) was carried out through the precipitation/calcination methodology, Sm_2O_3 NPs presented quasi-spherical shape with hydrodynamic sizes of 83 nm for calcined at 600 ° C and of 149.6 nm for calcined at 900 ° C; both systems showed stability in an aqueous solution with a Z potential greater than -20 mV.

$^{nat}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs were activated by neutron irradiation and functionalized with the iPSMA-BN heterodimer to obtain the $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs system, which was evaluated in the HepG2 (PSMA +, RGPr +) and PC3 (PSMA-, RGPr +) cell lines. The nanosystem showed high internalization, toxicity and affinity for HepG2 cells. Due to the radioluminescent properties observed in the $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN nanoparticles, it was possible to obtain optical images of their biodistribution in Balb-C mice, which showed a main accumulation of the nanosystem in the liver

These results support the possible use of $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN nanoparticles as a new radiopharmaceutical system in targeted therapy and molecular imaging of HCC.

3 INTRODUCCIÓN

El CHC en estadio intermedio y avanzado representa una problemática de emergencia por su alta incidencia en mortalidad a nivel mundial, según los datos de la OMS se encuentra en el segundo lugar de mortalidad por cáncer y presenta una tasa de mortalidad del 95% debido a las pocas alternativas de tratamiento consecuencia de la alta sensibilidad que presenta el hígado en respuesta a los agentes quimioterapéuticos (1,2).

Las alternativas de tratamiento para el CHC en los estadios tempranos (Clasificación BCLC) incluyen resección, trasplante y ablación percutánea (3,4) pero cuando la enfermedad se encuentra diseminada se utilizan tratamientos paliativos, uno de los cuales está tomando popularidad es la administración de sorafenib (5).

Otra alternativa terapéutica es la quimo-embolización transarterial (TACE) que consiste en utilizar micropartículas, las cuales son administradas en la arteria hepática, con la intención de generar embolización, necrosis y la muerte de las células de cáncer (3,6). Sin embargo, una de las principales complicaciones es el síndrome post-embolización que ocurre en un 90% de los pacientes (7,8). Otro proceso similar a TACE es la radioembolización que implica el uso de un radionúclido como agente terapéutico (9,10) con la ventaja de una disminución en la frecuencia de aparición del síndrome post-embolización (11).

Las principales complicaciones que se tienen con la radioembolización es que el proceso en si genera nuevas lesiones en el hígado y a pesar de que los estudios reportan una mejor tasa de control de la enfermedad en comparación con TACE las tasas de supervivencia libre de progresión no superan los 9 meses (9,10). El principal radionúclido utilizado es ^{90}Y que se obtiene del generador $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, donde el ^{90}Sr con vida media de 28.8 años, hace la separación del ^{90}Y un proceso costoso (12).

La nanotecnología puede ser aplicada para obtener un profundo impacto en la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer (13–15) debido a un fenómeno de transporte en el tejido conocido como efecto pasivo de permeabilidad y retención aumentada (EPR). Este efecto se favorece por el crecimiento desmesurado y desorganizado de los vasos sanguíneos y proliferación irregular de las células endoteliales, generando un incremento en las fenestraciones que permiten la migración de las nanopartículas, impulsadas por un gradiente de concentración, situación que no es posible en el endotelio del epitelio sano. Si además, estas nanopartículas se conjugan con ligandos de reconocimiento específico obtenemos un proceso EPR activo (16–18).

El desarrollo de nanopartículas de óxidos metálicos especialmente de los metales transición interna como Lu, Dy, Ce, Eu, Sm, entre otros han desencadenado una extensa aplicación en catálisis, electrónica, sensores ópticos, dispositivos de luminiscencia, magnéticos de alto rendimiento y medicina debido a sus ricos estados de valencia, vasta área superficial y variedad de estructuras electrónicas (19–28).

En el caso de nanopartículas de óxido de Samario: Sm_2O_3 , se tienen reportados una amplia variedad de metodologías de síntesis que van desde precipitación hasta bio-reducción (19,21,29–33) y aunque no se tiene reportes de su uso médico, si se tienen aplicaciones médicas del isótopo ^{153}Sm en formación de complejos, para uso en radiofármacos aceptables para estrategias terapéuticas como radiosinovioresis y el tratamiento paliativo en las metástasis óseas (9,34,35).

El ^{153}Sm no se encuentra en forma abundante en la naturaleza, siendo necesaria su activación a partir de Sm_2O_3 enriquecido con ^{152}Sm como resultado de la reacción (n, γ) , en reactores nucleares, además su alto valor de sección transversal (σ) hace que no sean necesarias altas energías. Debido a las características de este radionúclido la investigación sobre su uso en el área médica tanto para tratamiento como diagnóstico de enfermedades ha ido en aumento (12,34,36).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Sintetizar por precipitación-calcinación las nanopartículas de Sm_2O_3 , funcionalizarlas con el péptido iPSMA-BN y caracterizarlas fisicoquímicamente, así como estudiar el efecto en sus propiedades estructurales y bioquímicas enfocadas al reconocimiento molecular al activarlas por irradiación neutrónica a ^{153}Sm en el Reactor Triga Mark III para su posible uso en el tratamiento de carcinoma hepatocelular.

4.2 Objetivos específicos

- a) Realizar la síntesis de Sm_2O_3 NPs por precipitación/calcinación
- b) Caracterizar las Sm_2O_3 NPs por TEM, TGA, XRD, UV-Vis, FT-IR, DSL y potencial Z
- c) Funcionalizar las Sm_2O_3 NPs de forma directa incorporando al proceso de síntesis mediante adsorción del péptido iPSMA-BN en la superficie.
- d) Caracterizar el sistema Sm_2O_3 -iPSMA-BN NPs por TEM, DSL, UV-Vis, FT-IR y potencial Z
- e) Activar el nanosistema de Sm_2O_3 NPs con irradiación neutrónica en el reactor Triga Mark III por 20 horas y funcionalizar con péptido iPSMA-BN.
- f) Evaluar el efecto estructural por la irradiación neutrónica en el nanosistema $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs mediante TEM, DSL y Potencial Z
- g) Evaluar la afinidad de los receptores PSMA Y GRPr a los nanosistemas $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs por pruebas de competencias en microplaca en células HepG2 y PC3
- h) Evaluar la internalización de los nanosistemas $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -NPs iPSMA-BN NPs en células HepG2 y PC3.
- i) Evaluar citotoxicidad mediante análisis clonogénico y XTT de los sistemas $^{\text{Nat}}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -NPs, $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN.
- j) Evaluar la biodistribución *in vivo* de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs
- k) Analizar la luminiscencia generada por Sm_2O_3 NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs

5 JUSTIFICACIÓN

El reto en el desarrollo de radiofármacos es encontrar un radionúclido que permita un equilibrio entre la actividad específica, propiedades de emisión, penetración en el tejido, energía emitida, tiempo de vida media, así como una especificidad y penetrabilidad adecuadas en el órgano blanco, para poder tener una interacción controlada en el organismo en donde será administrado y con ello evitar un daño colateral por radiación. Un ejemplo es el uso de micropartículas de ^{90}Y en el tratamiento del CHC que, aunque ha mostrado tener una eficacia significativa, debido a una adecuada energía de emisión y penetración en el tejido, tiene como inconveniente el daño colateral al tejido hepático sano que representa una complicación para su uso como tratamiento de primera línea. Además de que las formulaciones de ^{90}Y tiene un costo elevado debido al alto costo de producción.

Las nanopartículas se acumulan en el ambiente tumoral a causa del efecto EPR pasivo, por lo tanto el uso de nanopartículas formadas por radionúclido aumentaría la actividad específica en el tumor y con ello se incrementaría la dosis de radiación sin representar riesgo para el resto del tejido en el órgano blanco u otros tejidos adyacentes sensibles al efecto de la radiación, si además estas nanopartículas se funcionalizan con moléculas que interactúan de forma selectiva con proteínas sobre expresadas en las células tumorales, se incrementa la especificidad y si además el radionúclido que constituye las nanopartículas puede ser detectado a través de tomografía por emisión de fotón único (SPECT) o tomografía por emisión de positrones (PET) se tiene un sistema que permite obtener un registro espacio-temporal a nivel molecular para el diagnóstico del cáncer o seguimiento de la progresión de la enfermedad.

El presente trabajo se enfoca en la síntesis de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs funcionalizadas con el péptido iPSMA-BN, seguido por la valoración de su comportamiento “*in vitro*” e “*in vivo*” con el fin de un posible uso en tratamiento radiológico dirigido a células tumorales del CHC. Se tiene la ventaja que el ^{153}Sm tiene una vida media de 48 h, con emisiones gamma lo cual puede ser una alternativa para que $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs puedan ser utilizadas como marcador en imagen molecular o en cirugías radioguiadas.

6 HIPÓTESIS

Si se realiza la síntesis de nanopartículas de Sm_3O_2 activadas por irradiación neutronica (^{153}Sm) y se les unen varias moléculas del péptido iPSMA-BN, entonces se produce un sistema heterobifuncional capaz de incrementar las uniones multivalentes del $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs a sus receptores específicos de GRPr y PSMA, aumentando con ello la dosis de radiación en las células tumorales del carcinoma hepatocelular, generando daño irreparable en las células de cáncer, además de la obtención de imágenes moleculares de las zonas de interacción.

7 ANTECEDENTES

7.1 Carcinoma Hepatocelular

El cáncer es una de las enfermedades que actualmente está generando un problema considerable en la mortalidad y morbilidad a nivel mundial, de acuerdo con los datos estadísticos de la OMS en 2018 se tuvo un estimado de 18.1 millones de nuevos casos y 9.6 millones de muertes por cáncer (2).

El cáncer ha sido definido como un proceso multifactorial desarrollado en múltiples eventos fisiológicos, con alteraciones en los mecanismos de regulación de replicación genética, del crecimiento, división o desarrollo celular, con eventual migración a otros tejidos desarrollando proliferaciones maligna o metástasis. A medida que se forma una masa de tumor, el tejido sano circundante no puede competir con esas células por un suministro adecuado de nutrientes, lo que lleva a la apoptosis y necrosis de las células sanas seguida de la disfunción de los órganos primarios y finalmente la muerte (37).

Un tipo de cáncer que cobra particular interés es el CHC por ser uno de los principales cánceres de hígado, reportado en el 90% de todos los cánceres de este órgano y el tercero con la mortalidad más alta a nivel global, resultado en más de 500,000 muertes anuales, con una tasa de mortalidad del 95%, donde a causa de la limitada disponibilidad de donantes y la poca sintomatología en estadios tempranos e intermedios, genera que solo el 10% de los pacientes reciba terapias curativas (1,2).

La enfermedad inicia con la alteración de hepatocitos maduros por modificaciones genéticas que llevan a procesos de necrosis, inflamación y regeneración, algunas de estas alteraciones desencadenan la resistencia a apoptosis y mecanismos de ciclo celular acelerado lo que lleva a la generación de poblaciones monoclonales las cuales finalmente se convierten en nódulos displásicos que evoluciona a CHC; una característica particular de la enfermedad es que puede estar latente por muchos años pasando de estadios tempranos a intermedios sin presentar síntomas, momento en donde los tratamientos curativos son posibles, siendo diagnosticada la mayoría de veces en estadios avanzados donde solo es posible utilizar tratamientos paliativos (38,39).

Los principales factores de riesgo para el desarrollo de CHC son las infecciones crónicas por virus de Hepatitis B (VHB), el virus de hepatitis C (VHC), seguidos por cirrosis, la exposición a Aflatoxina B, el consumo de alcohol y otras enfermedades metabólicas. Se tienen reportes que colocan a la infección de VHB como la principal causa pero se ha observado que la incidencia de los factores de

riesgo varía en función a la zona geográfica, aun con estas variaciones las infecciones por virus de hepatitis son las que encabezan los factores de riesgo (40).

La mayoría de los criterios de clasificación de CHC publicados comprenden sistemas de puntuación basados en el análisis de las relaciones entre los parámetros clínicos, radiológicos o patológicos y de supervivencia. Hay 7 Esquemas de clasificación para el CHC: Okuda, TNM (Tumor, node, metastasis), CLIP (Cancer of liver Italian Program), BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer), Francesa, CUPI (Chinese University Prognostic Index) y JIS (Japan Integrated Staging) (3,4).

Sin embargo, en la actualidad, el único algoritmo que estratifica a los pacientes según el resultado y vincula simultáneamente la clasificación de la enfermedad con la indicación de tratamiento es el sistema de estadificación BCLC y es el mayormente utilizado (4,41).

El sistema de clasificación BCLC utiliza 3 variables para clasificar el grado de la enfermedad; como primer variable toma en cuenta las características del tumor, donde se valora el número de nódulos y su tamaño, también contempla si se presenta diseminación extrahepática e invasión vascular (metástasis); como segunda variable cuantifica la función hepática con la clasificación Child-pugh (tabla 1) y finalmente valora el estado general de salud de los pacientes tomando como referencia el desempeño del ECOG (por sus siglas en ingles *Eastern Cooperative Oncology Group*) (Tabla2) (4,42).

Tabla 1: Clasificación de Child-Pugh, evalúa el estado de la función del hígado y la afectación sistémica en la cirrosis hepática. (42)			
Puntaje			
Puntos	1	2	3
Albumina	>53g/L	28-35g/L	<28g/L
Bilirrubina	<2mg/dL	2-3mg/dL	>3mg/dL
Protrombina INR	<1.7	1.7-2.3	>2.3
Ascitis	Ausente	Temprana	Moderada o severo
Encefalopatía hepática	Ausente	Temprana (grado I-II) con respuesta a medicación	Avanzada (grado III-IV) refractaria a tratamiento
Clasificación			
Child-Pugh	A	B	C
Total, de puntos	5-6	7-9	10-15

Tabla 2: Clasificación ECOG, presentando en grados PS (Por sus siglas en ingles *performance status*) de 0 a 5 en función al estado clínico del Paciente.

Grado PS	Descripción
0	Asintomático, funcional e independiente
1	Sintomático, restringido en actividad extenuante, pero ambulatorio y con capacidad laboral
2	En cama o silla <50%
3	En cama >50%
4	Postrado al 100%
5	Muerto

A partir de estas variables, el sistema BCLC divide en 5 grupos los estados del CHC que van de 0 hasta D (tabla 3) (4,42,43).

Tabla 3: Clasificación del CHC con base en el BCLC (42)

Clasificación Parámetros	0	A	B	C	D
Estadio	Muy temprano	Temprano	Intermedio	Avanzado	Terminal
Child pugh	A	A-B	A-B	A-B	C
PS	0	0	0	1-2	3-4
Número y tamaño de nódulos	Único ≤ 3 cm <2cm	Único o hasta 3 de <3cm	Múltiples >3cm sin invasión vascular o metástasis extrahepático	Invasión portal y extrahepática	gran carga tumoral Metástasis
Tratamiento	Trasplante Ablación Resección	Trasplante Ablación Resección	TACE	Sorafenib	Paliativo y sintomático
sintomatología	no	No	No relacionados con cáncer	Leves Relacionaos con cáncer	Severos relacionados con cáncer
Supervivencia esperada	Curación	el 50%-75% de 5 años	49,6% de 1 año	mediana de aproximadamente 11 meses.	Menor a 3 meses

7.2 Tratamientos para el carcinoma Hepatocelular

En el caso de TACE, tratamiento de carácter paliativo utilizado en estadios B y C, corresponde a dos formas: TACE convencional (cTACE) que implica la inyección intraarterial de un fármaco quimioterapéutico, como doxorrubicina, mitomicina C o cisplatino, que se emulsiona con Lipiodol y TACE con perlas liberadoras de fármacos que consiste en utilizar micropartículas (100-500 mm); Bead® y HepaSphere® (44).

Este tratamiento tiene como objetivo generar necrosis tumoral basado en el hecho de que el CHC tiene predominante vascularización arterial en comparación con el tejido hepático normal, como consecuencia al administrar las micropartículas mediante catéter en la arteria hepática ocasiona que las partículas bloqueen la circulación sanguínea hacia los tumores y depositan el agente quimioterapéutico en el sitio de acumulación, ocasionando un efecto citotóxico combinado con isquemia del tejido tumoral y por consecuencia la muerte de las células cancerosas (3,6,10,45).

Dentro de las principales complicaciones de TACE se encuentran descompensación edemo-ascítica, colecistitis y pancreatitis agudas pero la más importante es el síndrome de post-embolización, el cual ocurre en aproximadamente el 90% de los pacientes. El síndrome es manifestado por fiebre, malestar general, dolor en el cuadrante superior derecho, náuseas y vómitos; asimismo el síndrome de post-embolización grave o prolongado se pueden correlacionar con embolización de la vesícula biliar y dosis más altas de los agentes quimioembólicos (7,8).

Otra forma de tratamiento utilizada similar a TACE, pero con el uso de un radionúclido como agente terapéutico, es la radio-embolización, en donde se emplean principalmente los radionúclidos ⁹⁰Y y ¹³¹I. La ventaja principal es que el síndrome post-embolización está reportado ocurrir 3 veces menos que con TACE, además una mejor tasa de control de la enfermedad con alrededor de un 80%, sin embargo no pueden expandir el tratamiento a más de 9 meses porque se termina dañando tejido hepático sano (9,10).

