

Tesis de Posgrado

Estudios de terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) en un modelo experimental de cáncer oral

Kreimann, Erica Lorena

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Kreimann, Erica Lorena. (2002). Estudios de terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) en un modelo experimental de cáncer oral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3446_Kreimann.pdf

Cita tipo Chicago:

Kreimann, Erica Lorena. "Estudios de terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) en un modelo experimental de cáncer oral". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3446_Kreimann.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ciencias Biológicas

**“ ESTUDIOS DE TERAPIA POR CAPTURA
NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE CÁNCER ORAL ”**

Autor: Lic. Erica Lorena Kreimann

Director: Dra. Amanda E. Schwint

Lugar de trabajo: División Patología de la Radiación, Departamento de
Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Año 2002

Nº 3 4 4 6 4

ESTUDIOS DE TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER ORAL

Resumen

La Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) es una modalidad terapéutica binaria que involucra la acumulación selectiva de portadores de ^{10}B en el tumor y la subsiguiente irradiación con un haz de neutrones. Las partículas de alta transferencia lineal de energía que se producen durante la reacción de captura de un neutrón térmico por el núcleo de boro tienen un rango de aproximadamente 5-9 μm y una alta eficacia biológica relativa. Así, el BNCT dañaría selectivamente las células tumorales. Esta terapia se encuentra en etapa de ensayo clínico en el mundo para tumores de cerebro y melanoma. Dentro del marco de la búsqueda de nuevas aplicaciones para BNCT, el estudio de la biología y radiobiología del BNCT, la búsqueda de nuevos compuestos borados y la evaluación de la respuesta del tejido tumoral, precanceroso y normal hemos propuesto el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster para estudios de BNCT. Los estudios de biodistribución y farmacocinética en este modelo de un compuesto borado tradicional y uno de última generación demostraron la incorporación selectiva de boro al tumor en cantidades potencialmente terapéuticas. Un estudio de BNCT in vivo demostró por primera vez el éxito de esta terapia en el tratamiento del cáncer oral sin daño al tejido normal.

Abstract

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) is a binary treatment modality that involves the selective accumulation of ^{10}B carriers followed by irradiation with a neutron beam. The high linear energy transfer particles emitted during the capture of a thermal neutron by a ^{10}B nucleus have a range of approximately 5-9 μm in tissue and are known to have a high relative biological effectiveness. Thus, BNCT would potentially target neoplastic tissue selectively. Clinical trials of BNCT for the treatment of brain tumors and melanoma are underway in the world. Within the context of the search for new applications of BNCT, the study of the biology and radiobiology of BNCT, the assessment of new boron compounds and the evaluation of the response of tumor, precancerous and dose-limiting normal tissues we have proposed the hamster cheek pouch oral cancer model for BNCT studies. The biodistribution and pharmacokinetic studies of a traditional and a new boron compound in this model evidenced potentially therapeutic, selective, incorporation of boron to tumor tissue. An in vivo study demonstrated, for the first time, the success of BNCT in the treatment of oral cancer with virtually no damage to normal tissue.

*Mas vale que no tengas que elegir
Entre el olvido y la memoria
Entre la nieve y el sudor
Será mejor que aprendas a vivir
Sobre la línea divisoria
Que va del tedio a la pasión*

J. S.

A mis Padres

A mi hermano Alejandro

A Paul

Agradecimientos

A Mandy mi directora, por guiarme hacia la concreción de este trabajo de tesis, por su ayuda incondicional, su apoyo constante y su gran capacidad profesional. Por su inquebrantable fuerza y optimismo aún en los momentos más difíciles. Por haberme aceptado tal cual soy y haberme brindado la oportunidad de acercarme a ella en las buenas y en las malas. Por compartir con toda generosidad un proyecto personal conmigo.

A Ricardo Garavaglia, una gran persona y un excelente profesional. Por su enorme colaboración y esfuerzo en todo momento que lo necesité.

A la Dra. Mariel Itoiz, porque desde el principio nos brindó su apoyo, su consejo y su imprescindible ayuda profesional.

A Alejandra Dagrosa, mi compañera de los primeros años, por sus risas y por todas las experiencias compartidas.

Al Dr. Mario Pisarev, porque siempre sentí su aprobación y porque él estuvo de acuerdo en darme la oportunidad de trabajar en este proyecto.

A la Dra. Sara Liberman, porque creyó en que un proyecto de estas características podía llevarse a cabo en nuestro país y por brindar su apoyo firme a la ciencia básica.

Al Dr. Jeff Coderre del Brookhaven National Laboratory y más recientemente del Massachusetts Institute of Technology, EE.UU., por su invaluable colaboración y apoyo a nuestro proyecto.

A la Dra. Michiko Miura por proveer el compuesto borado CuTCPh empleado en los estudios de biodistribución.

A todos los profesionales que colaboraron con toda su experiencia, su calidez humana y expertez en este trabajo de tesis. Al Dr. Batistoni y su grupo de Química Analítica. A Osvaldo Calzetta, Herman Blaumann, y Juan Longhino del Centro Atómico Bariloche. Al Dr. Andrés Kreiner. Al Dr. Cabrini porque lo voy a extrañar. A Sarita y Gustavo. Al grupo de profesionales y técnicos del RA-1.

A todas aquellas personas que con una palabra de aliento, una sonrisa, un gesto me demostraron su apoyo e hicieron que el trabajo profesional se desarrollara en un clima distendido y afectuoso y siempre me brindaron su ayuda: A Mónica, Deborah, Eugenia y sus cafecitos, Ma. Teresa, Anita, Javier porque es un genio, Giselle, Omar, Daniel, Ramón, María, Alejandro.

A Silvi por ser mi amiga, por todos los momentos compartidos y por escucharme siempre y darme sus consejos.

A la Dra. Beatriz Molinari porque supo escucharme cuando la necesité y por los lindos momentos y alegrías que compartimos con sus anécdotas.

Al grupo de Bioquímica Nuclear: A Guillermo, Gaby, Marcos, David, León, Pablo, Mabel y Soria.

A mi hermano Alejandro porque sin él nada de esto se hubiera realizado.

A mi mamá que me escuchó, me dio sus consejos, porque siempre la sentí cerca mío y porque la quiero un montón.

A Candelaria, Camila y Malena porque me alegran la vida y las adoro.

A Alejandra y su familia, gracias por todo.

A Pablo por darle a esta historia el final más feliz.

A Fernando Sánchez y su familia, por su enorme calidez humana que nunca voy a olvidar.

ÍNDICE

PALABRAS PRELIMINARES	1
1. ANTECEDENTES	
1.1. Terapia por Captura Neutrónica en Boro: Fundamentos y Descripción	2-6
1.2. Estudios Clínicos	6-10
1.3. Compuestos de Boro	10-12
a) BPA y BSH	12-15
b) Nuevos Compuestos Borados	16-19
1.4. Neutrones Térmicos	20-21
1.5. Radiobiología del BNCT	22-27
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. Modelo de Cáncer Oral para Estudios de BNCT: Carcinogénesis en la Bolsa de la Mejilla del Hámster	28-37
2.2. Estudios de Biodistribución y Biocinética de compuestos Borados en distintos modelos experimentales	38-41
2.3. Estudios de BNCT en distintos modelos experimentales	42-45
2.4. Evaluación de la respuesta del tejido tumoral y de los tejidos normales al BNCT	46-49
2.5. Análisis de Boro	49-50
3. OBJETIVOS	51-52
3.1. Estudios preliminares de BNCT en ratas Fischer portadoras de glioblastoma	
3.2. Estudios de BNCT en el modelo de Cáncer oral en la Bolsa de la mejilla del Hámster	

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Técnicas de inyección en Hámster (<i>Mesocricetus auratus</i>) y Rata	53
4.2. Técnicas de anestesia en Hámster y Rata	53-54
4.3. Cultivo de células tumorales de Glioblastoma F-98 (Rata Fischer)	54
4.4. Implantación de células tumorales F-98 en cerebro de Rata Fischer	55-56
4.5. Cultivo primario de células de la Glía normal de Rata	56
4.6. Inducción de Tumores en la Bolsa de la Mejilla del Hámster	57
4.7. Estudios de Biodistribución y Biocinética	
a) Ácido Bórico	57
b) BPA-F	58
c) Carboraniltetrafenilporfirina borada (CuTCPH)	59
4.8. Análisis de Boro: Espectroscopía de Emisión Atómica por Plasma Inductivo, ICP-AES (modelo ICP Optima 3100 XL, UV, axial)	60-66
a) Determinación de Boro en tejido	66-67
b) Determinación de Boro en sangre	67-68
4.9. Detección de rayos Gamma Rápidos Inducidos por la Reacción Nuclear (Particle Induced Gamma Emission ó PIGE) para la determinación de Boro en muestras biológicas	68-69
4.9.1. Análisis de la incorporación de BPA-F a las áreas viables y necróticas de muestras de tumores	69-70
4.9.2. Análisis Estadístico	70
4.9.3. Tratamiento de Tumores de la Bolsa Facial de Hámster por BNCT	
a) Puesta a punto de un sistema de irradiación para modelos Biológicos en el RA-6 (CAB)	71-72
b) Estudios de BNCT en el RA-1 (CAC) a bajo flujo de neutrones	72-74
c) Estudios de BNCT en el RA-6 (CAB)	74-77