TheraSphere® está aprobado por la FDA para el tratamiento del CHC no reseccable y consiste en microesferas de vidrio cargadas con ⁹⁰Y. Asimismo, está aprobado para el tratamiento de la neoplasia hepática en países como Canadá, India, Rusia, algunos países europeos y en varios centros de investigación en los Estados Unidos. (11).

Las principales complicaciones que se tienen con la radio-embolización es que casi siempre el mismo proceso genera nuevas lesiones que crecen dentro o fuera del hígado. La actividad administrada de ^{131}I debe limitarse a causa de la contribución de la emisión gamma (364 keV) que produce toxicidad hematopoyética, razón que ha llevado a sustituirlo por el uso de ^{90}Y debido a su única emisión beta con una energía elevada (0.97 MeV), vida media corta (2,67 días) y escasa penetración en el tejido (media 2.5 mm; máximo 11 mm) haciendo que la mayor parte de la radiación emitida actúe directamente contra el tejido tumoral (10). Sin embargo, una de las desventajas que presenta el uso de ^{90}Y es su elaboración que resulta del generador $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$. ^{90}Sr ($t_{1/2} = 28.8$ años) es producido a partir de la fisión de ^{235}U y decae a ^{90}Y mediante emisión β^- (100%) y a causa de su tiempo de vida media muy largo, la purificación de ^{90}Y es un proceso muy costoso (12).

La quimioterapia convencional con finalidad citotóxica (habitualmente doxorrubicina y oxaliplatino) nunca ha demostrado un beneficio significativo en la supervivencia en el CHC. Tratamientos como tamoxifeno, megestrol, octreotride y derivados antiandrogénicos tampoco han demostrado eficacia (43,46). Hasta ahora, el Sorafenib es único agente que ha mostrado ser útil en el tratamiento del CHC en términos de supervivencia en estudios fase 3 controlados con placebo. Esta molécula es un inhibidor multikinasa de bajo peso molecular (Figura 1) y gran biodisponibilidad por vía oral (47,48).

Las células del CHC tienen como característica distintiva que son altamente angiogénicas. La angiogénesis como parte de los procesos que conllevan al desarrollo intermedio o avanzado del cáncer se distingue por la sobreproducción de vasos sanguíneos “*de novo*” para responder a las altas demandas de nutrientes y oxígeno a través de la migración dirigida y la proliferación de las células endoteliales, con la formación de una matriz extracelular provisional (ECM) constituida por proteínas plasmáticas que funciona como limitadores de la formación del nuevo vaso y la organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para madurar en vasos sanguíneos estables (49–52).

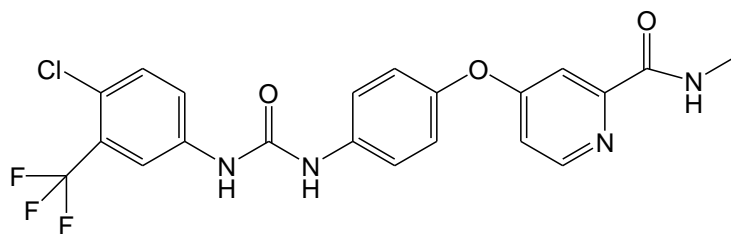


Figura 1: Estructura molecular de Sorafenib

En términos de regulación, el proceso de angiogénesis es mediado por una gran cantidad de factores moduladores entre los más importantes tenemos el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), junto con sus receptores VEGFR, la angiopoyetina-1 (ANG-1), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), sensores sensibles a la concentración de oxígeno como el prolil-hidroxilasa-2 (PHD-2) y los factores generados por inducción de hipoxia como el factor inducible por hipoxia 1 y 2 (HIF-1 y HIF-2) (49–51,53–55).

El sorafenib actúa bloqueando diferentes vías de señalización asociadas con la hepatocarcinogénesis, en especial, la vía MAPK a través de la inhibición de Raf cinasa, vía que regula la expresión génica para la síntesis y activación de proteínas que interviene en la división, crecimiento, apoptosis y proliferación celular (43,46,56); también bloquea el VEGFR 1 y 2 inhibiendo el desarrollo de procesos angiogénicos (41,47,54,56). Sin embargo, ha mostrado tener distintas tasas de respuestas debido a que existe una alta variabilidad polimórfica en los pacientes como consecuencia de los amplios factores moleculares que se ven alterados en el desarrollo del cáncer, situación que determina el comportamiento de la enfermedad en respuesta al tratamiento (57,58).

7.3 Sobreexpresión molecular de PSMA y GRPr en Células del CHC

Durante décadas las estrategias terapéuticas actuales para la mayoría de los cánceres implican una combinación de resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia. A pesar de su éxito, una morbilidad y mortalidad significativas que siempre se asocian con estas terapias son los efectos colaterales como el daño a las células normales, el desarrollo de resistencias, los polimorfismos genéticos y la heterogeneidad tumoral en distintas etapas del avance de la enfermedad (59–62). Situación que hace obligado el desarrollo continuo de investigaciones para generar alternativas que disminuyan las desventajas (13,63).

La cuestión clave es lograr la deseada concentración de agente terapéutico en sitios tumorales, destruyendo células cancerosas mientras se minimiza el daño a las células normales. Donde el eje central es identificar las diferencias que se generan entre una célula sana y una célula tumoral, se han

encontrado gran variedad de diferencias desde expresión o supresión génica, así como la sobreexpresión o depresión de proteínas correlacionadas con distintas funciones tanto metabólicas, estructurales como de señalización. Con esta visión, la terapia tumoral dirigida se ha convertido en una de las alternativas más prometedoras (64), basada en la generación de sistemas que solo interactúan con las células tumorales ha desarrollado toda una ciencia en el tratamiento y diagnóstico con base en blancos moleculares (65,66).

Existen hasta la fecha más de 500 genes alterados en las células tumorales, que a su vez generan cambios en la expresión de proteínas (67), aquí solo nos centraremos en los receptores PSMA y GRPr en las células de CHC.

El receptor PSMA es proteasa glutamato carboxipeptidasa tipo II transmembranal dependiente de Zn^{2+} constituida por 750 aminoácidos en forma de un homodimero donde cada monómero cuenta con tres dominios estructurales, dominio proteasa, dominio apical y dominio helicoidal (figura 2a), se conoce que se encuentra expresada de forma fisiológica en tejidos como próstata, riñón, intestino delgado, SNC y SNP pero fue identificada primeramente en el Cáncer de próstata (CPa) (63,68–71), encontrado su sobreexpresión en el 95% de los cánceres de próstata avanzados y aunque aún no se ha elucidado por completo los mecanismos que generan dicha sobreexpresión ni el papel que juega en el desarrollo y comportamiento tumoral, en la mayoría de los casos está relacionada con un pronóstico negativo. Actualmente se siguen desarrollando análisis para la identificación de las vías de señalización conectadas con PSMA, se sabe que una vez que el ligando interacciona con él sufre internalización mediado por clatrina (72). También se ha encontrado evidencia que PSMA expresado en el endotelio participa en la regulación de angiogénesis y que puede promover la supervivencia celular al redirigir la señalización de MAPK a las vías PI3K. PI3K es una proteína correlacionada con la supervivencia celular (73).

La estructura del dominio proteasa de PSMA está constituido por 2 átomos de zinc y por 2 cavidades, la cavidad S1 altamente flexible llamado "tapa de entrada" que conecta el sitio activo con la superficie externa de PSMA con característica hidrofóbica y S1' denominado "sensor de glutamato" que contiene los residuos de 692-704 junto a Lys 699 y Tyr 700 involucrados en la unión específica del sustrato (Figura 2b). El análisis de los componentes de afinidad con el sitio activo han llevado al desarrollo de compuestos con propiedad inhibidora que tienen estructuras similares a los sustratos

naturales de PSMA (63). Estos compuestos son por lo general secuencias peptídicas de unos pocos aminoácidos y se clasifican en 3 familias: a base de fosforo, a base de tiol y a base de urea, los compuestos a base de fosforo presentan una alta afinidad pero debido a su alta polaridad tienen una farmacocinética pobre, los agentes a base tiol presentan una mayor permeabilidad de membrana pero son metabólicamente inestables por lo tanto el desarrollo de los ligandos a base de urea son los que han tomado más popularidad ya que presentan ventajas como su facilidad de síntesis así como la posibilidad de una posterior modificación y conjugación que ayuden a mejorar sus propiedades farmacocinéticas (72).

Los inhibidores a base de urea se constituyen por la secuencia Glu-urea-Lys (iPSMA) (Figura 2c) donde la fracción de glutamato-urea se une a S1' mediante el sensor de glutamato y la lisina se usa para la interacción con el ambiente no polar de S1. PSMA se ha convertido en un blanco molecular que ha generado el desarrollo de radiofármacos compuestos por una parte activa (iPSMA), por una parte espaciadora que consiste en moléculas de carácter hidrofóbico para la interacción con S1 y por una parte que permita la unión del radionúclido, en este caso las moléculas denominadas BFCA (agentes quelantes bifuncionales) son las que permiten coordinar el átomo radiactivo (como ^{68}Ga , ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{131}I , ^{119}In y ^{177}Lu) mientras se unen químicamente con el resto de la molécula (74). Un ejemplo de ello es el péptido DOTA-HYNIC-iPSMA (figura 2d) que cuenta con su parte iPSMA unido a la 1-Naftil-alanina (Nal) compuesto de carácter hidrofóbico que permite mejor interacción con S1, por su lado Nal se encuentra unido al compuesto de hidrazinonicotinamida (HYNIC) que funciona como enlazador entre el IPSMA-Nal y el grupo DOTA (1,4,6,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico). DOTA es el BFCA que permite la quelación de radionúclidos como ^{177}Lu o ^{68}Ga (70,75).

Además de CPa, PSMA se ha encontrado sobre expresado en la neovasculatura de varios tumores sólidos (76,77). En el caso del CHC Arun Sasikumar et. al., reporta la identificación de lesiones en hígado que con un análisis histopatológico se identificó como CHC usando el sistema ^{68}Ga -PSMA PET/CT en un paciente con CPa (78), también se tiene reportado un estudio piloto para el uso del sistema ^{68}Ga -PSMA PET-TC como agente de diagnóstico del CHC y lo comparan con el sistema ^{18}F -FDG (^{18}F -fluorodesoxiglucosa). Donde de las 41 lesiones analizadas, 36 presentaron una absorción 3.6 mayor de ^{68}Ga -PSMA que la absorción hepática de fondo y 28 mostraron una captación significativamente mayor de ^{68}Ga -PSMA que de ^{18}F -FDG. Al momento de realizar un análisis

inmunohistoquímico que muestra la presencia de PSMA se encontró un resultado compatible con lo reportado donde indican que casi el 95% del CHC es positivo a la sobre expresión de PSMA en la vasculatura tumoral (79). Por otro lado, Yuri Tolkach et. al., al realizar un análisis inmunohistoquímico de la expresión de PSMA en 168 tumores de 153 pacientes encontraron una expresión canicular del 41.1%, una expresión en la neovasculatura del 89.9 % y solo un 4.1 % resultó negativo (80).

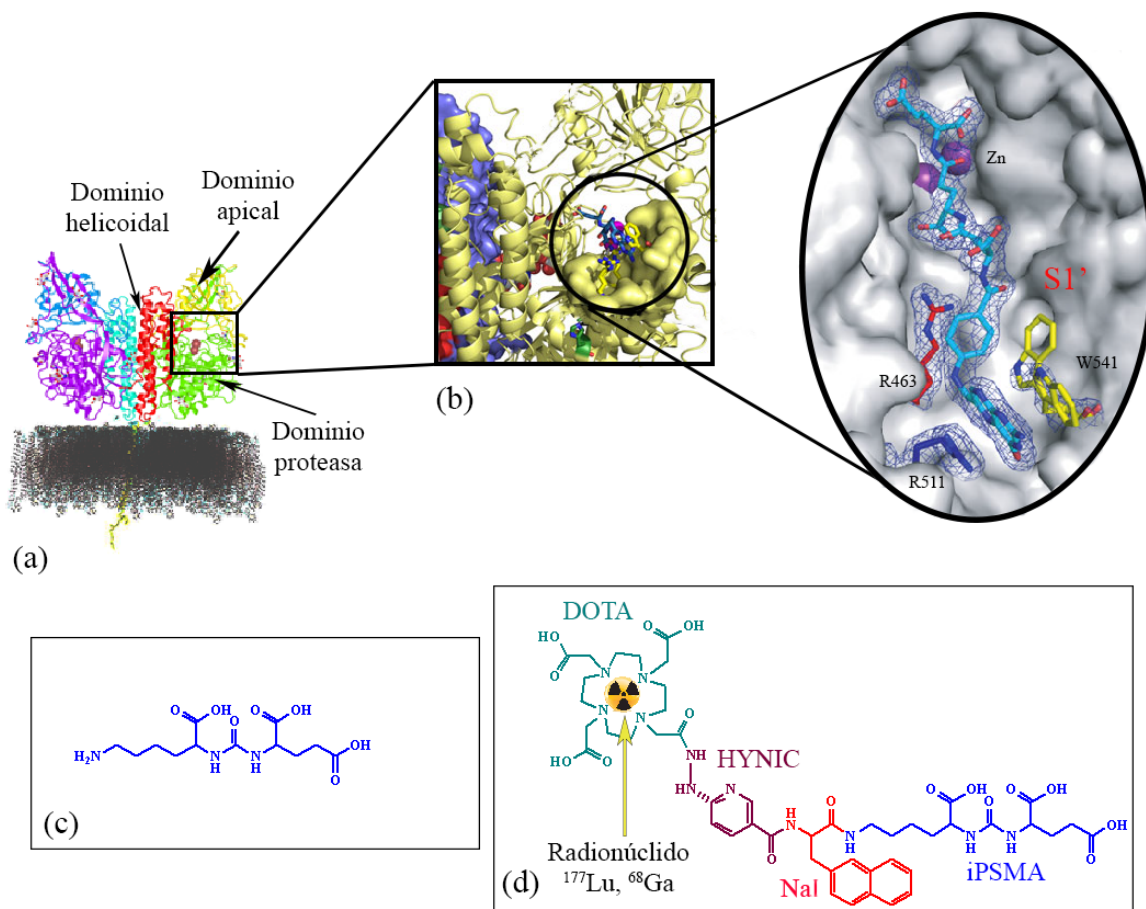


Figura 2: (a) estructura molecular de PSMA; (b) sitio activo y de inhibición de PSMA; (c) iPSMA; (d) DOTA-HYNIC-iPSMA. Tomada y modificada de (81).

El GRPr que se une selectivamente a moléculas como el péptido liberador de gastrina (GRP) es otro receptor que se ha encontrado expresado en distintos tumores como el cáncer de pulmón, próstata, pancreático, mama, renal y colon (82,83), es un receptor que pertenece a la familia de los receptores

acoplados a proteínas G (figura 3a) y se expresa de forma normal en el cerebro donde regula vías de señalización en el control de proliferación, crecimiento y división celular mediadas por MAPK y la PKC (84).

En los últimos años el aumento de GRP en cáncer se ha identificado como un factor de crecimiento que regula el crecimiento tumoral, la progresión, angiogénesis y metástasis. GRP está constituido por una secuencia de 27 aminoácidos (figura 3b) y pertenece a la familia de los péptidos similares a BN, debido a que BN fue el primer péptido descubierto en anfibios que se une a su respectivo receptor. El péptido bombesina tiene mucha similitud con el GRP (figura 3c) por lo cual tanto BN o péptidos similares a BN están siendo utilizados como agentes teranósticos para el cáncer por su interacción con el GRPr (85).

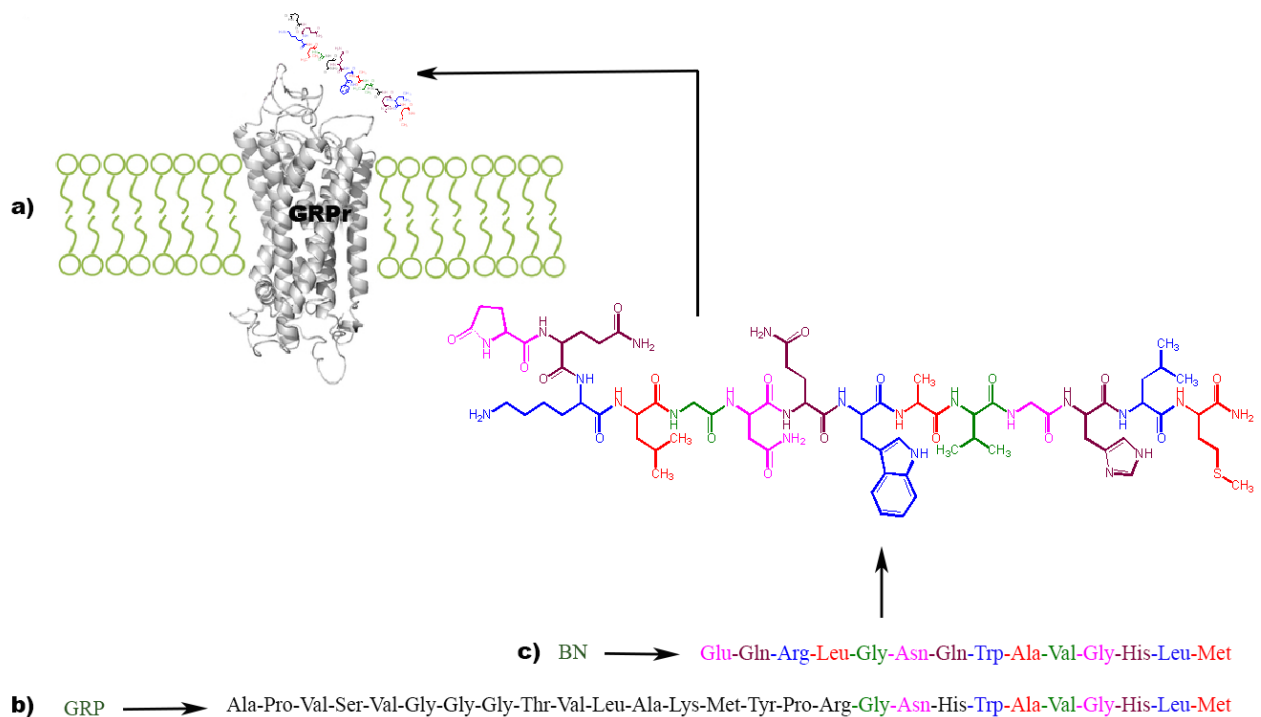


Figura 3: a) secuencia de aminoácidos del péptido GRP; b) secuencia de aminoácidos del péptido BN y c) GRPr.

En un estudio donde evalúan la expresión de GRPr en las líneas celulares HepG2 que pertenece a CHC, MHCC97H correspondiente a un tipo agresivo de CHC y HL-7702 correspondiente a células

de hígado encontraron por inmunohistoquímica una expresión aumentada de forma significativa en las 2 líneas de CHC en comparación con las de hígado normal, resultado que fue confirmado mediante PCR de transcripción inversa; donde el ARNm de GRPr fue 3.52 veces mayor en HepG2 y 3.61 veces mayor en MHCC97H que en HL-7702. También se realizó medición de proteínas por western blot donde los resultados mostraron el mismo patrón HepG2 aumento 2.10 veces y MHCC97H aumentó 2.92 veces en comparación con HL-7702(82). En otro estudio realizaron un análisis retrospectivo donde se evaluaron por inmunohistoquímica la identificación de GRPr en 61 muestras de pacientes diagnosticados con HCC, 31 muestras de pacientes con cirrosis hepática y 22 muestras de tejido hepático sano. Se encontró que el 29.5 % muestras presentaron expresión fuerte de GRPr en comparación con un 19.5 en tejido cirrótico y 4.5 en tejido sano. Finalmente en un estudio in vivo donde se utilizaron células HepG2 y células SK-Hep-1(células de endoteliales de adenocarcinoma Hepático) inoculadas en ratones (Ncr nu/un) para la evaluación de la molécula RC-3940-II, antagonista a GRPr, los resultados mostraron una reducción significativa del crecimiento del tumor en comparación con el control en ambas líneas celulares (86).

Es importante mencionar que las células tumorales expresan múltiples receptores no solo uno u otro esto ha llevado el desarrollo de heterodímeros, sistemas con la capacidad de unirse 2 receptores diferentes (87). En el caso particular de los receptores PSMA y GRPr se ha desarrollado el heterodímero DOTA-iPSMA(Nal)-BN (Figura 4). Este sistema ha mostrado aumentar la interacción con células PC3 (RGPr +) y LnCap (PSMA +) que los péptidos por separado (70,87).

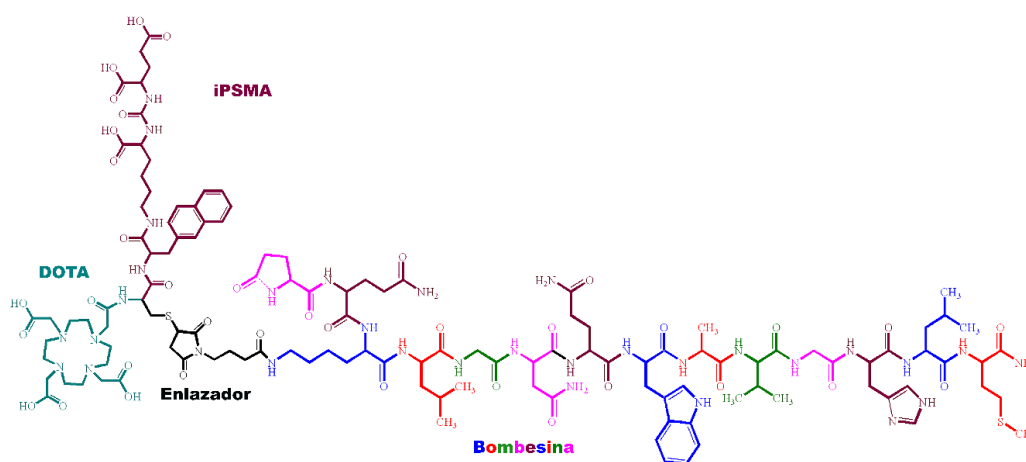


Figura 4: Estructura de DOTA-iPSMA-Lys³-BN

7.4 Uso de la nanotecnología y medicina nuclear en el tratamiento del Cáncer

Los avances de las últimas dos décadas sugieren que la nanotecnología puede ser aplicada para obtener un profundo impacto en la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. En términos de restricciones de tamaño, la nanotecnología es el uso de materiales con tamaños en el rango de 1 a 100 nanómetros (nm) en alguna de sus dimensiones (13–15).

En determinadas alteraciones fisiológicas, como el cáncer se ha observado un fenómeno de transporte en el tejido conocido como efecto pasivo de permeabilidad y retención aumentada (EPR). Este efecto se genera como consecuencia de los procesos angiogénicos, los cuales ocasionan al crecimiento desmesurado y desorganizado de los vasos sanguíneos y proliferación irregular de las células endoteliales, que crean espacios intercelulares entre 600-800 nm, tamaño mayor del observado en el endotelio del tejido sano (2 nm). Por otro la alteración en el ambiente tumoral genera la acumulación de nutrientes por la pérdida de depuración linfática, esto permiten el transporte y acumulación de macromoléculas, incluyendo a las NPs (Figura 5 arriba) (16–18). Estos fenómenos han generado el desarrollo de sistemas de nanopartículas cargadas con agentes quimioterapéuticos que permite aumentar la dosis en el tumor, también se están desarrollando sistemas de NPs funcionalizadas con moléculas de reconocimiento específico por los receptores que se encuentran sobre expresados en las células tumorales lo que direcciona de forma selectiva su acumulación, fenómeno conocido como EPR activo (figura 5 abajo) (88).

Además de las moléculas de reconocimiento específico que genera mayor concentración de las NPs en comparación con las NPs libres y de los fármacos, a las nanopartículas también se les adhieren radionúclidos como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu (emisores gama) permitiendo la exploración de alternativas diagnósticas y radionúclidos emisores de radiación alfa (^{225}Ac y ^{211}At), emisores beta (^{90}Y , ^{177}Lu y ^{188}Re), así como emisores de electrones de Auger (^{125}I , ^{123}I , ^{111}In , ^{67}Ga y ^{201}Tl) comúnmente empleados en la terapia debido a su corta vida media y adecuada actividad específica (figura 6) (89). Un ejemplo puntual es la funcionalización de AuNPs con el péptido c[RGDfK(C)] y radiomarcadas con ^{177}Lu , las cuales mostraron en estudios in vitro inhibición en la línea celular C6 superior al 25%, comparado con el ^{177}Lu únicamente unido a RGD y un 5% más que las nanopartículas unidas solo a ^{177}Lu (90,91).

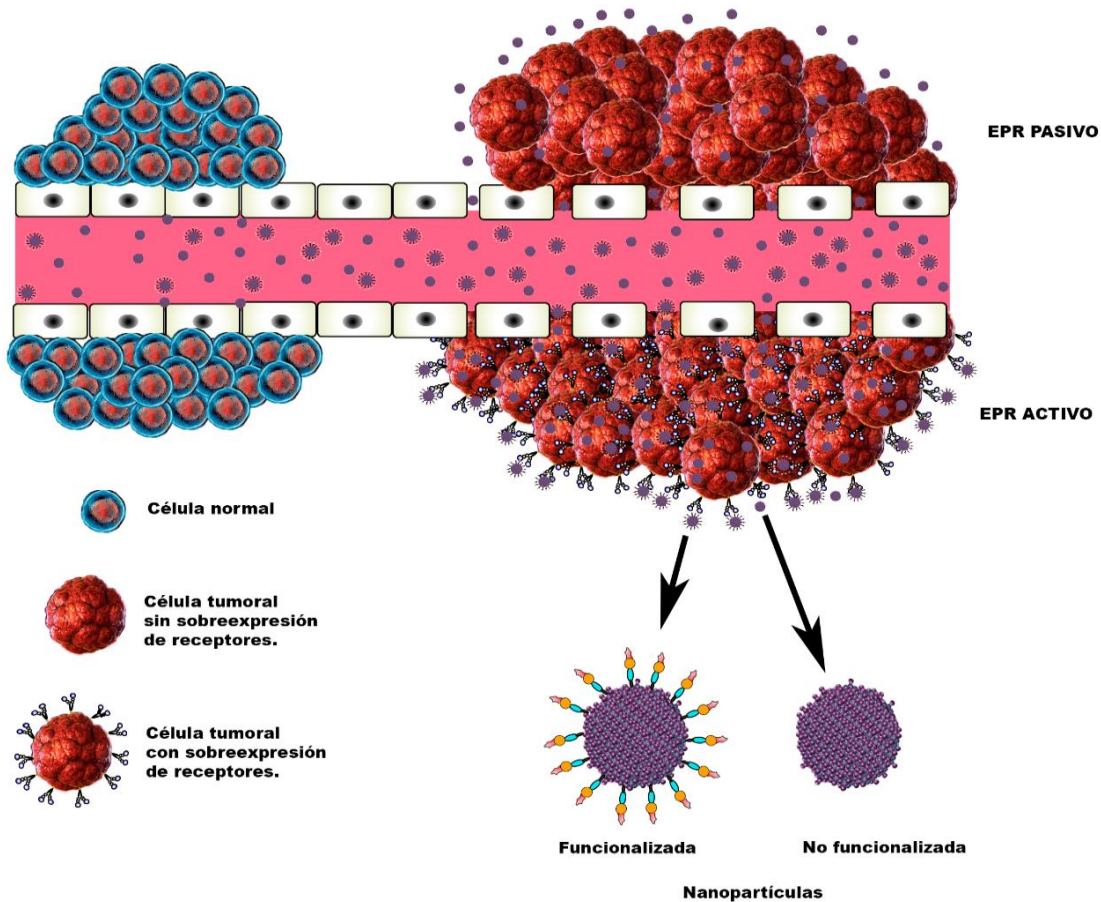


Figura 5: EPR pasivo y EPR activo.

El uso de radionúclidos en la terapia tumoral es debido al daño que generan la emisión de partículas de decaimiento radiactivo como las α , β , electrones de Auger (e^-) y radiación gamma en las células tumorales. El daño se debe a la capacidad de estas partículas (al presentar carga) de generar ionización directa y por parte de la radiación gamma ionización indirecta, debido a que la energía mínima para eliminar un electrón, conocido como potencial de ionización, tiene un rango de unos pocos eV (para metales alcalinos) hasta 24.5 eV para helio (92).

Para poder determinar el daño biológico por radiación se utiliza la llamada transferencia de energía lineal (LET) expresada en unidades de keV/ μ m (93,94) y se refiere a la intensidad de ionización

generada en el tejido biológico por las partículas de decaimiento. El LET para la mayoría de los emisores α terapéuticos varía de 25 a 230 keV/ μm , considerados de alta interacción con la materia con un orden de penetración en tejido de micrómetros, los electrones y positrones emitidos en la desintegración β nuclear, y en los procesos de conversión interna, tienen energías cinéticas que van desde decenas de keV a varios MeV y su LET es mucho menor, típicamente 0,2 keV / μm (93), pero su alcance en tejido es de varios mm. En el caso de los electrones de Auger, el LET depende del número atómico, las capas de electrones y la configuración electrónica involucrada, y suele estar en el rango de unos pocos eV a 100 keV, aunque presentan un corto alcance en tejido en el orden de nm, por lo tanto, los electrones Auger con energías relativamente bajas pueden tener un LET mucho mayor que las partículas α (93,95). Sin embargo, esa baja penetrabilidad en tejido hace necesario que los radionúclidos se internalicen en las células tumorales lo más cercano al núcleo (96).

La radiación gama que no es un proceso de desintegración primaria y suele ir acompañado de la desintegración β o α , se genera cuando el átomo resultante de las desintegraciones, se encuentra en un estado excitado, el cual vuelve muy rápido al estado fundamental ($<10^{-9}$ s), su característica de fotones de alta energía hace que no tenga un rango definido de interacción con el tejido ni de la energía que depositan, más bien pierden cierta cantidad de energía por unidad de distancia a través de la materia lo que genera un LET muy bajo por su alta penetrabilidad, ocasionando que su uso sea para fines diagnósticos más que terapéuticos (figura 6) (97).

No existe la bala mágica en medicina nuclear, situación que lleva a buscar mejores alternativas radiofarmacéuticas, que permitan la disminución de los efectos adversos, el costo de producción, su efecto en los tejidos y en la búsqueda de tiempos de vida media que sean apropiados para los tratamientos (9,98).

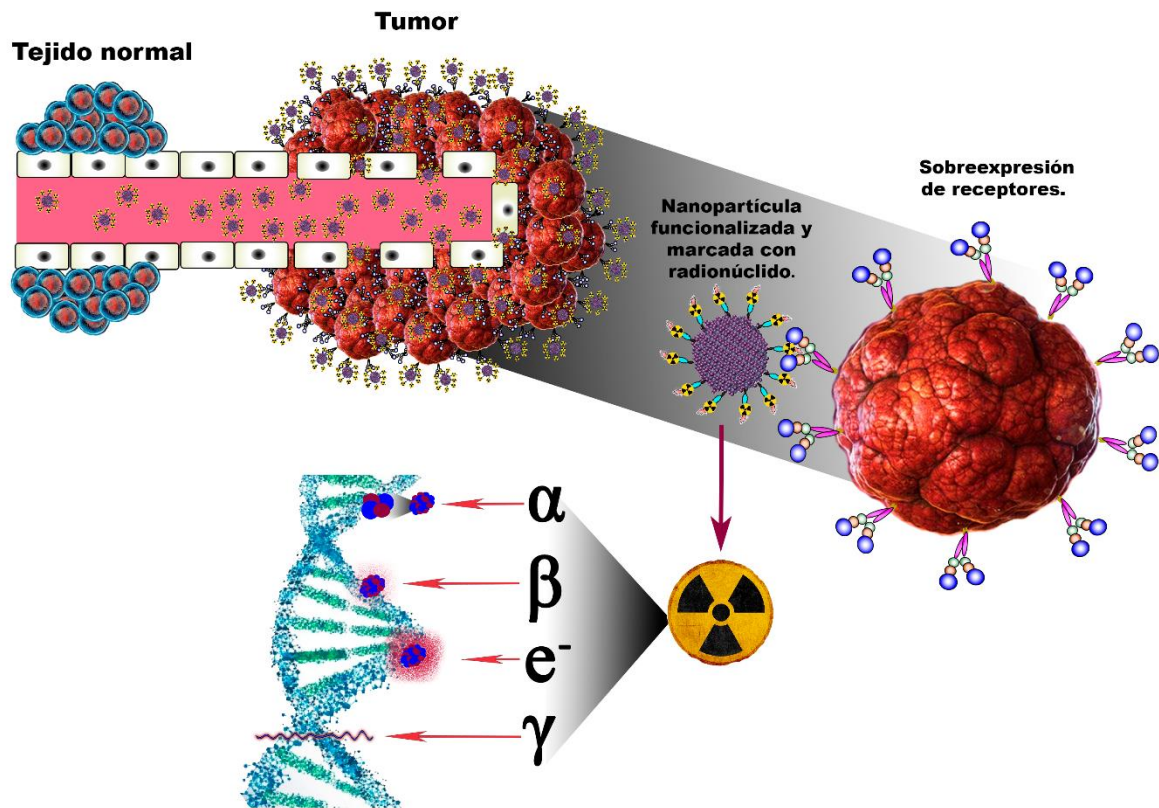


Figura 6: Interacción de los sistemas de nanopartículas funcionalizadas con moléculas de reconocimiento específico y marcadas con un radionúclido que puede tener decaimiento α , β , e^- y γ con daño y penetrabilidad diferente en el tejido biológico.