5. ESTUDIOS PRELIMINARES: RESULTADOS

5.1. RATAS FISCHER

a) Cultivo de células de la Glía normal y Glioblastoma F-98	78
b) Implantación de células tumorales en cerebro de Rata Fischer	78-82
c) Concentración de Boro en tejidos de Rata inyectadas con Ácido Bórico.	82

5.2. HÁMSTER

a) Estudios de Biodistribución con BPA-F	83
b) Puesta a punto del sistema de irradiación para modelos biológicos en el RA-6 del Centro Atómico Bariloche (CAB)	84
c) Detección de ^{10}B en muestras biológicas utilizando la técnica de PIGE (particle induced gamma ray emission)	85

6. RESULTADOS

6.1. ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN Y FARMACOCINÉTICA EN TUMORES DE LA BOLSA DE LA MEJILLA DEL HÁMSTER

a) Estudios de Biodistribución y Farmacocinética con BPA-F	86-95
b) Heterogeneidad tumoral con respecto a la captación de Boro	95-98
c) Estudios de Biodistribución y Biocinética con un compuesto nuevo: Carboraniltetrafenilporfirina borada (CuTCPh)	99-105
d) Estudio comparativo de dos compuestos de Boro: CuTCPh y BPA-F	106-109

6.2. ESTUDIOS DE BNCT EN TUMORES DE LA BOLSA DE LA BOLSA DEL HÁMSTER (RA-6, CAB)

a) Respuesta del tejido tumoral y normal al BNCT	110-122
b) Análisis Histológico	122-131
c) Seguimiento del peso corporal de los animales tratados con BNCT	131-135

7. DISCUSIÓN

136-146

8. CONCLUSIONES

147-148

9. REFERENCIAS

149-177

PALABRAS PRELIMINARES

El presente trabajo consiste en el estudio de la Captura Neutrónica en Boro (BNCT), una terapia de frontera para el cáncer, en un modelo de cáncer oral que es original para el estudio de esta técnica. Se encaró así el estudio de la biología y radiobiología de esta terapia y se evaluó una nueva aplicación de la misma al cáncer oral a nivel experimental.

El estudio de ésta técnica involucra claramente un proyecto de investigación multidisciplinario que incluye las áreas de biología, radiobiología, medicina, física, física médica, química, dosimetría, reactores nucleares y aceleradores. El eje del presente trabajo se centra sobre aspectos biológicos y radiobiológicos pero que lleva implícito los aportes de los expertos en las diferentes áreas que han colaborado en este proyecto. A cada uno de ellos, queremos expresar nuestro reconocimiento.

1. ANTECEDENTES

1. 1. TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO: FUNDAMENTOS Y DESCRIPCIÓN

La captura neutrónica en boro como terapia para tumores (Boron Neutron Capture Therapy o BNCT) es una modalidad de tratamiento binario que se encuentra en etapa de ensayo clínico en distintos centros del mundo para el tratamiento de tumores de cerebro y melanoma. Su objetivo es dañar selectivamente el tejido neoplásico. Cada componente por separado es inocuo para las células normales de mamífero y puede ser manipulado en forma independiente pero su combinación genera un efecto letal en el tejido tumoral con escaso daño al tejido normal (Barth R. F. y col. , 1990) (Fig. 1).

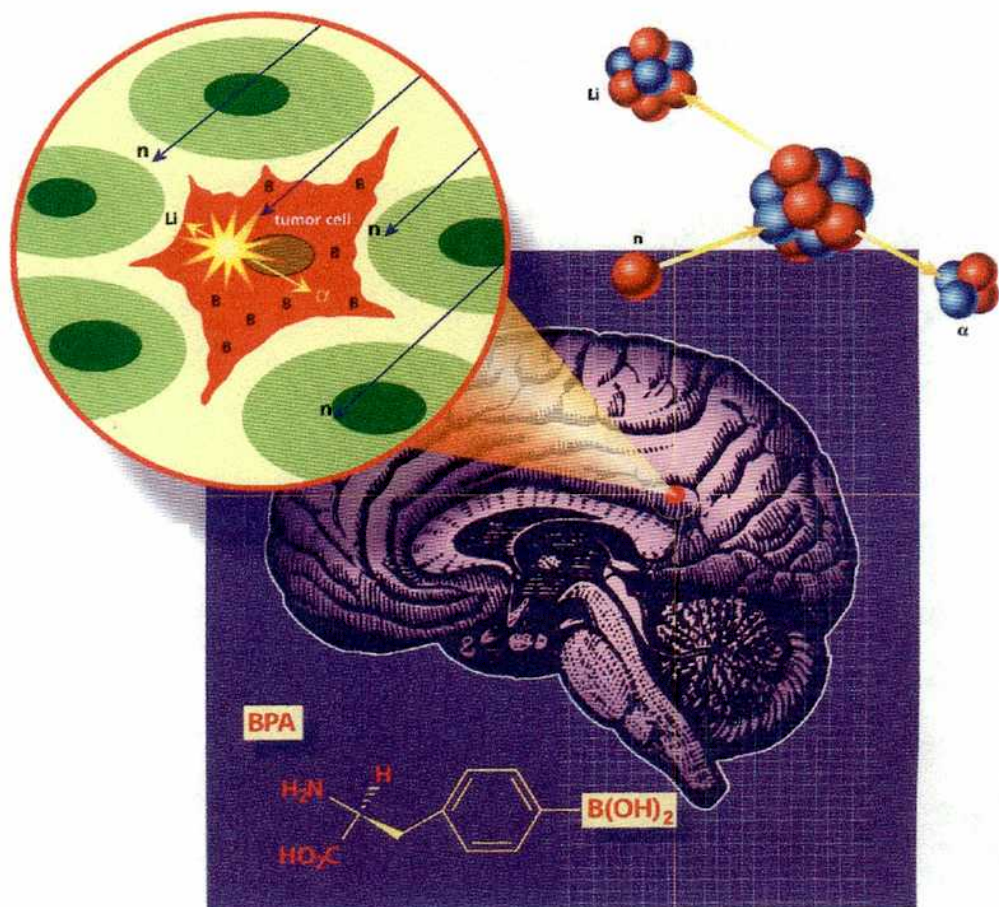


Fig. 1: Secuencia de eventos que se producen durante la terapia de BNCT para el tratamiento de tumores de cerebro.

La terapia de BNCT se basa en el concepto publicado por primera vez por Gordon Locher en 1936 (Locher G. L. y col. , 1936). El isótopo estable del boro, ^{10}B , interactúa con neutrones de baja energía (neutrones térmicos, $<0.4\text{eV}$) desencadenando una reacción de captura en la que se escinde el átomo de ^{10}B generando una partícula alfa (^4He) y un núcleo de ^7Li de alta transferencia lineal de energía (LET) y de rango corto 5-10 μm (Taylor H. J. y col. , 1935) (Fig. 2).

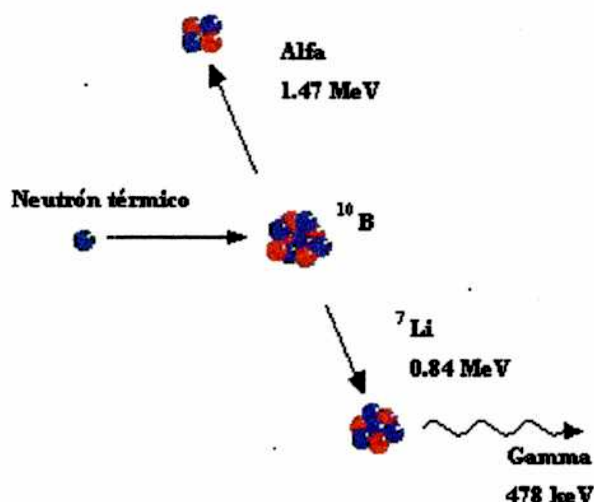


Fig. 2: Reacción nuclear producida por la captura del neutrón térmico por el ^{10}B .

Estas partículas de alto LET son suficientes para matar o esterilizar las células donde se produce la reacción. Asimismo, el corto alcance de dichas partículas limitaría el daño a las células normales en las cuales no se produce (ó se produce en mucho menor grado) la reacción de captura. El LET es una medida de la densidad de las ionizaciones producidas cuando una radiación interactúa con el tejido. A mayor LET habrá más cantidad de ionizaciones y por lo tanto mayor daño. Dentro de este contexto, las partículas de alto LET serán más eficientes en producir daño que la radiación de bajo LET como los rayos X ó gamma usados normalmente en radioterapia.

Los dos componentes, el boro y los neutrones térmicos, se combinan solamente en el momento oportuno para obtener el mayor efecto citotóxico en las células malignas, depositando una dosis no tóxica en las células normales

contiguas. La estrategia de la terapia consiste en administrar compuestos borados que sean incorporados selectivamente a las células tumorales y cuyo contenido en las células normales y en sangre sea significativamente menor. De ésta manera la reacción de captura se producirá preferentemente en las células tumorales generando partículas letales de alta transferencia lineal de energía y corto rango que dañarían las células tumorales con escaso daño al tejido normal.

Para que el BNCT sea exitoso se deben localizar un gran número de átomos de ^{10}B (aproximadamente 10^9 átomos/célula) en las células neoplásicas (alrededor de 30 μg /gramo de tejido) y un número suficiente de neutrones térmicos deben ser absorbidos por los átomos de ^{10}B para desencadenar la reacción letal $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$. (Barth R. F. y col., 1990). Es esencial que al menos uno de los componentes sea confinado específicamente en la célula tumoral mientras que el otro componente – haz de neutrones- atraviesa todas las células de un área en particular. De este modo, saber a priori la localización de las células tumorales no es necesario para llevar a cabo su destrucción.

En el caso de los tumores de cerebro, el BNCT se aplica una vez que la mayor parte de la masa tumoral ha sido extraída por cirugía. Dada la importancia de conocer el contenido de boro para realizar los cálculos dosimétricos previos al BNCT, es conveniente realizar un estudio de biodistribución del compuesto borado en el momento de la cirugía. Este estudio consiste en administrar por infusión intravenosa el compuesto borado. Desde el momento en que comienza la infusión hasta varias horas luego de la operación, se toman muestras de sangre para realizar el análisis de la concentración de boro. También se analizan muestras de tejido (tumor y si es posible tejido normal) obtenidas en el acto quirúrgico. Estos datos permiten determinar la cantidad absoluta de boro en dichos tejidos y las relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre para luego calcular la dosis que se entregará al tumor y al resto de los tejidos durante el BNCT. Aproximadamente 2-3 semanas post-cirugía se realiza el BNCT, para lo cual se administra el compuesto borado y se realiza la irradiación con el haz de neutrones en el momento óptimo para lograr la mayor cantidad absoluta de boro en el tumor y las mejores relaciones con respecto a los tejidos normales y a la sangre.

Es importante destacar que cuando se practica el BNCT (en los tumores cerebrales), la masa tumoral ha sido extirpada y el tratamiento está dirigido al tejido residual. Como se trata de un sistema binario, es importante monitorear en todo momento el aporte de cada uno de los componentes que van a contribuir a la dosis. En el caso de los neutrones, esto se realiza controlando el flujo y tiempo que dura la irradiación teniendo en cuenta la cantidad de boro. En el caso del boro es más complicado. La cantidad de boro en sangre puede ser medida, ya que se toman muestras de la misma durante la irradiación, y sobre la base de esto se regula la cantidad de neutrones entregada. En el caso de los tejidos es más difícil, pues no se pueden tomar muestras de tejido tumoral durante la irradiación y tampoco se puede hacer un muestreo de los tejidos normales. Lo que se hace en este caso es considerar que las concentraciones de boro en los tejidos son iguales a las obtenidas en los estudios de biodistribución previos. Para esto se asume que las células tumorales remanentes que no fueron extirpadas en la cirugía captarían la misma cantidad de boro que las células tumorales de la masa tumoral. Existen varios estudios tendientes a determinar si esta presunción resulta cierta (Smith D. R. y col. , 2001).

Existen diversos sistemas binarios que se encuentran en varios estadios de desarrollo. Estos incluyen el uso de radiosensibilizadores (Kennedy K. A. y col. , 1987), terapia de activación por fotones (Amaldi U. y col. , 1994; Laster B. H. y col. , 1993), terapia fotodinámica (Diamond I. y col. ,1972), y terapia génica (Caruso M. y col. , 1996). La iniciativa de desarrollar nuevos métodos para el tratamiento del cáncer ha surgido como una respuesta a los limitados resultados que se han obtenido con las terapias existentes. En la mayoría de los tumores sólidos, la extirpación quirúrgica del tejido transformado es el método de elección. Sin embargo existe siempre una incerteza inherente a focos de recurrencia originados por células tumorales que no fueron debidamente removidas. La clara dificultad en desarrollar terapias contra el cáncer resulta de la necesidad de destruir dichas células selectivamente sin comprometer las células normales de las cuales ellas derivan como así también otras células que son esenciales para la homeostasis normal. La cirugía sola no es capaz de cumplir con dicho objetivo terapéutico y por esta razón debe ser usada en combinación con radioterapia convencional y quimioterapia. En el caso de la radioterapia, la dosis requerida para destruir las células cancerosas es de tal magnitud que el tejido normal circundante puede verse seriamente

comprometido (Sano K. 1986). Similarmente, en el caso de la quimioterapia, el efecto de la droga no está confinado a las células tumorales. Una vez más la dosis administrada está limitada a la tolerancia del tejido normal (Kornblith P. L. y col. , 1988). Un problema adicional es que no es posible revertir algunos efectos tóxicos producidos por la radiación y/o quimioterapia.

En esencia el BNCT es una terapia radiante cuyo objetivo es erradicar las células tumorales (aún aquellas cuya localización no es completamente conocida) con escaso daño al tejido normal. El fundamento de la técnica sería su selectividad biológica basada sobre la acumulación preferencial de los compuestos borados en el tumor. Su ventaja terapéutica potencial permitiría eliminar todas las células tumorales, evitando así el desarrollo de focos de recurrencia.

1. 2. ESTUDIOS CLÍNICOS

Los ensayos clínicos de la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) fueron iniciados en el año 1951 en el Brookhaven National Laboratory (BNL) (EE.UU.) por Sweet y col. (Sweet W. H. y col. , 1951) Javid y col. (Javid M. y col. , 1952) y Farr y col. , (Farr L. E. y col. , 1954a; Farr L. E. y col. , 1954b; Farr L. E. y col. , 1954c) para el tratamiento de tumores cerebrales usando borax como transportador de boro. Estos ensayos clínicos finalizaron en el año 1961 cuando el programa de NCT en EE.UU. fue interrumpido luego del tratamiento de 17 pacientes portadores de glioblastoma en el Massachusetts Institute of Technology en 1960-1961 pues este estudio arrojó resultados desalentadores (Sweet W. E. y col. , 1963) y los efectos secundarios del tratamiento fueron severos. Se observó edema cerebral agudo, fibrosis perivascular y especialmente la aparición de necrosis cerebral a los pocos meses luego del tratamiento (Asbury A. K. y col. , 1972; Farr L. E. y col. , 1961). Puede encontrarse un resumen de los ensayos clínicos en EE.UU. en un trabajo publicado por Slatkin (Slatkin D. N. y col. , 1991; Slatkin D. N. y col. , 1986) donde también se analizan exhaustivamente las posibles razones por las cuales dichos programas no fueron exitosos. Brevemente, las razones radicarón en la falta de selectividad de los compuestos borados y la escasa penetración de los haces de neutrones.

Los trabajos en BNCT fueron reanudados posteriormente en el año 1968 en la Teikyo University (Japón) por el Dr. H. Hatanaka, con una modificación del protocolo empleado por Sweet en los años 1960-1961. Se introdujo el mercaptoundecahydrododecarborato ó BSH como compuesto portador de boro. La droga fue inyectada directamente en una arteria que irrigaba al tumor. Además los pacientes recibieron altas dosis de corticosteroides, lo cual no fue posible en los estudios en EE.UU. El tratamiento en el reactor fue realizado con radioterapia intraoperativa. En una primera etapa se extirpó la masa tumoral. En una segunda etapa se realizó la irradiación con neutrones térmicos a calota abierta, exponiendo el sitio del tumor directamente al haz, mientras que se blindaron otras partes de la cabeza (Hatanaka H. y col. , 1986; Hatanaka H. y col. , 1990). Entre los años 1968 y 1992, se trataron 120 pacientes con 119 tumores intracraniales y un paciente con un tumor extracranial. Los resultados del grupo del Hatanaka hasta 1994 fueron muy alentadores. Se obtuvo un índice de supervivencia de 5 años en un 58% de los pacientes portadores de glioma grado 3-4 si el tumor estaba localizado a menos de 6 cm de profundidad (Hatanaka H. y col. , 1991; Hatanaka H & Nakagawa Y., 1994).