7.5 Nanopartículas de Sm_2O_3

El desarrollo de nanopartículas de óxidos metálicos, especialmente de los metales transición interna, han desencadenado amplias aplicación tecnológicas debido a sus ricos estados de valencia, vasta área superficial, su configuración electrónica que les genera propiedades ópticas, magnéticas, de coordinación y eléctricas únicas (19–23).

Dentro de los metales de transición interna se encuentra la familia de los lantánidos (Ln), también llamados tierras raras (RE) y están formados por los elementos: lantano (La), cerio (Ce), praseodimio (Pr), neodimio (Nd), Prometio (Pm), samario (Sm), europio (Eu), gadolinio (Gd), terbio (Tb),

disprosio (Dy), holmio (Ho), erbio (Er), tulio (Th), iterbio (Yb) y lutecio (Lu). Pm es radiactivo y no se encuentra en la naturaleza, solo se puede obtener por síntesis (99).

La característica principal y de mayor interés son sus propiedades de fotoluminiscencia que se presentan en el rango del ultravioleta, visible e infrarrojo. Es importante mencionar que se definen como luminiscentes y no fluorescentes y fosforescentes debido a que estos términos son referidos a la emisión de luz de compuestos orgánicos y se correlacionan con las transiciones energéticas de estado singlete a singlete y estados singlete a triplete respectivamente (100). Sin embargo, en el caso de los Ln, los procesos de emisión de luz se llevan a cabo principalmente por transiciones internas $4f - 4f$ (101,102). Estas transiciones se generan porque cada uno de los electrones en el orbital 4f está asociado a las 7 funciones de onda de los orbitales f tomando en cuenta los valores de spin $+1/2$, $-1/2$ y para los 15 Ln se obtienen los estados basales y los cambios permitidos por resonancia, los cuales son descritos en los diagramas de Dieke a partir de la teoría Judd-Ofelt y de campo cristalino (101,103). En los diagramas se puede observar que en el proceso de emisión desde un estado excitado a un estado basal, se tiene emisiones radiactivas (emisión de fotones) cuando existe la diferencia energética en un salto de un estado de mayor energía a menor energía para formar un fotón y generar luminiscencia, también se pueden observar las emisiones no radiativas cuando los diferentes niveles energéticos de relajación están tan cerca que la transición hacia el estado basal se da principalmente por transferencia de energía a través modos vibratorios y de conversión interna (104,105) (figura 7).

Las transiciones $4f-4f$ son posibles y estables debido a la protección de los orbitales 4f por los orbitales 5s, 5p y 6s por lo tanto no sufren modificaciones importantes cuando se cambia las características del entorno, situación que si se ve afectada en las transiciones $4f-5d$ que suceden en algunos casos como Ce, Pr y Tb (106,107).

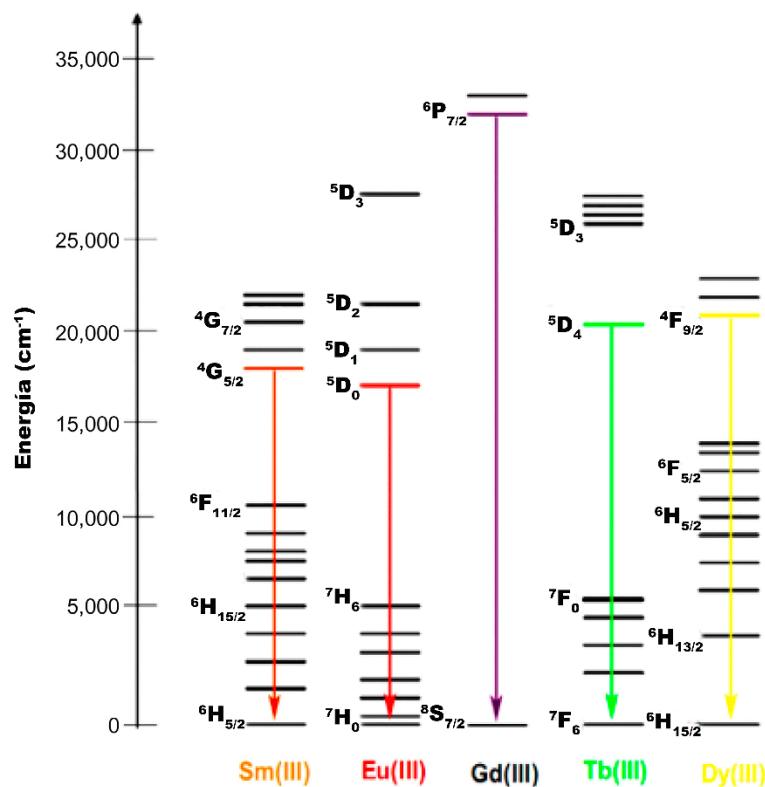


Figura 7: Representación de diagramas de Dieke para algunos lantánidos donde se muestra los cambios de niveles de mayor energía a niveles de menor energía que generan los espectros de luminiscencia. Tomada y modificada de (102).

El presente trabajo plantea la posibilidad del empleo de nanopartículas de Sm_2O_3 en la elaboración de dispositivos diagnósticos médicos y/o fines terapéuticos, debido a que su uso en el área de la nanomedicina no es tan común como si lo son el uso de Cerio y Europio (22,33,108), además presenta características que como se describen en la figura 8 y tabla 4 son adecuadas para su uso en medicina nuclear.

Se han reportado métodos de síntesis de nanopartículas de Sm_2O_3 como precipitación supercrítica por antisolvente (SAS) (31), la técnica de reacción de plasma de hidrógeno-metal, (HPMR) (29,30), síntesis hidrotérmica (109), síntesis por bio-reducción (19,21), síntesis electroquímica (110), síntesis por combustión (33), entre otros. También se tienen reportadas otras metodologías para la síntesis de nanopartículas de óxido de metales de transición (como Ag, Au, Y, Zn, In, Fe, Ti) y de transición

interna (como Lu, Ce, Gd, Eu) (22,111). Dentro de esas técnicas las más sobresalientes por su fácil realización y por mostrar resultados de tamaño de partícula y estabilidad de alta aceptación son sol-gel, pirolisis, precipitación, termoablación láser y termoreducción (112–115).

7.6 Isótopo ^{153}Sm

No se tiene reportes del uso médico de nanopartículas de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$. Sin embargo si se tienen aplicaciones médicas del isótopo ^{153}Sm en formación de complejos, como los reportados con hidroxiapatita o portadores térmicos como el polímero poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM), o como fármaco aceptable para estrategias terapéuticas tales como radiosinovioresis y en el tratamiento paliativo en las metástasis óseas donde Quadramet®, radiofármaco formado por ^{153}Sm coordinado con el ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMP) es el más utilizado (9,34); solo se ha reportado el desarrollo de micropartículas de Sm_2O_3 activadas a ^{153}Sm para su posible uso en el tratamiento del CHC; sin embargo, únicamente muestran estudios de estabilidad y radio marcaje (35).

El ^{153}Sm no se encuentra en forma abundante en la naturaleza, siendo necesaria su activación a partir de Sm_2O_3 constituido por Sm natural o enriquecido con ^{152}Sm , aunque en el primer caso con menor rendimiento porque ^{152}Sm (isotopo más abundante en su forma natural) solo se encuentra en un 26.7%. La generación de ^{153}Sm resulta de la reacción (n, γ), en reactores nucleares. Las características de este radionúclido (figura 8) han mostrado ser favorables para su posible uso diagnóstico y terapéutico (12,36,116,117).

En la tabla 4 se muestra una comparación entre ^{90}Y , ^{153}Sm y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ con la intención de resaltar las ventajas que podría tener el uso de ^{153}Sm en el tratamiento del CHC con respecto al ^{90}Y , donde las principales son: obtención de menor costo, la producción gamma de ^{153}Sm que nos permite detectarlo por SPECT a diferencia del β^- puro que es ^{90}Y . La comparación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es para valorar el uso diagnóstico de ^{153}Sm debido a que $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es el radionúclido por excelencia usado en más del 80% de los procesos radio diagnósticos como consecuencia de la adecuada energía de su emisión gamma (118).

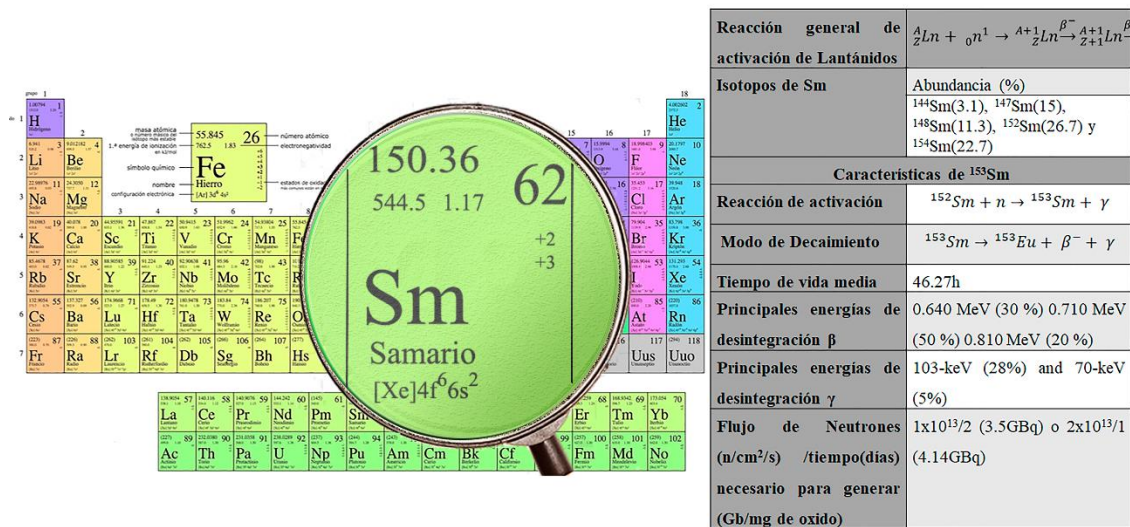


Figura 8: Características físicas y radiativas de ${}^{153}\text{Sm}$.

Tabla 4: Comparación entre ${}^{153}\text{Sm}$, ${}^{90}\text{Y}$ y ${}^{99m}\text{Tc}$ *DMP (Difosfato de metileno por sus siglas en ingles).

	${}^{153}\text{Sm}$	${}^{90}\text{Y}$	${}^{99m}\text{Tc}$
Fármacos	Quadramet®, ${}^{153}\text{Sm}$ -EDTMP	TheraSphere® ${}^{90}\text{Y}$ -esferas vidrio	${}^{99m}\text{Tc}$ -MDP*
Actividad	2 a 4 GBq	3 GBq	0.37 a 0.74 GBq
Uso	metástasis Oseas	CHC	Imagen ósea
Energía principal β	0.720 MeV	0.9367 MeV,	No emite
Vida media	46. 27 horas	64.6 horas	6 horas
Energía principal γ	103keV	No emite	140 KeV
	(100-200 keV) rango utilizado para diagnostico SPECT		
Producción	${}^{152}\text{Sm} + n \rightarrow {}^{153}\text{Sm}$ ${}^{153}\text{Sm} \xrightarrow{\beta} {}^{153}\text{Eu} + \gamma$	$89\text{Y} (n,\gamma) {}^{90}\text{Y}$, ${}^{235}\text{U}(n,f) {}^{90}\text{Sr} \xrightarrow{\beta} {}^{90}\text{Y}$	${}^{99}\text{Mo} \xrightarrow{\beta} {}^{99m}\text{Tc}$ por ciclotrón ${}^{100}\text{Mo}(p,2n){}^{99m}\text{Tc}$

7.7 Funcionalización de nanopartículas de Sm_2O_3

La funcionalización de las Sm_2O_3 NPs no es un tema con amplia investigación, sólo se ha reportado un estudio simulado donde utilizando la teoría de Pearson y la ecuación de Fukui se demostró que las nanopartículas de Samario de al menos 55 átomos tiene comportamiento electrofílico en su superficie, lo que hace posible que haya interacción con grupos moleculares nucleofílicos y por ende su funcionalización (21), con base en eso y tomando en cuenta análisis de XPS que indican que en la superficie de las Sm_2O_3 NPs se encuentra en su mayoría átomos de Sm se puede predecir su reacción con compuestos nucleofílicos.

En este trabajo se pretende la funcionalización de Sm_2O_3 con el heterodímero iPSMA-BN, los grupos carboxilos del anillo DOTA en el péptido iPSMA-BN, tiene característica nucleofílica por lo tanto vuelve factible una conjugación directa con las Sm_2O_3 NPs como lo muestra la Figura 9; sin embargo no se tiene reportada alguna metodología sobre ello, sólo se encontró un estudio acerca la funcionalización de nanotubos de Sm_2O_3 con grupos amino ($\text{NH-Sm}_2\text{O}_3$) utilizando el aminopropiltriétoxosilano (APTES), APTES se une a los nanotubos de Sm_2O_3 mediante los oxígenos del silano, a través de una interacción nucleofílica (119), lo cual es una prueba del comportamiento electrofílico de la superficie de las nanopartículas de Sm_2O_3 .

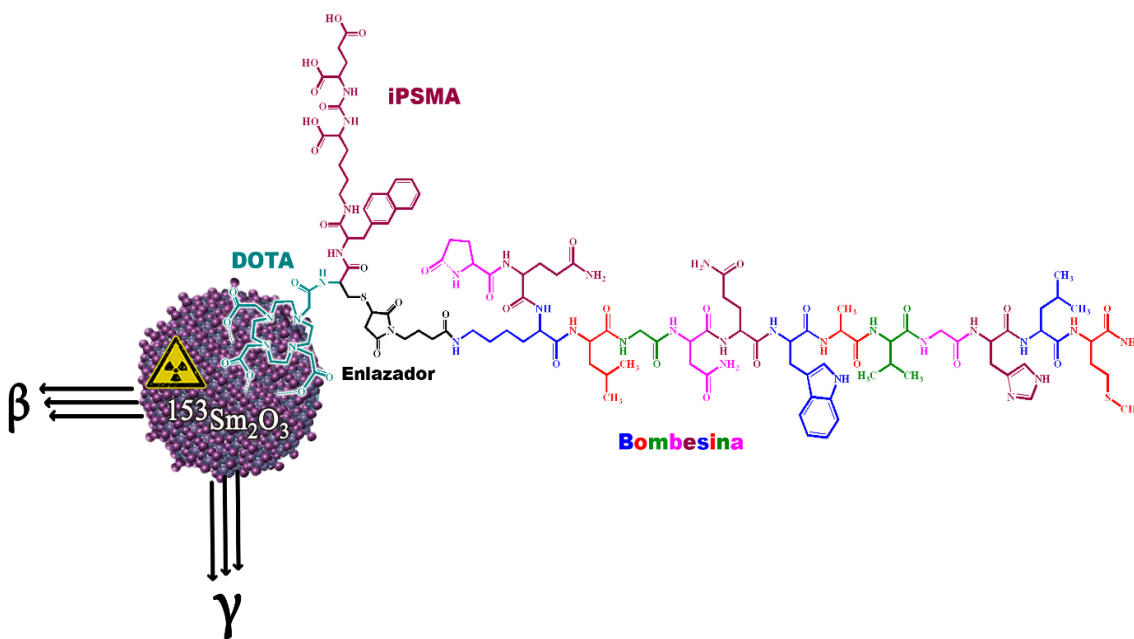


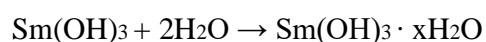
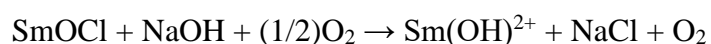
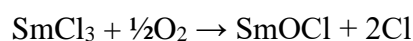
Figura 9: Esquema de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs

8 DISEÑO METODOLÓGICO

8.1 Síntesis nanopartículas de Sm₂O₃

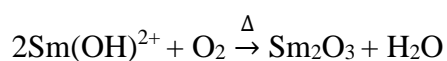
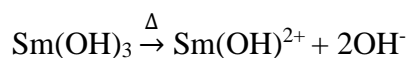
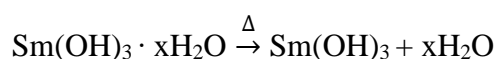
Precipitación-calcinación: Se pesaron 1g de Sm₂O₃ reactivo (polvo, pureza de 99.9%, Sigma-Aldrich, EE. UU.) y se colocaron en 20 mL de H₂O Tipo 1 (PISA, Mex.), después se adicionaron 2 mL de HCl concentrado y se dejó en homogenización a una temperatura no más de 50 °C hasta observar la formación de una solución translúcida con un pH aproximado de 2. Se preparó una solución concentrada de NaOH (3M) y se adicionó por goteo, hasta obtener un precipitado blanco y un pH de entre 12-14. La suspensión se dejó en agitación por 30 minutos, pasado el tiempo se realizaron lavados por centrifugación a 2500 g/30min hasta obtener un pH de 7. La suspensión lavada se dejó secar en un crisol a 90 °C por 24 horas para obtener un polvo blanco (Precursor: Sm(OH)₃ · xH₂O).