En el año 1987 el Dr. Mishima y sus colaboradores comenzaron una exitosa experiencia de BNCT para el tratamiento de melanomas (Mishima Y. y col. ,1989). Las primeras experiencias clínicas fueron realizadas por el Dr. Y. Mishima y colaboradores en Japón, utilizando como portador de boro el compuesto borofenilalanina (BPA). Este compuesto es un análogo del precursor natural del pigmento melanina y por lo tanto se incorpora a las células que sintetizan el mismo. De un total de 20 pacientes tratados se obtuvo la curación completa en 15 (75%), respuesta parcial en 4 y falta de respuesta en uno (Ichihashi M. y col. , 2000). El mismo grupo trató 4 casos de melanoma facial, de difícil tratamiento quirúrgico, con control completo en todos ellos (Fukuda H. y col. , 2000). Por su parte, el grupo de Harvard-MIT ha tratado hasta el presente 4 pacientes con melanomas de las extremidades, logrando una respuesta completa en 2 y una parcial en los otros 2 (Busse P., comunicación personal).

Paralelamente al programa iniciado en Japón utilizando BPA para el tratamiento de melanomas, se reanudaron los ensayos clínicos en los EE.UU.

auspiciados por el Departamento de Energía y aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de glioblastoma multiforme utilizando un haz epitérmico (ver Antecedentes, sección 1.4) con aumento progresivo de la dosis de radiación (Roberston J. S. y col. , 1989).

El glioblastoma multiforme (GBM) es un tumor sumamente agresivo e infiltrativo en los tejidos circundantes, aunque no produce metástasis a distancia. Los tratamientos actuales incluyen la cirugía, seguida por radio o quimioterapia. Debido a su alta capacidad infiltrativa la cirugía no logra la extirpación del total de las células tumorales y dada su resistencia a los tratamientos complementarios, se produce generalmente la recidiva del tumor. La sobrevida promedio de estos pacientes no sobrepasa los 12 meses y la calidad de vida dista de ser óptima, dada la necesidad de los tratamientos complementarios a lo largo de ese período.

El objetivo de los ensayos clínicos fase I/II realizados en EE.UU. fue el de determinar la tolerancia del tejido normal circundante al tumor, y solo secundariamente evaluar en esta etapa la eficacia del tratamiento. Un primer grupo de 38 pacientes con GBM fue tratado con cirugía seguida de BNCT, utilizando BPA como dador de boro. No se observó daño significativo en el tejido cerebral normal luego de la administración de una dosis de radiación de 8,9-14,8 Gy-eq en los 7 pacientes en los que se practicó la autopsia. Si bien 25 de los pacientes fallecieron, el promedio de sobrevida, en un protocolo que no pretendía tratar el tumor como objetivo principal, fue de 13 meses, similar a lo que se logra con los tratamientos estándar. Debe remarcarse que esta forma de terapia se aplica una sola vez y que esto contribuye a la mejor calidad de vida de los pacientes (Chanana A. D. y col. , 1999).

El tratamiento de tumores malignos de cerebro se encuentra en ensayo clínico Fase I/II en Europa. El grupo de la comunidad europea que opera el reactor de Petten (Holanda) comenzó sus tareas en 1997 con la participación de Holanda, Alemania, Francia, Austria y Suiza. Se trata de un estudio Fase I con BSH, que incluye 40 pacientes que se están tratando con BNCT luego de la cirugía del GBM. Se evalúa la radiotoxicidad y sobrevida. Este protocolo ha sido aprobado por las autoridades de los respectivos países y cuenta con el aval de la European Organization for the Research and Treatment of Cancer ó EORTC (Gabel D., y col

1997; Sauerwein W. y col. , 2002; Sauerwein W. y col. , in press). También se han iniciado estudios de Fase I/II en Finlandia (Kankaanranta L. y col. , 2000) y a partir de 2001 en Checoslovaquia y Suecia para establecer la seguridad y posteriormente, la eficacia del tratamiento. Los programas clínicos en BNL y Massachusetts Institute of Technology (MIT) (Busse P. M. y col. , in press) terminaron en la primavera de 2000. En la actualidad el grupo MIT-Harvard ha modificado el haz de neutrones de su reactor mediante la construcción del "Fisión Plate Converter" ó Placa de Fisión para optimizar las irradiaciones y se prevé comenzar a tratar pacientes a principios de 2002. En Japón se utiliza el BNCT intraoperativo empleando neutrones térmicos y recientemente un haz compuesto por un mezcla de neutrones térmicos y epitérmicos como tratamiento para glioblastoma multiforme y melanoma periférico y metastásico a cerebro (Hatanaka H. y col. , 1994; Ono K. y col. , 1997; Matsumura A. y col. , 1997; Chanana A. D. y col. , 1999).

Los resultados de los ensayos clínicos hasta la fecha son alentadores pero no concluyentes. La comunidad científica internacional está haciendo grandes esfuerzos para contribuir a mejorar la ganancia terapéutica de éste tratamiento. El esfuerzo está dirigido principalmente a entender la biología y la radiobiología del BNCT, desarrollar nuevos compuestos borados que sean más selectivos en cuanto a su incorporación a tumor, optimizar los haces de neutrones y los cálculos dosimétricos y microdosimétricos. Se intenta explorar nuevas aplicaciones del BNCT para lo cual se ha propuesto el tratamiento de diferentes neoplasias como otros tumores de cerebro (astrocitomas, meningiomas), metástasis a cerebro de melanoma y de tumores de pulmón, mama y riñón, otros cánceres de piel además del melanoma, de glándulas salivales, de próstata y carcinoma de células escamosas de la cavidad oral, laringe e hipofaringe (Busse P., comunicación personal).

La búsqueda de nuevas aplicaciones de BNCT debería estar dirigida a entidades que potencialmente pudieran beneficiarse de la ventaja terapéutica de ésta técnica y cuyo tratamiento convencional no sea satisfactorio. En éste sentido el tratamiento convencional de los tumores de cabeza y cuello (cirugía, radioterapia y/o quimioterapia) no ha logrado mejorar la sobrevida de 52% a 5 años. Asimismo, las cirugías son frecuentemente extremadamente mutilantes y las recurrencias abundantes. Así, éstos tumores podrían beneficiarse con terapias alternativas

(Smith B. D. y col. , 1999; Khuri F. R. y col. , 1997; Khono N. y col. , 1996; Kamata S. y col. , 1996; Kastenbauer E. y col. , 1999; Fu K. K. y col. , 1996). En éste marco, el modelo de carcinogénesis en la bolsa de la mejilla del hámster como modelo de cáncer oral contribuiría a abordar, desde el punto de vista experimental, el análisis de una nueva aplicación de BNCT.

1. 3. COMPUESTOS DE BORO

El concepto de NCT (Neutron Capture Therapy) se basa en la observación de que ciertos nucleídos - radioactivos y no radioactivos- poseen una capacidad inusual de absorber neutrones térmicos (Locher G. L., 1936). Esta capacidad se describe en términos cuantitativos como la Sección Eficaz de dicho átomo (Friedlander G. y col. , 1981). La capacidad de generar reacciones de captura aumenta con la sección eficaz.

Existen varios nucleídos como el ^6Li , ^{10}B , ^{157}Gd , ^{235}U entre otros, que poseen alta sección eficaz. En la mayoría de los casos la sección eficaz es de al menos 2 órdenes de magnitud mayor que las secciones eficaces de los componentes elementales normales de los tejidos lo cual permitiría una captura preferencial por dichos átomos. Además de esta característica, existen otras variables que se consideran cuando se selecciona un nucleído para su uso en NCT tales como: su toxicidad, los productos de fisión generados en la reacción de captura y las propiedades de los compuestos potencialmente portadores de dicho nucleído.

Durante los primeros desarrollos en el área de NCT se consideró al ^{235}U radioactivo como un posible nucleído (Frigerio N. A. y col. , 1958; Knock F. E. 1959; Bases R. E., 1957). Los productos de fisión eran adecuados pero en general los compuestos del uranio son tóxicos y además poco estables en medios biológicos (Ej.: Uranyl protoporfirin).

Otro nucleído considerado fue el ^6Li no radioactivo (Zahl P. A. y col. , 1940; Zahl P. A. y col. , 1941). Las partículas de alto LET generadas eran del rango y energía suficiente para destruir una célula. La mayor limitación fue que al ser un

metal alcalino el ^6Li en condiciones biológicas se escinde inmediatamente en cationes de Litio.

El ^{10}B no radioactivo utilizado en BNCT es similar al ^6Li en cuanto a los productos de fisión (Kruger P. G. y col. , 1940; Sweet W. H. y col. , 1951). Una clara ventaja del ^{10}B comparado con otros nucleídos, además de sus productos de fisión, es que a partir de él se pueden sintetizar una gran cantidad de compuestos borados debido a las uniones estables que se producen entre los átomos de boro y otros elementos como el carbono, oxígeno y nitrógeno. Su pequeño número atómico le permite reemplazar al carbono en muchas estructuras orgánicas y formar uniones covalentes con heteroátomos que pueden ser muy estables como los carboranos presentes en varios compuestos de boro. Por éstas razones, el ^{10}B fue seleccionado para desarrollar numerosos compuestos portadores de ^{10}B para su uso en BNCT.

Para que el BNCT sea potencialmente exitoso se deben cumplir las siguientes premisas respecto del compuesto borado:

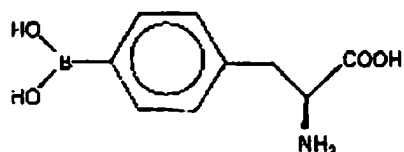
- Debe tener baja toxicidad de modo que a la dosis administrada sea bien tolerado en animales y eventualmente en pacientes.
- El compuesto debe ser un portador eficiente de átomos de boro.
- La cantidad absoluta de átomos de boro incorporada al tumor debe ser suficiente para producir las reacciones de captura con neutrones térmicos necesarias para dañar el tumor (se considera necesaria la incorporación de $30\text{ }\mu\text{g}^{10}\text{B/g}$ ó 30 ppm).
- La incorporación de compuesto borado al tumor debe ser selectiva para lograr dañar el tejido tumoral minimizando el efecto en tejido normal. Se ha demostrado que la relación tumor/tejido normal y tumor/sangre debe ser del orden de 3:1 (Soloway A. H. y col. , 1967)

Hasta el presente pocos compuestos de boro han sido aceptados para su uso en tratamientos clínicos. Inicialmente los tratamientos se llevaron a cabo usando borax, pentaborato y ácido bórico (Farr L. E. y col. , 1954b; Farr L. E. y col. , 1954c; Locksley H. B. y col. , 1955). La falta de éxito de estos ensayos se debió en parte a que la selectividad y permanencia en tumor del compuesto borado no eran adecuadas. El ulterior desarrollo de compuestos tuvo como objetivo una mayor

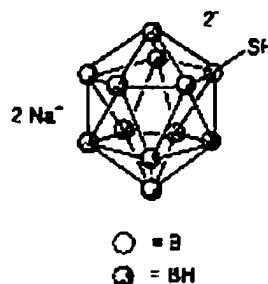
incorporación y permanencia del compuesto en el tumor en contraste con los niveles en el tejido normal y la sangre.

Solo dos compuestos desarrollados posteriormente fueron aprobados para su uso en pacientes: borofenilalanina (BPA) y mercaptoundecahydrododecarborato (BSH). El BSH ha sido usado por Hatanaka y Nakagawa en Japón (Hatanaka H. y col. , 1991; Nakagawa Y. y col., 1997) y en este momento es usado en los ensayos clínicos en Europa. El BPA comenzó a ser usado en EE.UU. en Brookhaven National Laboratory en New York (Coderre J. A. y col. , 1997) y luego fue usado en el Beth Israel-Deaconess Hospital/Massachusetts Institute of Technology en Boston, MA (Busse P. y col. , 2000).

1. 3. a) BPA y BSH



BPA



BSH

El BPA es un derivado del aminoácido fenilalanina y es capaz de llevar cantidades absolutas significativas de ^{10}B al tumor con una buena relación tumor/tejido normal y tumor/sangre. Fue sintetizado a fines de 1950 (Snyder H. R. y col. , 1958) y ha sido usado en el ámbito clínico desde hace aproximadamente 10 años. El BPA no es tóxico a la dosis necesaria para efectuar la terapia según se ha probado en diferentes modelos experimentales. Los estudios toxicológicos demuestran que ratones y ratas inyectadas con BPA a pH neutro no muestran signos de toxicidad sistémica a dosis de 5 y 3 g/kg respectivamente (Coderre J. A. y col. , 1987; Taniyama K. y col. , 1989).

Este compuesto resultó de mucho interés para el tratamiento de melanomas. Es un análogo de la tirosina, un sustrato para la síntesis de melanina en células normales. Se ha observado la formación de un complejo entre el BPA y los monómeros de melanina que son sintetizados activamente dentro de las células. En el caso de los melanomas melanocíticos la formación de melanina aumenta considerablemente y debido a esto también aumenta la captación de tirosina o fenilalanina en las células tumorales (Mishima Y. y col. , 1989).

Posteriormente el BPA se usó como portador de boro para el tratamiento del glioblastoma multiforme. Este compuesto posee un bajo peso molecular y sus características químicas le permiten atravesar la barrera hematoencefálica. La incorporación preferencial del compuesto en las células tumorales fue un hallazgo empírico. Aún no se conocen exactamente los mecanismos involucrados pero se supone que este fenómeno se debería a una mayor necesidad o requerimiento de aminoácidos por las células tumorales metabólicamente muy activas (Coderre J. A. y col. , 1999a).

Otra hipótesis propone que debido a que las células del sistema nervioso comparten un origen embrionario común con las células de la piel (incluidos los melanocitos) en el ectodermo (una de las 3 capas embrionarias que da origen a células del sistema nervioso y la piel), la acumulación de BPA en células de gliosarcoma podría estar mediada por un sistema de transporte de aminoácidos aromáticos responsable de aportar los precursores necesarios para la síntesis de neurotransmisores. Este sistema de transporte estaría presente también en las células de melanoma para proveer los precursores para la síntesis de melanina.

Se ha comparado la distribución de BPA y de tirosina tritiada (el verdadero precursor de la melanina) en ratones portadores de melanoma (Coderre J. A. y col. , 1990). El tritio de la tirosina se acumula en todos los tejidos metabólicamente activos (tumor, epitelio intestinal, hígado, médula ósea y tejido glandular) mientras que el ^{10}B del BPA se acumula solamente en el tumor. Estas observaciones sugieren que el sistema de transporte de aminoácidos aromáticos que comparten los dos tumores mencionados no sería tan específico en los neoplasmas y por lo tanto sería capaz de importar BPA. Por el contrario, las células normales metabólicamente activas incorporarían en mayor grado los verdaderos precursores pero tendrían menor capacidad de incorporar BPA (Coderre J. A. y col. , 1992).

Existe una marcada heterogeneidad en las células tumorales dada por diferencias en su actividad metabólica, grado de proliferación y diferenciación y nivel de oxigenación. Esta diferencia entre los clones se manifiesta como una gran heterogeneidad en la captación de boro por dichas células (Coderrre J. A. y col. , 1998). También existe una gran variabilidad en la vascularización de los tumores y en la proporción de necrosis espontánea de los mismos. Se ha demostrado que diferentes compuestos borados se comportan de distinta forma frente a estas variables. El BPA se acumula preferentemente en células viables y con alta tasa de proliferación y menos en las regiones necróticas de los tumores. El BSH se acumula en zonas del tumor que proliferan, en células quiescentes del mismo como así también en zonas necróticas y edema. (Patel H. y col. , 2000; Pignol J. P. y col. , 1998; Neumann M. y col. , 2000).

Un aspecto muy importante que fue estudiado en detalle es la incorporación del BPA a las células tumorales que infiltran el tejido normal circundante. Estas células no pueden ser extirpadas por cirugía y si no se eliminan pueden constituir un foco de recidiva. Cuando se realiza un estudio de BNCT se asume que luego de 2 h de infusión, dichas células captarían el compuesto borado en las mismas proporciones que las células de la masa tumoral principal. Según se ha estudiado por técnicas de microscopía iónica (SIMS) esta presunción no sería del todo correcta, debido a que se necesitarían por lo menos 6 h ó más de infusión de BPA y un tiempo de 24 h post-administración para llevar la misma cantidad de boro a la masa tumoral y a las células infiltrantes (Joel D. D. y col. , 1999). Sería importante considerar estos hallazgos dado que los protocolos clínicos actuales utilizan solo 2 h de infusión del compuesto borado y hasta el presente en la mayoría de los casos se observa recurrencia (Smith D. R. y col. , 2001).

El BSH ha sido utilizado para el tratamiento de tumores cerebrales en Japón desde hace 27 años. Es un compuesto que difunde y que solo atraviesa la barrera hematoencefálica en regiones donde los capilares son más permeables o se encuentran dañados como en el caso de la presencia de un tumor (Soloway A. H. y col. , 1967). La afinidad selectiva del compuesto por el tumor con respecto al tejido normal de cerebro está dada por esta característica, en contraste con una selectividad a nivel celular como ocurre con el BPA. Así, en el caso de los tumores

de cerebro, el BSH es capaz de llevar suficiente cantidad de átomos de boro al tumor y además posee baja toxicidad (Haritz D. y col. , 1994).

Un factor importante para la destrucción de las células tumorales es la localización subcelular de la reacción de captura. El mayor efecto letal se lograría si la partícula de alto LET producida impactara en el núcleo de la célula. Por lo tanto, es deseable que los compuestos de boro se acumulen dentro o cerca del núcleo. Se ha estimado que la concentración de boro celular necesaria podría ser reducida en un factor entre 2 y 5 si el compuesto de boro se localizara en o cerca del núcleo (Hartman T. y col. , 1994; Gabel D. y col. , 1987; Kobayashi T. y col. , 1982).