Propuesta de reacciones para la formación del precursor:



El total del polvo se fraccionó, y se sometió a calcinar, una parte a 600 °C y otra a 900 °C por 24 horas.

Propuesta de reacciones para la formación de Sm₂O₃ NPs



8.2 Preparación de Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs

De cada fracción de polvo calcinado (600 °C y 900 °C) se tomaron 10 mg y se colocaron en 10 mL de una solución de citrato trisódico 1 mM que contenía 100 µL de una solución del péptido iPSMA-BN (1mg/mL). La suspensión se dejó en baño de ultrasonido por 3 horas y después fue purificada por centrifugación a 2500g/30 min en tubos de 30 kD hasta no observar presencia de iPSMA-BN en el sobrenadante (detectado por espectrofotometría UV-VIS).

8.3 Preparación de ¹⁵³Sm₂O₃- iPSMA-BN NPs

Se tomaron 100 mg del polvo calcinado a 600 °C y se mandaron a activación en el reactor nuclear Triga MARK III con un flujo de neutrones de 1×10^{13} n/s/cm² durante 20 horas. Después de eso la muestra, que corresponde a ¹⁵³Sm₂O₃ NPs se funcionalizó con el péptido iPSMA-BN utilizando el mismo procedimiento descrito en el apartado 8.2

8.4 Caracterización química

Se realizó caracterización química al precursor que corresponde a Sm(OH)₃ (**a**); a los polvos resultado de la calcinación del precursor que corresponden a Sm₂O₃ NPs a 600°C (**b**) y Sm₂O₃ NPs a 900 °C (**c**); al sistema Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (**d**) y al sistema ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (**e**)

Análisis realizados:

- Análisis termogravimétrico (TGA): Para la identificación de procesos físicos de absorción, adsorción, desorción y transiciones de fase, asociando éstos cambios a transformaciones en las especies químicas formadas desde Sm(OH)₃ a Sm₂O₃.
- Difracción de Rayos X (XRD): identificación de los compuestos, a través de estado cristalino y pureza.
- Dispersión dinámica de luz (DLS) y Potencial Z: Evaluación de sistemas particulados: diámetro hidrodinámico y la estabilidad de los sistemas.
- Microscopía electrónica de transmisión (TEM): Evaluación de la geometría, tamaño y la estabilidad de los sistemas particulados.

- Espectroscopia de infrarrojo (FT-IR) y espectrofotometría UV-Vis (UV-Vis): elucidación estructural (péptido iPSMA-BN) y seguimiento de la funcionalización química.

8.5 Caracterización Biológica

8.5.1 Análisis *in vitro*:

Se utilizaron 2 líneas celulares: HepG2 que corresponde a una línea celular de CHC (PSMA +, GRPr +) y PC3 (PSMA -, GRPr +) correspondiente a una línea celular de cáncer de Próstata; se cultivaron en medio DMEM y medio RPMI respectivamente; ambos medios fueron suplementados con 10 % de suero bovino fetal; 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las células se incubaron en condiciones de humedad controlada, a temperatura de 37 °C y una atmosfera de 5% de CO₂.

8.5.1.1 Afinidad de receptores

Los ensayos de afinidad, del sistema ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs fue evaluado mediante un ensayo de saturación. Para tal efecto, se incubaron por triplicado una densidad de 1x10⁶ células por pozo en cajas de 6 pozos por 24 horas; pasado el tiempo se hizo un recambio de medio (frío) y se dejaron en baño de hielo por 30 minutos; se adicionaron concentraciones desde 0.25 nM a 90 nM del sistema ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs y se incubaron a 4 °C por 2 horas; después se retiró por completo el medio; se realizaron 2 lavados con PBS frío; se adicionó 1mL de NaOH 1M para lisar las membranas celulares; después todo el contenido de los pozos fue colectado en tubos de ensayo y se les cuantificó la actividad. Las medidas se normalizaron empleando un estándar de actividad conocida del sistema de ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs.

Para evaluar afinidad inespecífica: se realizó el mismo proceso con la diferencia que a las células se les adicionaron 1mL de una solución del péptido iPSMA-BN como agente bloqueante previo a la adición del sistema ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs. La afinidad especifica se calculó con la diferencia de la “afinidad total” menos la “afinidad inespecifica”.

8.5.1.2 Internalización

Se colocaron por triplicado 4×10^5 células en 500 μL de PBS en tubos de ensayo. Las células se dividieron en 3 grupos; al primero se le adicionaron el equivalente de 37 kBq de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs, al segundo el equivalente a 37 kBq de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA NPs y el tercer grupo fungió como grupo control; posteriormente se mantuvieron en incubación por 1 hora; pasado el tiempo, se midió la actividad total de los tubos; después se centrifugaron a 700 g/5 min; se separó el sobrenadante y se midió actividad (sistema no internalizado); al botón restante, se le adicionó 1mL de NaOH 1M y se dejó incubar por 5 min; pasado el tiempo se centrifugaron a 700 g/5 min; se retiró el sobrenadante y se midió actividad del botón para determinar el porcentaje de internalización.

8.5.1.3 Viabilidad

El análisis de viabilidad se llevó a cabo a través del ensayo de XTT. Se colocaron por triplicado 1×10^4 células por pozo en cajas de 96 pozos y se dejaron en incubación por 24 horas. Las células se dividieron en 3 grupos; a 2 grupos se les adicionó el equivalente a 37 kBq de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs y $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs respectivamente; y el tercero sin tratamiento (control), se dejaron incubar por una hora; después se retiró el tratamiento y se realizaron lavados con PBS (2 veces); se adiciono medio fresco y se dejaron en incubación por 72 horas; pasado el tiempo a cada pozo se le adicionaron 100 μL de PBS y 50 μL de reactivo de XTT; se dejaron en incubación por 4 horas y se midió la absorbancia a 450 nm para detectar el metabolismo celular del reactivo XTT. Para determinar el % de viabilidad se tomó la viabilidad del control como 100 % de viabilidad.

8.5.1.4 Análisis clonogénico

Se colocaron por triplicado el equivalente a 1×10^3 células por pozo en 6 pozos; se dejaron en incubación por 24 horas. Pasado el tiempo las células se dividieron en 3 grupos, a los primeros 2 grupos se les adicionó el equivalente a 3.7 kBq de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ NPs y Sm_2O_3 -iPSMA-BN NPs respectivamente y el tercer grupo se dejó como control; se dejaron en incubación por 24 horas; el medio fue remplazado por medio fresco y se dejaron en incubación durante 14 días (con cambios de medio cada 3 días). En el momento de análisis se adicionó una solución de 4% de paraformaldehído a cada pozo durante 10 min, se retiró y se realizaron lavados con agua tipo 1. Finalmente, a cada pozo se les adicionó cristal violeta 1%; se mantuvieron en agitación por 30 min; después se adicionó

paraformaldehído al 10 %; se dejó en agitación por 5 min (extracción del colorante), se retiró todo el contenido de cada pozo y se cuantificó la cantidad de colorante a una longitud de onda de 590 nm. La capacidad clonogénica se determinó tomando en cuenta como el 100 % a las células control.

8.5.2 Análisis *in vivo*

Se utilizaron ratones macho Balb-C con un peso promedio entre 18-30 g y entre 6-12 semanas de edad. Los ratones fueron mantenidos bajo los reglamentos éticos para el cuidado de animales de laboratorio con base en la NOM O62-ZOO-1999.

8.5.2.1 Biodistribución

Se utilizaron un total de 15 ratones de los cuales se formaron 5 grupos de 3 ratones; un grupo fue considerado control negativo y a los otros 4 grupos se les administraron vía intravenosa a través de la cola la cantidad de 100 μ L del sistema $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs que corresponde a una actividad de 74 MBq; para cada grupo se asignaron tiempos de reposo de 0.5, 3, 24 y 96 horas respectivamente, finalizado el tiempo los ratones fueron sacrificados y se midió peso y actividad en órganos como corazón, riñón, hígado, bazo, páncreas y sangre; finalmente se calculó la cantidad de actividad por peso de órgano en los diferentes tiempos, la actividad por órgano se normalizó por unidad de masa, y se corrigió empleando un estándar de actividad conocida, equivalente al 100 % de actividad administrada.

8.5.2.2 Análisis de biocompatibilidad

Se formaron 2 grupos de ratones, a un grupo se les administro una dosis de de 8.0 μ g/g del sistema de nanopartículas funcionalizadas, el grupo restante, se administró solamente con el vehículo (control). Se dejaron en observación por 72 horas, posteriormente fueron sacrificados, se extrajeron los órganos hígado, riñón y corazón los culares fueron deshidratados y embebidos en parafina, para ser seccionados y teñidos con hematoxilina y eosina para identificar alteraciones histológicas que evidenciaran daño tisular. También se realizó recolección de sangre para la obtención de suero y con ello realizar la evaluación de las enzimas AST, ALT y LDH empleando kits de análisis (UV-Vis).

8.5.2.3 Análisis de luminiscencia

Se utilizaron 3 ratones a los que les administro vía intravenosa a través de la vena de la cola la cantidad 100 μ L del sistema $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs, que correspondían a una actividad de 37 MBq, se dejaron en reposo durante 3 horas; pasado el tiempo los ratones fueron anestesiados con 2 % de isoflurano; se colocaron el en equipo X-Treme, Bruker, USA para la obtención de imágenes de rayos X y luminiscencia. Las imágenes fueron obtenidas sin filtro de emisión y con filtros de 535, 600, 700, 750, 790 y 830 nm.

9 RESULTADOS

9.1 Artículo publicado

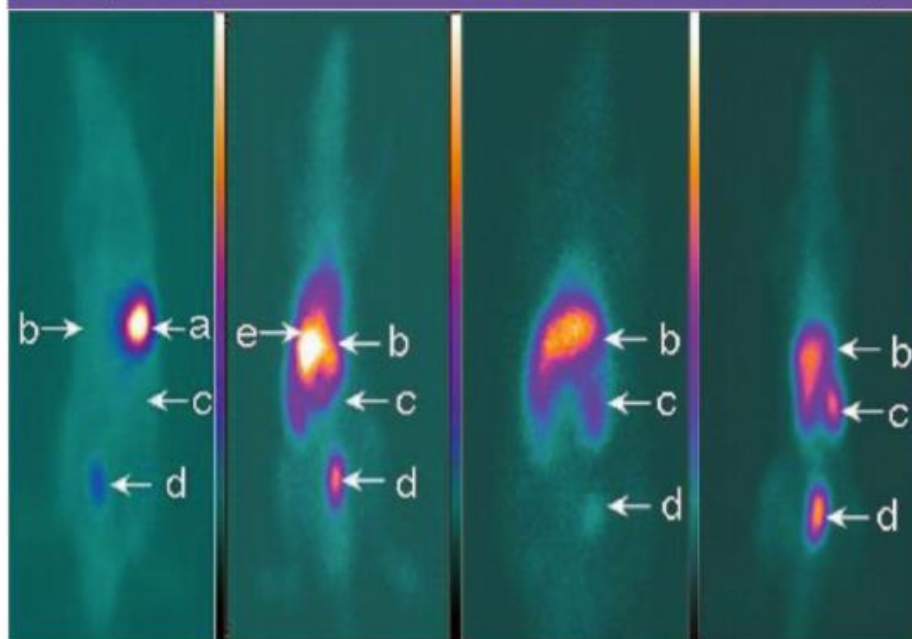
D. Trujillo-Benítez, G. Ferro-Flores, E. Morales-Avila, N. Jiménez-Mancilla, A. Ancira-Cortez, B. Ocampo-García, C. Santos-Cuevas, A. Escudero-Castellanos, M. Luna-Gutiérrez, and E. Azorín-Vega. **Synthesis and Biochemical Evaluation of Samarium-153 Oxide Nanoparticles Functionalized with iPSMA-Bombesin Heterodimeric Peptide.** Journal of Biomedical Nanotechnology. Vol. 16, 1–13, 2020. doi:10.1166/jbn.2020.2924

JOURNAL OF
**BIOMEDICAL
NANOTECHNOLOGY**

Covering all Aspects of Nanotechnology Research Related to Biology, Biotechnology, and Medicine

www.aspbs.com/jbn

Editor-in-Chief: Prof. M. N. V. Ravi Kumar, UK



A Special Issue on
Nanomedicines

GUEST EDITOR: Sophia G. Antimisiaris

IMPACT
FACTOR
4.483



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: guilhermina.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

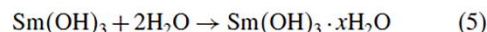
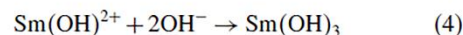
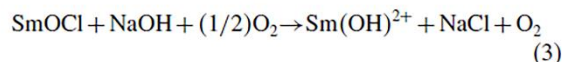
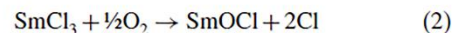
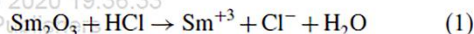
Sm₂O₃ Nanoparticle Synthesis

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

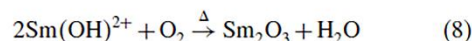
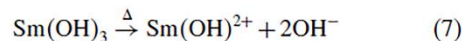
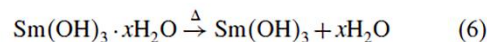
50 mL. The addition of Sm₂O₃ was continued until a pH of 6.2 was reached, and the solution was filtered through a 0.22 μm membrane. A concentrated solution of NaOH (3 M) was prepared, and 15 mL were added to the SmCl₃ solution until a white precipitate and a pH of 12 were obtained. The solution was allowed 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 Nanotrak analyzer (Nanotrak 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 2010 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)

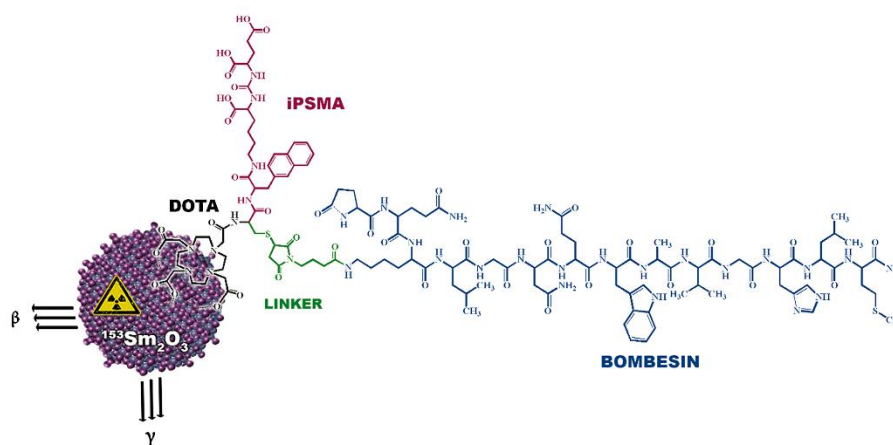


Figure 1. Scheme of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles.

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 $\text{Sm}_2(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{Sm}_2\text{O}(\text{CO}_3)_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ and $\text{Sm}_2\text{O}(\text{CO}_3)_2 \rightarrow \text{Sm}_2\text{O}_3 + 2\text{CO}_2$, 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

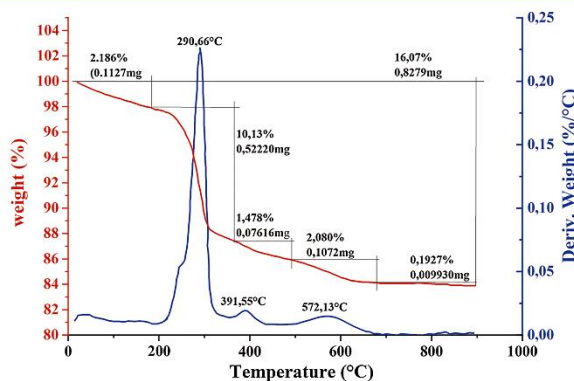


Figure 2. DSC-TGA spectrum of uncalcined Sm(OH)₃·xH₂O precursor synthesized for preparation of Sm₂O₃ nanoparticles.

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)

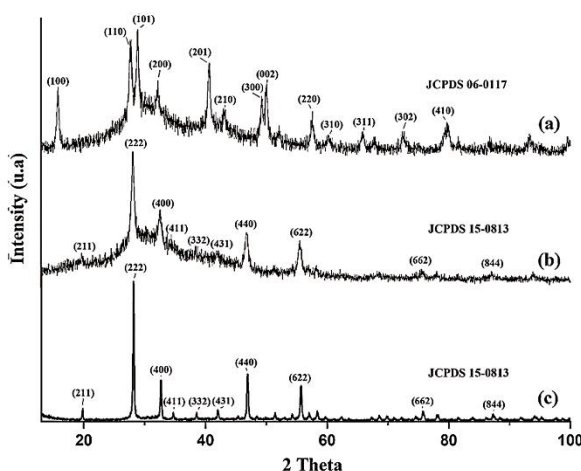


Figure 3. XRD spectrum: (a) Uncalcined Sm(OH)₃·xH₂O precursor, (b) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C and (c) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 900 °C.