En el caso del BPA, el boro intracelular se distribuye uniformemente entre el núcleo y el citoplasma según se determinó por microscopía iónica luego de exponer las células al BPA in vitro (Bennet B. D. y col. , 1992; Bennet B. D. y col. , 1994; Chandra S. y col. , 1997) e in vivo, en tejidos de ratas inyectadas con BPA (Smith D. R. y col. , 1996; Smith D.R. y col. , 1997). Existe bastante controversia con relación a la localización subcelular del BSH; luego de exponer células en cultivo al BSH se ha detectado la presencia de boro en el núcleo y en el citoplasma. Zha y col. encontraron menor contenido de boro en el núcleo que en el citoplasma (Zha X., y col. , 1992), mientras que en otro estudio realizado por Chandra y col. se encontró una distribución uniforme del mismo (Chandra S. y col. , 1997). En tejido de glioblastoma humano Otersen y col. describieron la presencia de boro en el núcleo y también en el citoplasma unido fuertemente a estructuras celulares (Otersen B. y col., 1997). Según Haselsberger y col. el boro del BSH en dicho tejido se localizaría solamente en el núcleo (Haselsberger K. y col. , 1994).

1. 3. b) Nuevos compuestos borados

Los nuevos compuestos de boro, también llamados compuestos de tercera generación, poseen en general características bioquímicas y fisiológicas que favorecen la selectividad celular con respecto a las estructuras diseñadas y sintetizadas previamente. La Tabla 1 contiene una lista general de dichos compuestos. Cada uno de ellos se basa en una estrategia particular para incorporar mayores cantidades de boro a las células y aumentar a su vez la incorporación selectiva al tumor.

El uso de precursores bioquímicos para tumores cerebrales (Spielvogel B. F., 1994) se basa en que las células tumorales cerebrales se encuentran en división celular a diferencia de las células normales de la glía y de las neuronas las cuales no se dividen. Entre los compuestos que se desarrollaron existen nucleósidos que pueden ser convertidos en nucleótidos para ser incorporados en el ADN ó ARN (Rong F. G. y Soloway A. H., 1994), aminoácidos que pueden ser incorporados a proteínas tumorales (Wyzlic I. M. y col. , 1994), y éteres de fosfolípidos que pueden acumularse selectivamente en la membrana plasmática (Lemmen P. y col. , 1993).

Entre los compuestos de alto peso molecular utilizados se puede mencionar las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) (Smith M. D. y col. , 1996) y liposomas de varios tipos (Shelly K. y col. , 1992). Se ha encontrado una incorporación de boro favorable (in vivo) en ratones portadores de tumores EMT6 subcutáneos utilizando liposomas.

Tabla 1: Compuestos de Boro de tercera generación *

1. Unidades estructurales

- a. Precursores de ácidos nucleicos portadores de Boro.
- b. Aminoácidos y péptidos portadores de Boro.
- c. Lípidos y fosfolípidos.
- d. Carbohidratos.

2. Lipoproteínas.

3. Liposomas.

4. Porfirinas y Phtalocianinas.

5. Moléculas de unión al ADN

- a. Agentes alquilantes.
- b. Intercaladores.
- c. Moléculas de unión al surco de la doble hélice de ADN.
- d. Poliaminas.
- e. Moléculas Antisense (di- oligonucleótidos)

6. Antígenos portadores de Boro/ Unión a receptores.

- a. Anticuerpos monoclonales bi-específicos.
- b. Factores de crecimiento.
- c. Hormonas.

7. Otros compuestos.

- a. Radiosensibilizadores.
- b. Fosfatos, Fosfonatos y Fosforamidatos.
- c. Derivados cíclicos de la Thiourea.
- d. Aminas.

8. Depresores del sistema nervioso.

- i. Promazinas.
- ii. Barbitúricos, Hidantoína.

* Chemical Reviews, June 1998, volume 98, number 4. Published by the American Chemical Society

Otras estrategias llevaron al desarrollo de porfirinas boradas (Kahl S. B. y Koo M. S., 1992), compuestos de bajo peso molecular que resultaron de mucho interés y sobre los cuales se ha trabajado mucho para poder utilizarlos en el área del BNCT. La idea surgió a partir de la experiencia con compuestos similares utilizados como radiosensibilizadores en la terapia fotodinámica (otra terapia binaria) en la cual se había observado que las porfirinas poseían una incorporación selectiva y persistente dentro de los tumores (Munday A. D., y col. , 1996; Spizziri P. G. y col. , 1996; Mark A. y col. , 2001). Esta característica permitió pensar que podrían constituir buenos agentes portadores de boro. Esto motivó la investigación y síntesis de diversos tipos de porfirinas boradas con el fin de aplicarlas a la terapia de BNCT. Se han realizado numerosos estudios in vivo (Miura M. y col. , 1990; Miura M. y col. , 1992; Khal S. B. y col. , 1990; Hill J. S. y col. , 1992) e in vitro (Fairchild R. G. y col. , 1990) que demuestran la incorporación preferencial por las células tumorales de este nuevo grupo de compuestos. En el caso de los tumores sólidos el mecanismo preciso de incorporación aún no se conoce pero se supone que podría ser un fenómeno mediado por receptores que se expresan diferencialmente en las células tumorales según demuestran los estudios realizados por Callahan y col. , utilizando una protoporfirina borada (BOPP) (Callahan D. E. y col. , 1999).

Entre las moléculas de unión al ADN se han desarrollado intercaladores de ADN (Tjarks y col. , 1994), radiosensibilizadores (Scobie M. y Threadgill M. D., 1992) y ciertos análogos de poliaminas boradas. Su incorporación preferencial a las células tumorales (Holley J. L. y col. , 1992) se debería a una sobre-expresión del sistema de transporte de poliaminas (Yuan Z. M. y col. , 1994). En condiciones fisiológicas las poliaminas están involucradas en el empaquetamiento y estabilización del ADN. Esta localización las convierte en moléculas muy atractivas ya que su utilización en BNCT aumentaría la letalidad de la reacción de captura del ^{10}B (n, α) ^7Li . Además, dichos compuestos serían capaces de entregar boro a las células en proliferación y también a células quiescentes del tumor (Marton L. J. y col. , 1995).

Se ha estudiado la capacidad de compuestos de alto peso molecular como los anticuerpos para funcionar como moléculas portadoras de boro. Los anticuerpos monoclonales se han utilizado asociados a múltiples átomos de boro pero estos inmunoconjugados poseen inmunoreactividad reducida y son incapaces de transportar suficientes átomos de boro a las células tumorales (Alam F. y col. , 1987). A raíz de ello se han ensayado otras estrategias como la de unir polipéptidos borados (Barth R. F. y col. , 1986) con el fin de llevar mayor cantidad de boro al tumor. Estas moléculas, por su mayor tamaño, quedaban retenidas en dos órganos del sistema reticuloendotelial, el hígado y el bazo (Barth R. F. y col. , 1994). Así, resultó de interés desarrollar anticuerpos biespecíficos (BsAbs) en los cuales uno de los sitios reconoce a un antígeno del tumor y el otro sitio reconoce a los átomos de boro (Liu L. y col. , 1995). Los estudios in vitro e in vivo realizados con el fin de estudiar su incorporación a las células tumorales no son concluyentes (Pak R. H. y col. , 1995). También se han estudiado moléculas que se unen a receptores tumorales tales como el factor de crecimiento epidérmico (Capala J. y col. , 1996).

En resumen, se puede decir que se han sintetizado una gran variedad de compuestos borados de bajo y alto peso molecular y afortunadamente muchos de ellos cumplen con los requisitos necesarios como la alta selectividad, incorporación, permanencia y baja toxicidad in vitro e in vivo. En el caso de los tumores cerebrales, podría ser ventajoso que estos compuestos tengan la propiedad de atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en células tumorales dispersas en el cerebro como ocurre con el BPA. En este sentido, sería importante que dicho compuesto posea selectividad a nivel de la célula tumoral para impedir su acumulación en células normales. Naturalmente, los requerimientos en cuanto a las propiedades de los compuestos borados dependerán de la localización del tumor. Los compuestos mencionados podrían utilizarse en combinación con otros agentes para llegar a subpoblaciones tumorales diferentes (viables-necróticas) y mejorar las relaciones y valores absolutos de boro obtenidos hasta la fecha.

1. 4. NEUTRONES TÉRMICOS

Los neutrones térmicos por sí mismos no producen daño en la célula tumoral o en el tejido normal dado que su energía es insuficiente para ionizar los componentes del tejido. Poseen una energía de aproximadamente 0,025 eV la cual se encuentra muy por debajo del valor para la interacción elástica entre los neutrones y los átomos de hidrógeno que están presentes tanto en el tejido tumoral como en el normal. Para dicha interacción se necesita una energía que excede los 10 KeV (neutrones rápidos) y en este proceso se producen protones llamados "recoil " los cuales son capaces de ionizar los componentes celulares (Zaider M. y col. , 1994). Solo cuando los neutrones térmicos se combinan con el ^{10}B se produce una dosis de radiación que sí puede provocar daño celular. Por otra parte los neutrones térmicos no son capaces de alcanzar gran profundidad en los tejidos. A los 2,5 cm el flujo incidente se reduce al 50% (Sweet W. H. y col. , 1960). Dichos neutrones entonces solo son útiles si la terapia del BNCT se aplica a lesiones superficiales o poco profundas.

En la actualidad los haces de neutrones disponibles no son monoenergéticos y contienen una mezcla de radiaciones: neutrones térmicos, epitérmicos, rápidos y rayos gamma. Los dos últimos contribuyen a la dosis de radiación de forma no selectiva por lo cual deberían ser minimizados.

Los haces de neutrones térmicos en la terapia de BNCT han sido usados desde hace 30 años en Japón para el tratamiento de tumores de cerebro (Hatanaka H. y col. , 1994; Soloway A. H. y col. , 1960). La irradiación se realiza a calota abierta en la cual la masa cerebral se expone directamente al haz incidente. Esta metodología, que hasta la fecha arrojó buenos resultados, resulta sumamente compleja pues se debe exponer la masa cerebral en el momento en que se realiza la irradiación. Este hecho motivó el desarrollo e implementación de haces de neutrones epitérmicos, los cuales poseen mayor energía (0,5-10 KeV). Los neutrones epitérmicos se termalizan (disminuyen su energía) a medida que penetran en el tejido, alcanzando un pico térmico a 3-6 cm de profundidad lo cual permite el tratamiento de tumores de localización más profunda (Moss R. L. y col. , 1997).

Cabe recordar que la reacción de captura siempre se produce con neutrones térmicos, no con neutrones epitérmicos (Fig. 3).

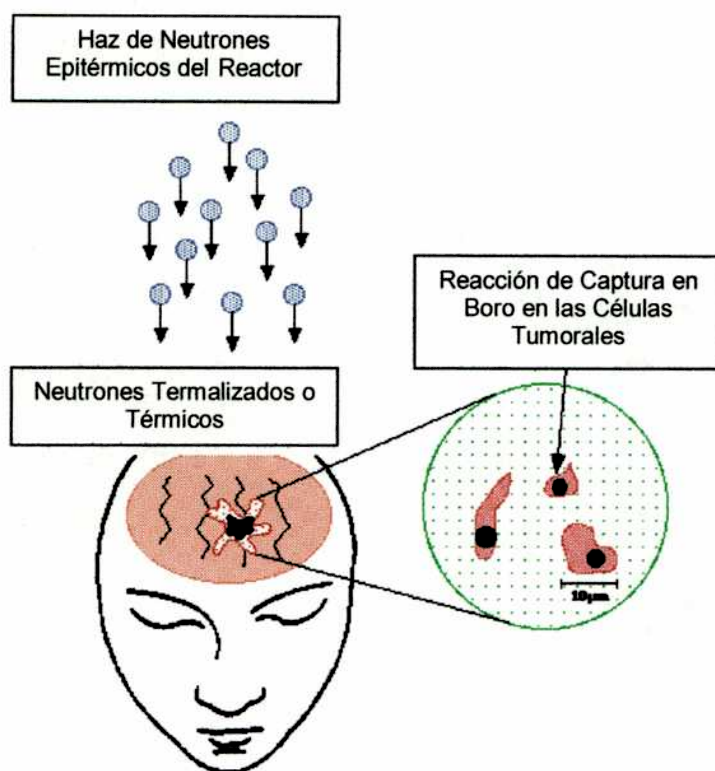


Fig. 3: Termalización de los neutrones epitérmicos a medida que penetran en el tejido.

Existen diversos proyectos en el mundo con el fin de desarrollar haces de neutrones para uso en BNCT. Actualmente se encuentran disponibles los haces en Japón (JRR - 4, KUR), Comunidad Europea (HFR, PETTEN), EE.UU. (Harvard - MIT), Finlandia (FIR - 1), Suecia (R2 - 0) y Argentina (RA - 6).

La fluencia de neutrones necesaria para la terapia de BNCT es del orden de $10^{12} - 10^{13} \text{ n/cm}^2$. Actualmente esta fluencia sólo ha sido generada a partir de reactores nucleares por un proceso de fisión. Si esta modalidad terapéutica se extendiera, se podría considerar el uso de aceleradores los cuales podrían localizarse fácilmente en un hospital. Actualmente la tecnología de aceleradores para BNCT ha llegado a un nivel de desarrollo que permitiría su implementación (Allen D. A. y col. , 1995; Yanch J. C. y col. , 1993; Wang C. K. y col. , 1989; Burlon A. A. y col. , 2001a; Burlon A. A. y col. , 2001b).

1. 5. RADIOBIOLOGÍA DEL BNCT

La terapia por captura neutrónica (BNCT) produce una mezcla de componentes de dosis de radiación. Entre esos componentes existen partículas llamadas de alta transferencia lineal de energía (LET) que son básicamente partículas pesadas como iones, partículas alfa, protones, neutrones etc. y radiación de bajo LET como los rayos gamma. A igual dosis de radiación las partículas de alto LET producen mas daño en los tejidos que las de bajo LET pues son capaces de depositar mayor cantidad de energía en la misma unidad de volumen.

Los componentes de la reacción de BNCT en los tejidos son:

1. Componente gamma del haz de neutrones.
2. Partículas alfa de 1,47 MeV, rango 9 μm , LET: 196 keV/ μm generadas por la reacción de captura del neutrón térmico en el ^{10}B .
3. Partículas de Litio de 0,84 MeV, rango 5 μm , LET: 162 keV/ μm generadas por la reacción de captura del neutrón térmico en el ^{10}B .
4. Rayos gamma (478 KeV de energía) producidos por la captura de neutrones térmicos en el Hidrógeno presente en los tejidos en la reacción $^1\text{H}(n, \gamma) ^2\text{H}$.
5. Protones de alto LET (590 KeV) producidos por la captura de los neutrones térmicos en Nitrógeno, en la reacción $^{14}\text{N}(n, p) ^{14}\text{C}$.
6. Protones "recoil" (de energía cinética mayor que 10 keV) generados por la colisión de neutrones rápidos del haz epitérmico con los núcleos de hidrógeno de los tejidos en la reacción $^1\text{H}(n, n^1) p$.

Analizando estas componentes de dosis, resulta claro que la ventaja terapéutica (dosis al tumor/dosis a las células normales) que se puede lograr con la técnica de BNCT dependerá en gran medida de la acumulación preferencial de compuestos borados en el tumor ya que las otras componentes de dosis están presentes en tumor y tejido normal en magnitudes similares.

La dosis entregada a los tejidos durante el BNCT consiste en los productos de la reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha) ^7\text{Li}$ sumada a una concomitante e inevitable radiación inespecífica que está relacionada directamente con la duración de la exposición en

el reactor, y es independiente de la concentración de boro en los tejidos. Debido a estas contaminaciones (principalmente neutrones rápidos), no relacionadas con la cantidad de boro, la tasa de dosis en el tumor y en tejido normal no resulta en un factor proporcional que aumenta directamente con la concentración de boro. Para maximizar la ganancia terapéutica, es más importante tener mayores cantidades de ^{10}B en el tumor con relaciones tumor/tejido normal en un rango de 3:1 que menores cantidades de boro y mayores relaciones tumor/tejido normal. Esto se debe al menor tiempo de irradiación requerido en el primer caso para entregar la misma dosis al tumor y menor dosis inespecífica a los tejidos normales (Coderre J. A. y col. , 1996).

La proporción de dichos componentes de dosis difiere considerablemente entre los distintos haces de neutrones utilizados en BNCT. Por esta razón, si solo se expresa la dosis física de un experimento como dosis física total, esta misma dosis en dos centros diferentes tendría distinta implicancia biológica. Por lo tanto, en BNCT se hace necesario especificar cada uno de los componentes de la dosis por separado ya que el efecto biológico para una misma dosis dependerá del aporte proporcional de cada componente.

Para el cálculo de la dosis total entregada en BNCT cada uno de los componentes de alto LET debe ser multiplicado por un factor (Efectividad Biológica Relativa o RBE) que se determina en forma experimental. Esto permite aplicar un factor de corrección a la dosis de acuerdo a su efectividad biológica. El resultado de la suma de todos los componentes de la radiación -multiplicados por el factor (RBE) correspondiente- se expresa como unidades equivalentes de fotones o Gray equivalente (Gy-Eq). Estos factores de efectividad biológica pueden variar entre distintos tejidos como el cerebro, tumor y piel de acuerdo a la composición de cada uno de ellos y a su radiosensibilidad. Asimismo, el RBE puede variar según el parámetro empleado para evaluar el efecto biológico.