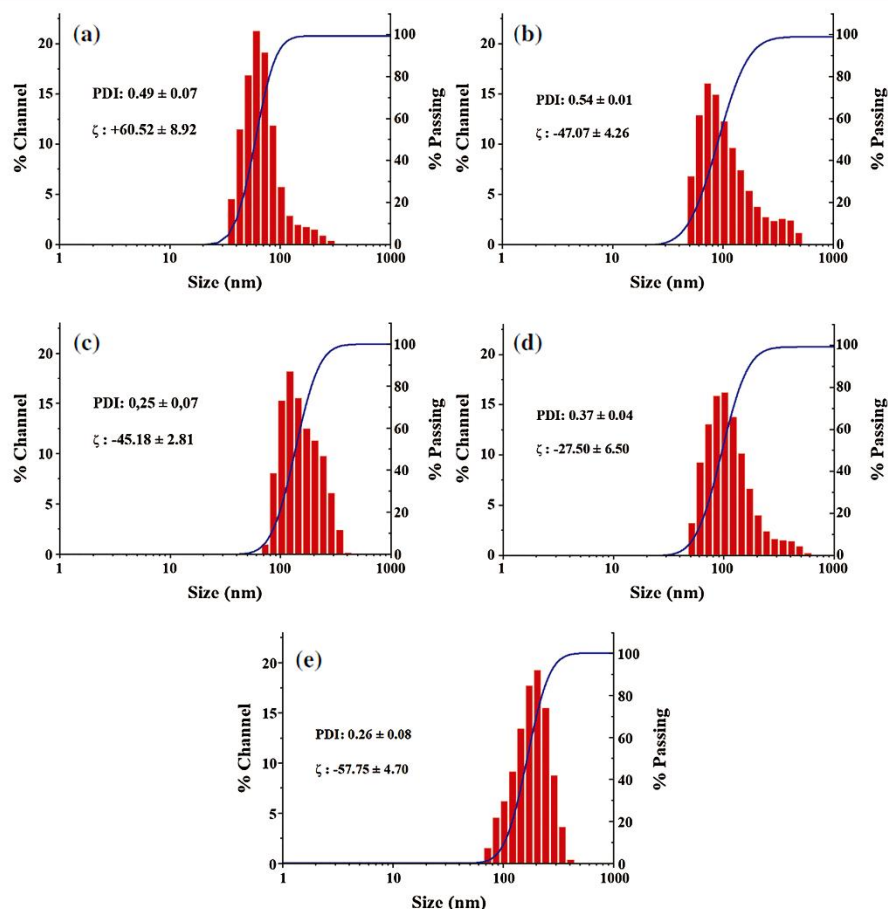


Figure 4. DLS, polydispersity Index (PDI), and potential Z (ζ): (a) Uncalcined Sm(OH)₃ · xH₂O precursor, (b) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C, (c) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 900 °C, (d) Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (600 °C) and (e) Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs (900 °C). (Mean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

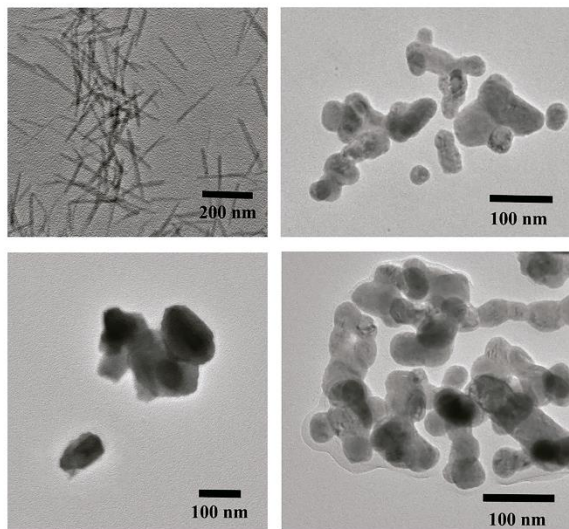


Figure 5. TEM micrograph: (a) Uncalcined Sm(OH)₃ · xH₂O precursor, (b) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C, (c) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 900 °C, and (d) Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs.

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

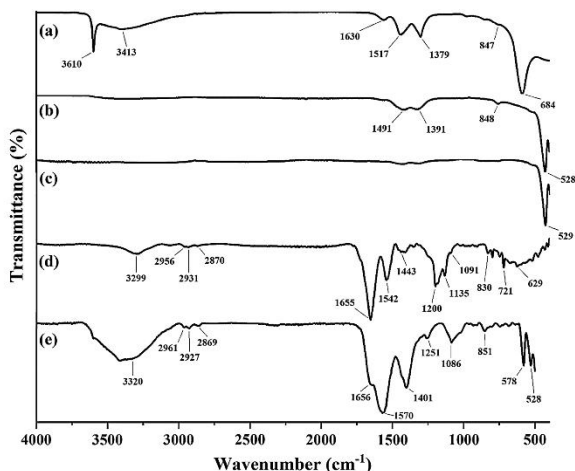


Figure 6. FT-IR spectrum: (a) Uncalcined Sm(OH)₃ · xH₂O precursor, (b) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C, (c) Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 900 °C, (d) iPSMA-BN peptide and (e) Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs.

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 monodentated 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

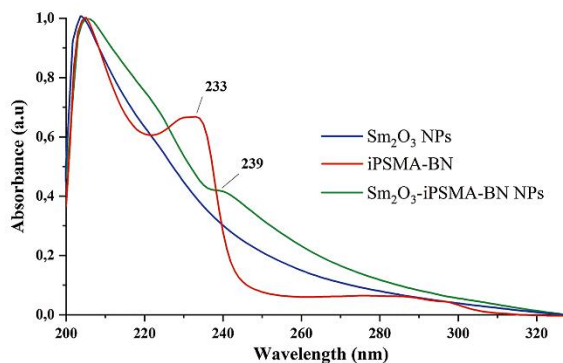


Figure 7. UV-Vis spectrum of Sm₂O₃ NPs obtained by calcination of precursor at 600 °C, iPSMA-BN peptide, and Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs.

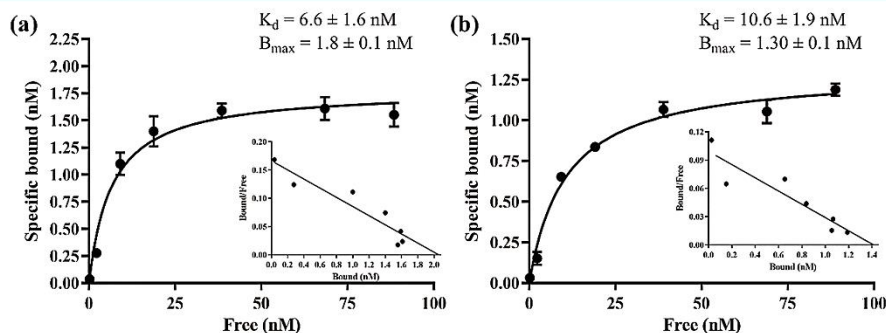


Figure 8. Saturation binding study on (a) GRPr/PSMA-positive HepG2 cells and (b) GRPr-positive PC3 cells of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles.

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

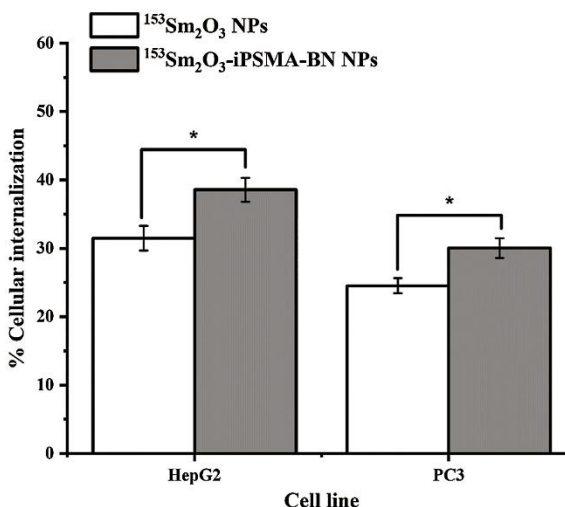


Figure 9. Cellular Internalization of ¹⁵³Sm₂O₃ NPs and ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs in HepG2 and PC3 cells (Incubation time = 1 h) (*statistically significant difference: $p < 0.05$, student's *t*-test).

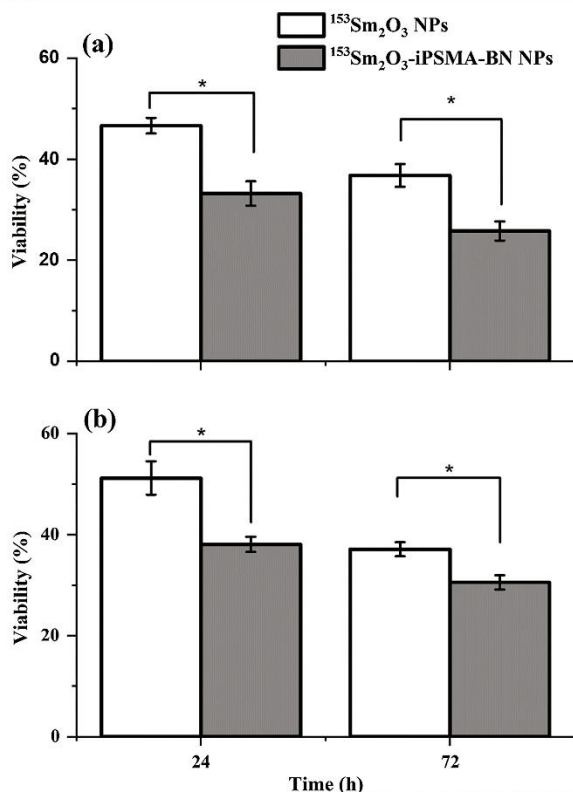


Figure 10. Effect of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs on HepG2 (a) and PC3 (b) viability at 24 and 72 h (*statistically significant difference: *p* < 0.05, student's *t*-test).

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*

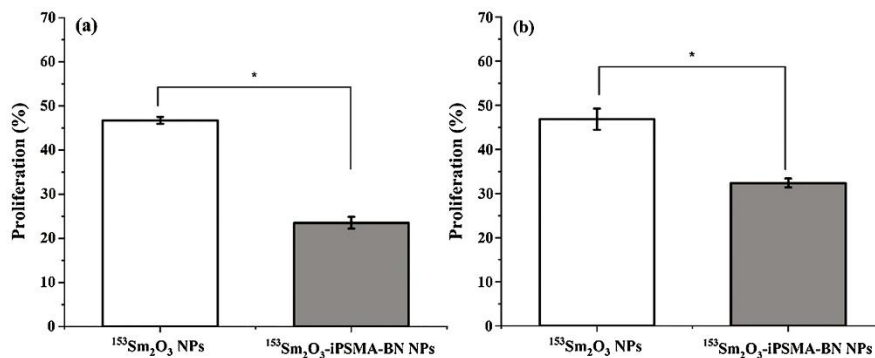


Figure 11. Effect of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN NPs on HepG2 (a) and PC3 (b) proliferation (clonogenic assay) (*statistically significant difference: *p* < 0.05, student's *t*-test).

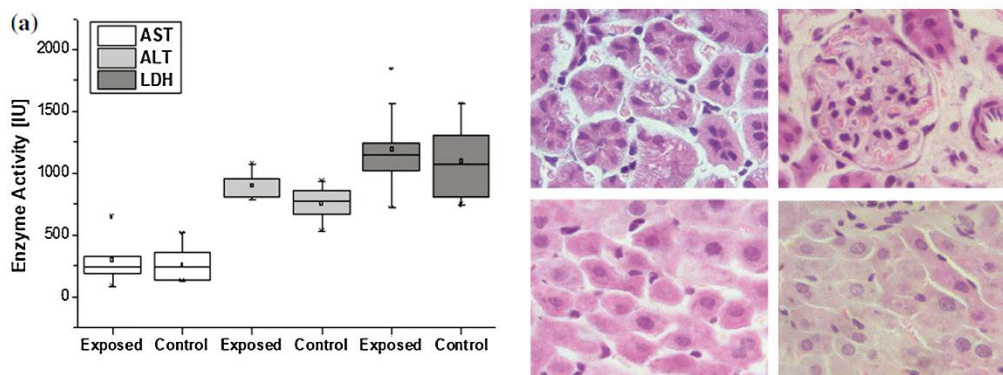


Figure 12. (a) Evaluation of AST, ALT and LDH enzyme activity between mice exposed to Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles and the control group. Microscopic views ((b) $\times 100$, (c) $\times 200$) of renal tissue and ((d, e) $\times 100$) hepatic tissue of mice exposed to Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles.

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).

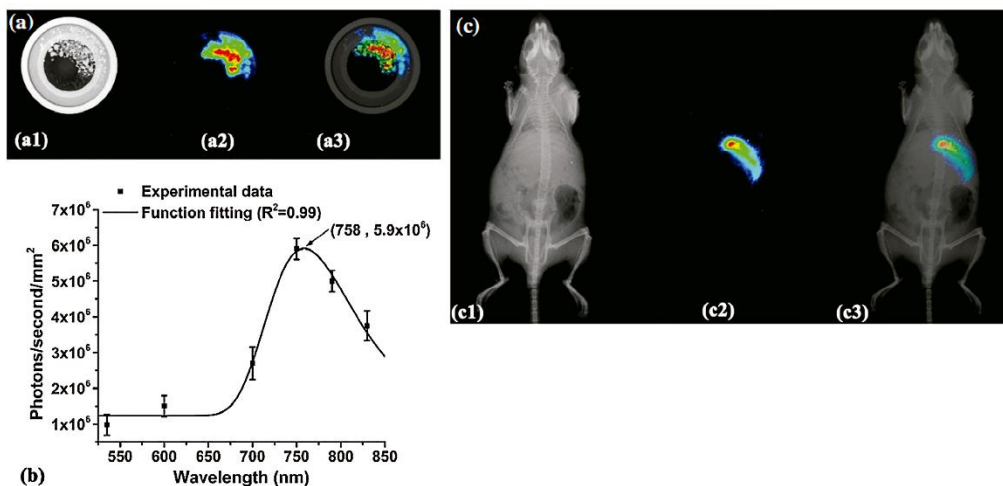


Figure 13. (a) ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles (powder): X-ray Image (a1), luminescent Image (a2) and merged Images (a3); (b) ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles (powder) emission spectrum and (c) biodistribution of ¹⁵³Sm₂O₃-iPSMA-BN nanoparticles (92 MBq, 0.5 mg) in a mouse in the prone position at 3 h 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; 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 radiolabeled peptide [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 nanoradiopharmaceuticals 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

- 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.
- 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.
- Tolkach, Y., Goltz, D., Kremer, A., Ahmadzadehfar, H., Bergheim, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ramamoorthy, N., Saraswathy, P., Das, M.K., Mehra, K.S. and Ananthakrishnan, M., 2002. Production logistics and radionuclidic purity aspects of ¹⁵³Sm for radionuclide therapy. *Nuclear Medicine Communications*, 23, pp.83–89.
- 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.
- 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.
- Adachi, G.Y. and Imanaka, N., 1998. The binary rare earth oxides. *Chemical Reviews*, 98(4), pp.1479–1514.
- Küläh, E., Marot, L., Steiner, R., Romanyuk, A., Jung, T.A., Wäckerlin, 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.
- 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.
- Hämmer, M. and Höpfe, H.A., 2019. Crystalline orthorhombic Ln[CO₃][OH] (Ln = La, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd) compounds hydrothermally synthesised with CO₂ from air as carbonate source. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 74(1), pp.59–70.
- 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.
- Kang, J.G., Min, B.K. and Sohn, Y., 2015. Synthesis and characterization of Sm(OH)₃ and Sm₂O₃ nanorod sticks. *Journal of Materials Science*, 50(4), pp.1958–1964.
- Hadjivanov, K., 2014. Identification and characterization of surface hydroxyl groups by infrared spectroscopy. *Advances in Catalysis*, 57, pp.99–318.
- 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.
- 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.
- Fielicke, A., Gruene, P., Haertelt, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Coates, J., 2006. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd., pp.10815–10837.
- Świdorski, G., Wilczewska, A.Z., Świśłocka, 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.
- 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.
- 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.
- Liu, T., Zhang, Y., Shao, H. and Li, X., 2003. Synthesis and characteristics of Sm₂O₃ and Nd₂O₃ nanoparticles. *Langmuir*, 19(18), pp.7569–7572.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lazaretti, N.S., Macedo, B.R., Izetti, P., Meurer, L., Rodriguez, R. and Schwartsmann, G., 2018. Gastrin-releasing peptide receptor expression in human hepatocellular carcinoma, cirrhosis and normal hepatic tissue. *Clinical Research Trials*, 4(6), pp.1–5.
- 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

10 CONCLUSIONES

Se realizó la síntesis de nanopartículas de Sm_2O_3 mediante el método de precipitación/calcinación, que se funcionalizaron con el péptido iPSMA-BN a través de interacción directa, seguida de la activación por irradiación neutrónica para obtener el sistema $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs, que al ser evaluado en las líneas celulares HepG2 (iPSMA + y GRPr +) y PC3 (iPSMA - y GRPr +) mostró interacción selectiva en comparación con las nanopartículas de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$.

$^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs puede tener un uso potencial como agente de tratamiento específico para el CHC (PSMA+ y GRPr +) disminuyendo las desventajas que tienen las actuales alternativas terapéuticas, se puede usar también como agente de diagnóstico debido a que tiene características de radioluminiscencia haciendo posible la adquisición de imágenes.

La síntesis de las Sm_2O_3 NPs se evaluó a dos temperaturas de calcinación 600°C y 900°C . Se observó que un incremento de temperatura propició un incremento del tamaño de la partícula, con mayor pureza y con mayor estado cristalino.

La caracterización fisicoquímica sugiere que la interacción entre Sm_2O_3 NPs y el péptido iPSMA-BN se da a través de enlaces de coordinación del grupo DOTA con los átomos de Sm que se encuentran en la superficie de las nanopartículas; de igual modo comprueba que la irradiación neutrónica no afecta el estado de las NPs debido a que su tamaño, morfología y estabilidad no sufren modificaciones significativas respecto al sistema antes de ser irradiado.

La caracterización biológica muestra que $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs tiene mayor interacción, internalización y citotoxicidad con células HepG2 (iPSMA +, GRPr +) comparado versus las células PC3 (iPSMA -, GRPr +). Se comprueba una interacción selectiva mediada por el péptido iPSMA-BN y un sinergismo generado por su característica de heterodímero que le permiten tener dos sitios donde interaccionar. Esta interacción confirma la presencia del péptido en las nanopartículas dado que se observa comportamientos diferentes (tal como se esperaba) en el sistema funcionalizado en comparación con el sistema que no ha sido funcionalizado (Sm_2O_3 NPs).

El análisis de biodistribución de $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NP indica que la mayoría se acumula en el hígado; además el seguimiento del sistema “*in vivo*” fue posible gracias a las propiedades de luminiscencia, que no presenta el sistema $^{\text{Nat}}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs. Esta característica no ha sido reportada en publicaciones previas y puede ser consecuencia tanto del estado activado de ^{153}Sm , como

de la posible potencialización de la luminiscencia por un efecto antena (coordinación con compuestos orgánicos). De esta manera se presenta la posibilidad de utilizar a $^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -IPSMA-BN NP como nano-radiofármaco a base del radiolantánido ^{153}Sm .

11 PERSPECTIVAS

Si bien el desarrollo e investigación respecto a la síntesis de nanopartículas de lantánidos es un campo muy estudiado, no lo es así con radio-nanopartículas de lantánidos, por lo tanto, este proyecto marca el inicio de nuevas investigaciones que vean estos sistemas como potenciales agentes para ser utilizados en la medicina nuclear.

Se puede realizar futuras evaluaciones de la funcionalización de Sm_2O_3 NPs con diferentes moléculas porque quedó comprobada su característica electrofílica al coordinarse con compuesto nucleofílicos como son los grupos COO^- y N : y con ello tener sistemas nanotecnológicos que pueden ser utilizados en múltiples campos.

$^{153}\text{Sm}_2\text{O}_3$ -iPSMA-BN NPs no está limitado sólo al CHC sino puede ser evaluado en otros tipos de tumores que sobre-expresen PSMA y GRPr, aunque aún se requieren más estudios de carácter clínico para tener la seguridad de que el sistema puede ser utilizado como un radiofármaco de reconocimiento específico.

12 REFERENCIAS

1. Memon, K., Kulik, L., Lewandowski, R.J., Mulcahy, M.F., Benson, A.B., Ganger, D., Riaz, A., Gupta, R., Vouche, M., Gates, L.V., Miller, F., Omary, R. and Salem, R. **2013**. Radioembolization for hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis : Impact of liver function on systemic treatment options at disease progression. *Journal of Hepatology*, 58(1),pp. 78-80
2. Ferlay, J., Colpmbet, 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.
3. Rasool, M., Rashid, S., Arooj, M., Ansari, A., Khan, K., Malik, A., Naseer, I., Zahid, S., Manan, A., Asif, M., Razzaq, Z., Ashraf, S., Qazi, M., Iqbal, Z., Gan, S., Kamal, M. and Sheikh, I. **2014**. New Possibilities in Hepatocellular Carcinoma Treatment. *Anticancer Research*, 34, pp. 1563-1572
4. Kinoshita, A., Onoda, H., Fushiya, N., Koike, K., Nishino, H. and Tajiri, H. **2015**. Staging systems for hepatocellular carcinoma: Current status and future perspectives. *World Journal of Hepatology*, 7(3), pp.406-424.
5. Marisi, G., Cucchetti, A., Ulivi, P., Canale, M., Cabibbo, G., Solaini, L., Foschi, G., Matteis, S., Ercolani, G., Valgiusti, M., Frassinetti, G., Scartozzi, M., and Gardini, A. **2018**. Ten years of sorafenib in hepatocellular carcinoma : Are there any predictive and/or prognostic markers?. *World Journal of Gastroenterology*, 24(36), pp. 4152–41563.
6. Soldera, J., Balbinot, S., Balbinot, R. and Cavalcanti, A. **2016**. Diagnostic and therapeutic approaches to hepatocellular carcinoma: Understanding the Barcelona Clínic Liver cancer protocol. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*. 2016, 9, pp. 67–71.
7. Marcacuzco, A., Nutu, O-A., San Román, R., Justo, I., Calvo, J., Manrique, A., Alvaro García-Sesma, A., Carmelo, S., Martínez, J. and Jimenez, C. **2018**. Complications of Transarterial Chemoembolization (TACE) in the Treatment of Liver Tumors. *Cirugía Española*, 96(9), pp. 560-568.
8. Clark, T. **2006**. Complications of Hepatic Chemoembolization. *Seminar in Interventional Radiology*, 23(2):119–25.
9. Knapp F. and Dash, A. **2016**. Radiopharmaceuticals for therapy. *Radiopharmaceuticals for Therapy*. India: *Springer International Publishing*; 2016. 1–347.
10. Salem, R., Gilbertsen, M., Butt, Z., Memon, K., Vouche, M., Hickey, R., Baker, T. Abecassis, M., Atassi, R., Riaz, A., Cella, D. and Burns, J. Ganger, D., Benson, A., Mulcahy, M., Kulik, L. and Lewandowski, R. **2013**. Increased Quality of Life Among Hepatocellular Carcinoma Patients Treated With Radioembolization, Compared With Chemoembolization. *Clinical Gastroenterology Hepatology*, 11(10), pp.1358–1365.
11. Kamel, Y. and Al-Kalbani, A. **2008**. Y-90 microspheres in the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *The Saudi Journal Gastroenterology*, 14(2), pp. 90-92.
12. Saha, G.B. **2018**. Production of Radionuclides. In: *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*.

- Springer International Publishing*; 2018. pp. 49–75.
13. Bhajarali, D., Khalil, M., Gurbuz, M., Simone TM. And Mousa, S. **2009**. Nanoparticles and cancer therapy : A concise review with emphasis on dendrimers. *International Journal of Nanomedicine*, 4, pp. 1–8.
 14. Arosio, D., Manzoni, L., Araldi, E., and Scolastico, C. **2011**. Cyclic RGD Functionalized Gold Nanoparticles for Tumor Targeting. *Bioconjugate Chemistry*, 22(4), pp. 664–672.
 15. Alexis, F., Pridgen, EM., Langer, R. and Farokhzad, OC. **2010**. Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. In: Schäfer-Korting M. *Drug Delivery Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin, pp. 55–86.
 16. Morales-Avila, E., Ortiz-Reynoso, M., Seyedeh, M. and Amirhossein A. **2014**. Multifunctional radiolabeled nanoparticles: strategies and novel classification of radiopharmaceuticals for cancer treatment. *Journal of Drug Targeting*, 23(3), pp. 191-201.
 17. Misra, R., Acharya, S. and Sahoo, SK. **2010**. Cancer nanotechnology : application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 15(19–20), pp.842–850.
 18. Hare, J., Lammers, T., Ashford, M., Puri, S., Storm, G. and Barry, S. **2016**. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development : An industry perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 108, pp. 25–38.
 19. Sone, B.T., Manikandan, E. and Maaza, M. **2015**. Sm₂O₃ Nanoparticles Green Synthesis Via Callistemon Viminalis' Extract. *Journal of Alloys Compounds*, 650(25), pp. 357–362.
 20. Liu S. **2009**. Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency. *Bioconjugate Chemistry*, 20(12); pp. 2199–2213.
 21. Ascencio, J., Rincon, A. and Canizal, G. **2005**. Synthesis and theoretical analysis of samarium nanoparticles: Perspectives in nuclear medicine. *The Journal of Physical Chemistry B.*, 109(18), pp. 8806–8812
 22. Muneer, I., Farrukh, M., Javaid, S., Shahid, M. and Khaleeq-ur-Rahman, M. **2015**. Synthesis of Gd₂O₃/Sm₂O₃ nanocomposite via sonication and hydrothermal methods and its optical properties. *Superlattices and Microstructures*, 77, pp. 256–266.
 23. Jamie, Y, Say, L., Thao, P., Boey, F. and Ma, J. **2008**. Controlled size and morphology of EDTMP-doped hydroxyapatite nanoparticles as model for ¹⁵³Samarium-EDTMP doping. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(2993), pp.2993-3003.
 24. Polte J. **2015** Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective. *CrystEngComm*, 17(36), pp. 6809–6830.
 25. Liu, C., Hou, Y. and Gao, M. **2014**. Are Rare-Earth Nanoparticles Suitable for In Vivo Applications? *Advanced Materials*, 26(40), pp.6922–6932.
 26. Abu-Zied, B. and Asiri, A. **2014**. Synthesis of Dy₂O₃ nanoparticles via hydroxide precipitation: effect of calcination temperature. *Journal of Rare Earths*. 32(3), pp. 259–264.
 27. Baker, C., Kim, W., Sanghera, J., Goswami, R., Villalobos, G., Sadowski, B., and Aggarwal, L. **2012**. Flame spray synthesis of Lu₂O₃ nanoparticles. *Materials Letters*, 66(1), pp. 132–134.
 28. Bakht, M., Sadeghi, M. and Tenreiro, C. 2011. A novel technique for simultaneous diagnosis and radioprotection by radioactive cerium oxide nanoparticles: study of cyclotron production

- of $^{137\text{m}}\text{Ce}$. *Journal Radioanalytical Nuclear Chemistry*, 292(1), pp. 53–59.
29. Liu, T., Zhang, S. and Li. **2003**. Synthesis and Characteristics of Sm_2O_3 and Nd_2O_3 Nanoparticles. *Langmuir*, 19(18), pp. 7569–7572.
 30. Li, J. and Mei, Q. 2016. TiAl_3 - TiN Composite Nanoparticles Produced by Hydrogen Plasma-Metal Reaction : Synthesis , Passivation, and Characterization. *Nanomaterials*, 6(6), pp. 101.
 31. Reverchon, E., Della, G., 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.
 32. Nguyen, T-D., Mrabet, D. and Do, T-O. **2008**. Controlled self-assembly of Sm_2O_3 nanoparticles into nanorods: Simple and large scale synthesis using bulk Sm_2O_3 powders. *The Journal of Physical Chemistry* ,112(39):15226–15235.
 33. Morris, A. and S.Israel. **2017**. Synthesis and Characterization of Sm_2O_3 Nanoparticles using combustion method. *International Research Journal of Engineering and Tecnjonology*, 1(181), pp.276–279.
 34. Chakravarty, R., Chakraborty, S., Shahiralam, M., Ram, R., Sarma, H. Dash A. **2018**. An electrochemical approach for removal of radionuclidic contaminants of Eu from ^{153}Sm for effective use in metastatic bone pain palliation. *Nuclear Medicine and Biology*, 58, pp. 8–19.
 35. Hashikin, N., Yeong, C., Abdullah, B., Ng, K. Chung, Y., Dahalan, R. and Perkins, A. **2015**. Neutron Activated Samarium-153 Microparticles for Transarterial Radioembolization of Liver Tumour with Post- Procedure Imaging Capabilities. *PLoS*, 10(9), pp. 1–17.
 36. Naseri, Z., Jalilian, A., Kharat, A. and Bahrami-Samani, A. **2011**. Production , quality control and biological evaluation of ^{153}Sm -TTHMP as a possible bone palliation. *Iranian Journal of Nuclear Medicine*, 19(2). pp. 61–68.
 37. Chen, Y., Gao, D., Huang, L. and Hill, C. **2016**. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: *Challenges and strategies*. *Advanced Drug Deliviry Reviews*, 81, pp. 128–141.
 38. Gozde, Z., Poyanli, A., Ucar, A., Kuyumcu, S., Akyuz, F., Keskin, S., Saglam, S., Yilmaz, E., Karaca, C. and Turkmen, C. **2015**. Favorable Survival Time Provided with Radioembolization in Hepatocellular Carcinoma Patients with and without Portal Vein Thrombosis, *Cancer Biotherapy and Radipharmaceuticals*, 30(3), pp. 1–7.
 39. Chen, J., Zhu, S., Tong, L., Li, J., Chen, F., Han, Y. Zhao, M. and Xiong, W. **2014**. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles mediated ^{131}I -hVEGF siRNA inhibits hepatocellular carcinoma tumor growth in nude mice. *BMC Cancer*, 14(114), pp. 1-8
 40. Nita, M., ALVES, V., Carrilho, F., Ono-Nita, S., Mello, E. and Gama-Rodrigues, J. 2002. Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(1), pp. 39–48.
 41. Balogh, J., Victor, D., Asham, E., Burroughs, S., Boktour, M., Saharia, A., Li, X., Ghobrial, R. and Monsour, H. **2016**. Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocell Carcinoma*, 3, pp. 41–53.
 42. Forner, A., Gilabert, M., Bruix, J. and Raoul, J-L. **2014**. Treatment of intermediate-stage

- hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 11(9), pp. 525–535.
43. Forner, A., Reig, M., Varela, M., Burrel, M., Feliu, J., Briceño, J., Sastre, J., Martí-Bonmati, L., Llovet, J., Bilbao, J., Sangro, B., Pardo, F., Ayuso, C., Bru, C., Tabernero, J. y Bruix, J. **2016**. Diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Actualización del documento de consenso de la AEEH, SEOM, SERAM, SERVEI y SETH. *Medicina Clinica*, 146(11), pp. 511.e1-511.e22.
 44. Raoul, J., Forner, A., Bolondi, L., Cheung, T., Kloeckner, R. and de Baere, T. **2019**. Updated use of TACE for hepatocellular carcinoma treatment: How and when to use it based on clinical evidence. *Cancer Treatment Reviews*, 72(2018), pp. 28–36.
 45. Giannelli, G., Bergamini, C., Fransvea, E., Marinosci, F., Quaranta, V. and Antonaci, S. **2001**. Human Hepatocellular Carcinoma (HCC) Cells Require Both $\alpha3\beta1$ Integrin and Matrix Metalloproteinases Activity for Migration and Invasion. *Laboratory Investigation*, 81(4), pp. 613–627.
 46. Lee, Y., Kim, B., Kim, B., Shin, A., Kim, J., Hong S., Hwang, J., Lee, J., Nam, S., Lee, S., Bhak, J. and Park, J. **2015**. SLC15A2 genomic variation is associated with the extraordinary response of sorafenib treatment: whole-genome analysis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 6(18), pp. 16449-16460.
 47. Chaparro, M., González, L., Trapero-Marugán, M, Medina, J., Moreno-Otero R. **2008**. Review article: pharmacological therapy for hepatocellular carcinoma with sorafenib and other oral agents. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 28(11–12), pp. 1269–1277.
 48. Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., Scott, W., Lynch, M and Carter, C. **2006**. Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. *Cancer Research*, 66(24), pp. 11851–11858.
 49. Carmeliet P. and Jain R. **2011** Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), pp. 298–307.
 50. Carmeliet, P. **2003**. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), pp. 653–660.
 51. Desgrosellier, J. and Chersesh, D. **2010**. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Natural Reviews. Cancer*, 10(1), pp. 9–22.
 52. Scartozzi, M., Faloppi, L., Svegliati, G., Loretelli, C., Piscaglia, F., Iavarone, M, Toniutto, P., Fava, G., DE Minicis, S., Mandolesi, A., Bianconi, M., Giampieri, R., Granito, A., Facchetti, F., Bitetto, D., Marinelli, S., Venaerandi, L., Vavassori, S., Gemini, S., D’Errico, A., Colombo, M., Bolondi, L., Bearzi, I., Benedetti, A. and Cascinu, S. **2014**. VEGF and VEGFR genotyping in the prediction of clinical outcome for HCC patients receiving sorafenib: The ALICE-1 study. *International Journal of Cancer*, 135(5), pp. 1247–1456.
 53. Strumberg, D., Clark, J., Awada, A., Moore, M., Richly, H., Hendlisz, A., Hirte, H., Eder, J., Lenz, H. and Schwartz, B. **2007**. Safety, Pharmacokinetics, and Preliminary Antitumor Activity of Sorafenib: A Review of Four Phase I Trials in Patients with Advanced Refractory Solid Tumors. *Oncologist*, 12(4):426–437.
 54. Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas ,J., Smith, R., Schwartz, B.,

- Simantov, R. and Kelley, S. **2006**. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 5(10), pp. 835–844.
55. Zheng, Y., Zhan, M., Zhao, W., Liu, B., Huang, J., He, X., Fu, Si-Rui, Zhao, Y., Li, B. and Lu, L. **2014**. The relationship of kinase insert domain receptor gene polymorphisms and clinical outcome in advanced hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. *Medical*, 31(10), pp.209.
56. Iyer, R., Fetterly, G., Lugade, A. and Thanavala, Y. **2010**. Sorafenib: a clinical and pharmacologic review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 1(11), pp.1943–1955.
57. Bins, S., Lenting, A., Bouazzaoui, S., van Doorn, L., Oomen-de Hoop, E., Eskens, F., van Doorn, L. and Mathijssen, R. **2016**. Polymorphisms in SLCO_{1B1} and UGT_{1A1} are associated with sorafenib-induced toxicity. *Pharmacogenomics*, 17(14), pp. 1483–1490.
58. Nahon, P. and Zucman-rossi, J. **2012**. Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 57(3), pp. 663–674.
59. Alfarouk, K., Stock, C., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A., Verduzco, D., Bashir, A., Mohammed, O., Elhassan, G., Harguindey, S., Reshkin, S., Ibrahim, M. and Rauch, C. **2015**. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International*, 15(1), pp. 71.
60. Chari, R. **2008**. Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs. *Accounts Chemical Research*, 41(1), pp. 98–107.
61. Kocal, G. and Baskin, Y. **2017**. Polymorphisms in Pharmacogenetics of Personalized Cancer Therapy. *Genetic Polymorphisms. InTech*, pp. 13.
62. Tully, K., Sobol, N., Pereira, P. and Lewis J. **2019**. Molecular Imaging Companion Diagnostics. *Companion and Complementary Diagnostics*, pp. 201–228.
63. Wüstemann, T., Haberkorn, U., Babich, J. and Mier, W. **2019**. Targeting prostate cancer: Prostate-specific membrane antigen based diagnosis and therapy. *Medical Research Reviews*, 39(1), pp. 40–69.
64. Chen, X, Liu, L. and Jiang, C. **2016**. Charge-reversal nanoparticles : novel targeted drug delivery carriers. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(4), pp. 261–267.
65. Abdelmoez, A, Coraça-Huber, D., Thurner, G., Debbage, P., Lukas, P., Skvortsov, S., Skvortsova, I. **2017**. Screening and identification of molecular targets for cancer therapy. *Cancer Letters*, 387, pp. 3–9.
66. Kummar, S. and Doroshow, J. **2013**. Molecular targets in cancer therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(3), pp. 267–269.
67. Kosti, I., Jain, N., Aran, D., Butte, A. and Sirota, M. **2016** Cross-tissue Analysis of Gene and Protein Expression in Normal and Cancer Tissues. *Scientific Reports*, 6, pp. 24799
68. Werner, R., Derlin, T., Lapa, C., Sheikbahaei, S., Higuchi, T., Giesel, F., Berh, S., Kimura, H., Buck, A., Bengel, F., Pomper, M. Gorin, M. and Rowe, S. **2020**. ¹⁸F-Labeled, PSMA-Targeted Radiotracers: Leveraging the Advantages of Radiofluorination for Prostate Cancer Molecular Imaging. *Theranostics*, 10(1), pp. 1–16.
69. Ferro-Flores, G., Luna-Gutiérrez, M., Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Azorín-Vega, E., Jiménez-Mancilla, N., Oricio-Rodríguez, E., Davanzo, J. and García-Pérez, F. **2017**.

- Clinical translation of a PSMA inhibitor for 99m Tc-based SPECT. *Nuclear Medicine and Biology*, 44, pp. 36-44.
70. Mendoza-Figueroa, M., Escudero-Castellanos, A., Ramirez-Nava G-, Ocampo-García, B., Santos-Cuevas, C., Ferro-Flores, G., Pedraza-Lopez, M. and Avila-Rodriguez, M. **2018**. Preparation and preclinical evaluation of ⁶⁸Ga-iPSMA-BN as a potential heterodimeric radiotracer for PET-imaging of prostate cancer. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 318(3), pp. 2097–2105.
71. Van de Wiele, C., Sathekge, M., de Spiegeleer, B., de Jonghe, P., Beels, L. and Maes, A. **2019**. PSMA-Targeting Positron Emission Agents for Imaging Solid Tumors Other Than Non-Prostate Carcinoma: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), pp. 4886.
72. Lütje, S., Slavik, R., Fendler, W., Herrmann, K. and Eiber, M. **2017**. PSMA ligands in prostate cancer – Probe optimization and theranostic applications. *Methods*, 130, pp.42–50.
73. Caromile, L and Shapiro, L. **2017**. PSMA redirects MAPK to PI3K-AKT signaling to promote prostate cancer progression. *Molecular Cell Oncology*, 4(4), pp. e1321168.
74. Fuentes, M., Mandujano, L., López, R., Guarneros, L., Azorín, E. and Osorio-González, D. **2018**, In silico Analysis of the Structural Properties of PSMA and its Energetic Relationship with Zn as Cofactor. *Journal of Nuclear Physics, Material Sciences, Radiation Application*, 6(1), pp. 115–20.
75. Santos-Cuevas, C., Ferro-Flores, G., García-Pérez, F., Jiménez-Mancilla, N., Ramírez-Nava, G., Ocampo-García, B, Luna-Gutierrez, M., Azorín-Vega, E., Davanzo, J. and Soldevilla-Gallardo, I. **2018**. 177 Lu-DOTA-HYNIC-Lys(Nal)-Urea-Glu: Biokinetics, Dosimetry, and Evaluation in Patients with Advanced Prostate Cancer. *Contrast Media and Molecular Imaging*, 2018, pp.1–10.
76. Dorff, T., Fanti, S., Farolfi, A., Reiter, R., Sadun, T. and Sartor, O. **2019**. The Evolving Role of Prostate-Specific Membrane Antigen–Based Diagnostics and Therapeutics in Prostate Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, (39), pp.321–330.
77. Evans, J., Malhotra, M., Cryan, J. and O’Driscoll, C. **2016**. The therapeutic and diagnostic potential of the prostate specific membrane antigen/glutamate carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in cancer and neurological disease. *British Journal Pharmacology*, 173(21), pp. 3041–3079.
78. Sasikumar, A., Joy, A., Nanabala. R., Pillai, M., Thomas, B. Aand Vikraman, K. **2016**. ⁶⁸Ga-PSMA PET/CT imaging in primary hepatocellular carcinoma. *European Journal Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 43(4), pp. 795–600.
79. Kesler, M., Levine, C., Hershkovitz, D., Mishani, E., Menachem, Y., Lerman H, Zohar, Y., Shibolet, O. and Even-Sapir, E. **2019**. ⁶⁸Ga-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen Is a Novel PET/CT Tracer for Imaging of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Pilot Study. *Journal Nuclear Medicine*, 60(2), pp. 185–191.
80. Tolkach, Y., Goltz, D., Kremer, A., Ahmadzadehfar, H., Bergheim, D., Essler, M., **2019**. Prostate-specific membrane antigen expression in hepatocellular carcinoma: potential use for prognosis and diagnostic imaging. *Oncotarget*, 10(41), pp. 4149–4160.

81. Navrátil, M., Ptáček, J., Šácha, P., Starková, J., Lubkowski, J., Bařinka, C. and Konvalinka, J. **2014**. Structural and biochemical characterization of the foyl-poly- γ -glutamate hydrolyzing activity of human glutamate carboxypeptidase II. *The FEBS Journal*, 281(14), pp. 3228–3242.
82. Xinqiu, L., Yunfu, L., Aihua, Y., Shanyong, Y., Yong, M. and Zongfang, L. **2010**. Gastrin-releasing peptide promotes the growth of HepG2 cells via EGFR-independent ERK_{1/2} activation. *Oncology Reports*, 24(2), pp. 441–448.
83. Lazaretti, NS. Macedo, BR, Izetti, P., Maurel, L. 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.
84. Roesler, R., Luft, T. and Schwartzmann, G. **2007**. Targeting the gastrin-releasing peptide receptor pathway to treat cognitive dysfunction associated with Alzheimer’s Disease. *Dement Neuropsychology*, 1(2), pp. 118–123.
85. O. Laukkanen, M. and Domenica, M. **2015**. Gastrin-Releasing Peptide Receptor Targeting in Cancer Treatment: Emerging Signaling Networks and Therapeutic Applications. *Current Drug Targets*, 17(5), pp. 508–514.
86. Szepeshazi, K., Schally, V., Rick, F., Block, N., Vidaurre, I., Halmos, G. and Szalontay, L. **2012**. Powerful inhibition of in-vivo growth of experimental hepatic cancers by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3940-II. *Anticancer Drugs*, 23(9), pp. 906–913.
87. Escudero-Castellanos, A., Ocampo-García, B., Ferro-Flores, G., Santos-Cuevas, C., Morales-Ávila, E., Luna-Gutiérrez, M. and Isaac-Olivé, K. **2019**. Synthesis and preclinipcal 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.
88. Bae, Y., Park, K. and Mrsny, R. **2013**. The EPR Effect in Cancer Therapy. *Cancer Targeted Drug Delivery*, pp. 621–632.
89. Morales, E., Ortiz, M., Seyedeh, M. and Amirhossei, A. **2014**. Multifunctional radiolabeled nanoparticles: strategies and novel classification of radiopharmaceuticals for cancer treatment. *Journal Drug Target*, 23(3), pp. 1–9.
90. Vilchis-Juárez, A., Ferro-Flores, G., Santos-Cuevas, C., Morales-Avila, E., Ocampo-García, B., Díaz-Nieto, L., Luna-Gutiérrez, M., Jiménez-Mancilla, N. Pedraza-López, M. and Gómez-Oliván, L. **2014**. Molecular targeting radiotherapy with Cyclo-RGDfK(C) peptides conjugated to 177Lu-labeled gold nanoparticles in tumor-bearing mice. *Journal of BiomedecinalNanotechnology*, 10(3), pp. 393–404.
91. Ocampo-García, B., Ferro-Flores, G., Morales-Avila, E. and Ramírez, F. **2011**. Kit for preparation of multimeric receptor-specific 99mTc-radiopharmaceuticals based on gold nanoparticles. *Nuclear Medicine Communications*, 32(11), pp. 1095–1104.
92. Dance, D., Christofiedes, S. and Maidment, A. **2014**. Diagnostic Radiology Physics ,A Handb Teach Students, Viena, IAEA.
93. Lee, B., Kibédi, T., Stuchbery, A. and Robertson, K., **2012**. Atomic Radiations in the Decay

- of Medical Radioisotopes: A Physics Perspective. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2012, pp. 1–14.
94. O'Donoghue J. and Wheldon, T. **1996**. Targeted radiotherapy using Auger electron emitters. *Physics in Medicine and Biology*, 41(10), pp. 1973–1992.
95. Tanaka, Y., Kimura, T., Hikino, K., Goto, S., Nishimura, M., Mano, S. and Nakagawa, T. **2012**. Gateway Vectors for Plant Genetic Engineering: Overview of Plant Vectors, Application for Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) and Multigene Construction. *Genetic Engineering - Basics, New Applications and Responsibilities*, 2012, pp. 137–164.
96. Buchegger, F., Perillo-Adamer, F., Dupertuis, Y. and Bischof, A. **2006**. Auger radiation targeted into DNA: a therapy perspective. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 33(11), pp. 1352–1363.
97. Magill, J. and Glay, J. **2005**. Radioactivity Radionuclides Radiation. Berlin/Heidelberg: *Springer-Verlag*.
98. Petriev, V., Tishchenko, V., Smoryzanova, O., Bol, N., Dufлот, V., Morozova, N. and Yakubovskaya, R. **2018**. Preclinical Evaluation of Antitumor Efficacy of a New Radiopharmaceutical Based on Thermoresponsive Carrier and Samarium-153. *Knowledge E*, 2018, pp. 375–379
99. Adachi, G., Imanaka, N. and Kang, Z. **2005**. Binary Rare Earth Oxides. Netherlands, *Springer*.
100. Binnemans, K. **2009**. Lanthanide-Based Luminescent Hybrid Materials. *Chemical Reviews*, 109(9), pp. 4283–4374.
101. Bünzli, J. **2016**. Lanthanide Luminescence: From a Mystery to Rationalization, Understanding, and Applications. *Handbook on the Physics and Chemistry Rare Earths*, 50, pp. 141–176.
102. Kalyani, N., Swart, H. and Dhoble, S. **2017**. Luminescence. In: Principles and Applications of Organic Light Emitting Diodes (OLEDs). Internet, *Elsevier*.
103. Bünzli J., and Eliseeva S. **2010**. Basics of Lanthanide Photophysics. In: Lanthanide Luminescence, Berlin, 7, *Springer*.
104. Leonard J., Nolan, C., Stomeo, F. and Gunnlaugsson, T. **2007**. Photochemistry and photophysics of coordination compounds: Lanthanides. *Topics in Current Chemistry*, 281, pp. 1–43.
105. Cotton, S. **2006**. Electronic and Magnetic Properties of the Lanthanides. In: Lanthanide and Actinide Chemistry Chichester, UK, *John Wiley & Sons*.
106. Stephan, M., Zachau, M., Gröting, M., Karplak, O., Eyert, V., Mishra, K. and Schmindt, P. 2005. A theoretical investigation of 4f→5d transition of trivalent rare earth ions in fluorides and complex oxides. *Journal of Luminescence*, 114(3–4), pp. 255–266.
107. Vogler, A., and Kunkely, H. **2006**. Excited state properties of lanthanide complexes: Beyond ff states. *Inorganica Chimica Acta*, 359(12), pp. 4130–4138.
108. Ghosh, P., Kundu, S., Kar, A., Ramanujachary, K., Lofland, S. and Patra, A. Synthesis and characterization of different shaped Sm₂O₃ nanocrystals. *Journal of Physics D*, 43(40), pp.

405401.

109. Nguyen, T., Mrabet, D., Do, T. 2008. Controlled Self-Assembly of Sm_2O_3 Nanoparticles into Nanorods : Simple and Large Scale Synthesis using Bulk Sm_2O_3 Powders. *The Journal of Physical Chemistry C*, 112, pp. 15226–15235.
110. Shiri HM, Ehsani A, Khales MJ. Electrochemical Synthesis of Sm_2O_3 Nanoparticles: Application in Conductive Polymer Composite Films for Supercapacitors. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2017;505(1):940–6.
111. Seong-Hoon, K., Ho-Suk, C. and Kwang-Deog, J. 2016. Synthesis of cubic In_2O_3 by liquid plasma method without chemical additives. *Cryst Growth and Desing*. 16(3), pp. 1387–1394.
112. Salinas, B. 2014. Síntesis y funcionalización covalente de nanopartículas superparamagnéticas para imagen biomédica. [Tesis] Universidad complutense de Madrid.
113. Hu, J., Li, Q., Meng, X., Lee, C., Lee, S. 2003. Thermal Reduction Route to the Fabrication of Coaxial Zn/ZnO Nanocables and ZnO Nanotubes. *Chemical Materials*, 15(1), pp.305–308.
114. Goldys, E., Drozdowicz-tomsia, K., Jinjun, S., Dosev, D., Kennedy, I., Yatsunenko, S. and Godlewski, M. 2006. Optical Characterization of Eu-Doped and Undoped Gd_2O_3 Nanoparticles Synthesized by the Hydrogen Flame Pyrolysis Method. *Journal of The American Chemical Society*, 128(2), pp. 14498–14505.
115. Trommer, R. and Bergmann, C. **2015**. History of Flame Spray (FS) Technique. In: Flame spray Technology Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering. Berlin, *Springer-V*.
116. Uusija, H, Bernhardt, P., Ro, F., Maecke, H. and Forssell-aronsson, E. 2006. Electron- and Positron-Emitting Radiolanthanides for Therapy: Aspects of Dosimetry and Production Helena. *Journal of Nuclear Medicine*, 47(5), pp. 807–814.
117. Chain, Y. and Illanes, L. **2015**. Radiofármacos en medicina nuclear Fundamentos y aplicación clínica. España, *Editorial de la Universidad de la Plata*.
118. Nairne, J., Iveson, P., Meijer, A. **2015**. Imaging in Drug Development. *Progress in Medicinal Chemistry*, 54, pp. 231–280.
119. Liu, P., Wang, Y., Wang, X., Yang, C., Yi, Y. **2012**. Polypyrrole-coated samarium oxide nanobelts: fabrication, characterization, and application in supercapacitors. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(11), pp. 1232-1241.