Las dosis expresadas de esta manera permiten 1) comparar los efectos del BNCT en distintos animales ó modelos biológicos para los cuales se conocen los efectos de la irradiación con fotones 2) tomar las variables biológicas o “end points” que describen la respuesta a la radiación por fotones y utilizar esta información para los protocolos de escalamiento de dosis en los ensayos clínicos de BNCT. Las presunciones sobre las cuales se basan estos estudios dosis-efecto son solo un

instrumento que permite la comparación del efecto de distintas terapias. En algunos casos las dosis pueden ser sobrestimadas o subestimadas por lo cual se debe ser muy cuidadoso en el cálculo de las mismas.

Usualmente el RBE se define como la relación de dosis de una radiación de referencia (generalmente rayos X) con una radiación a ser testeada, que producen el mismo efecto biológico en un sistema dado. Medidos de esta forma, los RBEs son solo función de la calidad (LET) de la radiación testeada. Podemos decir que en la radiobiología del BNCT el concepto tradicional debe ser corregido o mejorado. El RBE para el componente de la reacción de captura en boro $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ debería considerarse como el factor de efectividad biológica de un compuesto dado o CBE.

En este sentido el efecto biológico para un dado compuesto borado dependería de variaciones en su microdistribución dentro de la célula y en la distribución en los diferentes tejidos. La forma de administración del compuesto borado, el patrón de distribución dentro de la célula, la dosis por fracción, y el tamaño del núcleo en la población celular pueden influir sobre la determinación experimental del factor CBE. Por ejemplo, estudios de BPA en médula espinal de rata han demostrado que el CBE es dependiente de la relación de captación de boro entre la sangre y la médula (Morris G. M. y col. , 1997). Para el BPA se encontraron valores de CBE desde 0,66 hasta 1,33 en tejido normal, dependiendo de las condiciones experimentales.

El abordaje experimental para el cálculo de los CBE debería ser el siguiente:

- 1) para cada tejido, definir una variable biológica ó “end point” cuantificable ó respuesta a la radiación,
- 2) determinar la dosis de respuesta a una radiación de referencia,
- 3) determinar la dosis de respuesta a un haz de neutrones solamente y
- 4) determinar la dosis de respuesta al haz de neutrones en presencia del compuesto de boro.

Una vez determinadas estas relaciones de dosis y respuesta es posible estimar 1) el RBE del haz de neutrones, 2) el RBE de los componentes de alto LET del haz (dosis por captura en nitrógeno + dosis de protones “ recoil” generados por la captura en hidrógeno de neutrones rápidos), 3) el CBE para un compuesto en particular (Coderre J. A. y col. , 1999a).

Se ha estimado el CBE del BPA en distintos modelos biológicos utilizando distintos parámetros biológicos que se describen en la Tabla 2.

Tabla 2: Valores de RBE y CBE para diferentes tejidos.

Componente de dosis	Efectividad biológica relativa (CBE ó RBE)
- Reacción de captura en Boro	Tumor (gliosarcoma 9 L) = 3,8 ^a Médula espinal de rata = 1,3 ^b Piel humana (descamación húmeda) = 2,5 ^c
- Protones (Captura en N + Protones "recoil" generados por la colisión de neutrones rápidos del haz con núcleos de hidrógeno)	Tumor (gliosarcoma 9 L) = 3,2 ^d Cerebro (perro) = 3,3 ^e Piel (perro) = 3,0 ^f

^a Determinado por ensayo clonogénico in vivo/ in vitro del gliosarcoma 9 L de rata (Coderre J. A. y col. , 1993), ^b determinado por estudios dosis-respuesta de médula espinal de rata utilizando como parámetro ó " end point " la parálisis de la pata dentro de los 7 meses (Morris G. M. y col. , 1994a; Coderre J. A. y col. , 1995), ^c determinado por BNCT con neutrones térmicos de melanoma cutáneo de pacientes (Fukuda H. y col. , 1996), ^d determinado en perros normales en el haz de neutrones epitérmicos de BMRR usando Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para detectar daño a la barrera hematoencefálica (Gavin P. R. y col. , 1992; Huiskamp R. y col. , 1996), ^e determinado en piel de perros utilizando el haz epitérmico de neutrones de BMRR (Gavin P. R. y col. , 1992).

Resulta muy útil establecer valores universales para el RBE de todos los componentes de dosis en BNCT. Sin embargo este tema resulta aún controversial y a la vez sumamente interesante como objeto de estudio. Distintos centros internacionales han aportado datos con respecto al comportamiento de los diferentes componentes de la radiación que deberían tenerse en cuenta en el momento de sacar conclusiones al respecto. Se ha descrito el fenómeno de "supra-aditividad " que se refiere al hecho de que hay evidencias de que los rayos gamma en un ambiente de radiación de alto LET se comportan más como radiación de alto LET que como radiación de bajo LET (Morris G. M. y col. , 1996).

Los valores de RBE entonces variarían con el espectro de neutrones, la energía, la profundidad, la dosis y con las componentes de dosis. También dependen del tejido, variable biológica ó “end point ” considerado, número de fracciones y la tasa de dosis (EU- Workshop, Green College, Oxford 2001). Por ejemplo, se debe pensar en un “end point ” adecuado para lo que se busca analizar. Una sobrevida del 1% sería útil para analizar el efecto de una radiación en el control de tumor pero no para estudiar efectos sobre el tejido normal.

Se pueden estimar las dosis requeridas para el control del glioblastoma a partir de datos de literatura para las terapias con fotones y neutrones rápidos y comparar estas con las dosis utilizadas en BNCT (Tabla 3).

Tabla 3: Dosis para el control del glioblastoma en humanos y dosis a cerebro normal con terapias convencionales.

Terapia	Dosis
- Radiocirugía estereotáctica combinada con terapia convencional por fotones fraccionada *	60-72 Gy-Eq (Tumor) 14,5 Gy-Eq (Cerebro)
- Terapia convencional por fotones: una fracción	31,7 Gy-Eq (Tumor)
- Neutrones rápidos **	29-39 Gy-Eq

* (Masciopinto J. E. y col. , 1995)

** (Laramore G. E. y col. , 1997)

Simplemente a modo de ejemplo, se presentan algunas de las dosis empleadas en los ensayos clínicos en Brookhaven National Laboratory, EE.UU. En el primer grupo de pacientes tratados con BNCT en BNL, la dosis pico en el cerebro normal fue de 10,5 Gy-Eq que corresponde a una dosis promedio en cerebro normal de aproximadamente 2,8 Gy-Eq. La dosis máxima entregada al tumor fue estimada en un rango de 48- 64 Gy y la dosis mínima fue de 20-30 Gy-Eq (Coderre J. A. y col. , 1997; Chadha M. y col. , 1998). Se observó una recurrencia local en la mayoría de los casos, aunque en algunos pacientes se ha documentado una necrosis extensiva del tumor en cortes histológicos de material de autopsia. Una consideración muy relevante fue la estimación de la dosis entregada a las células tumorales que infiltran

el tejido normal dentro del ("target volume") que incluye al tumor más 2 cm de margen de tejido cerebral circundante al tumor observado por resonancia magnética nuclear (RMN). La dosis mínima calculada en estas células infiltrantes en el primer grupo de pacientes de BNL estuvo en el rango de 8-16 Gy-Eq. Dichas dosis fueron bien toleradas por los pacientes. El tiempo promedio de sobrevida desde el diagnóstico inicial en 10 pacientes fue de 13,5 meses.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. MODELO DE CÁNCER ORAL: BOLSA DE LA MEJILLA DEL HÁMSTER

El modelo de la bolsa de la mejilla del hámster es el modelo experimental de cáncer oral humano más aceptado en el ámbito de la literatura internacional (Salley J. J. y col. ,1954; Shklar G., 1979). Fue desarrollado originalmente por Salley (1954) y estandarizado por Morris (1961) para garantizar la reproducibilidad de las lesiones. Las ventajas del modelo consisten en: la similitud entre la mucosa de la bolsa de la mejilla del hámster y la mucosa oral humana (en términos de histología, histoquímica y ultraestructura), la ausencia de carcinomas espontáneos, el desarrollo de lesiones displásicas precancerosas comparables a las humanas, y la sensibilidad del sistema a la modulación sistémica vía vitaminas, hormonas y drogas (Shklar y col. , 1979)

La bolsa de la mejilla del hámster es anatómicamente similar a un “bolsillo” (Fig. 4) en el espesor de cada mejilla. Solo está comunicado con la boca en las comisuras, y está recubierto por epitelio escamoso estratificado semejante a la propia cavidad oral. La bolsa de la mejilla es de fácil acceso permitiendo así su topicación con diferentes sustancias tales como carcinógenos químicos (Fig. 5). Asimismo, las bolsas pueden ser evertidas fácilmente para ser irradiadas localmente y realizar el seguimiento macroscópico del comportamiento de los tejidos. Eventualmente se pueden correlacionar los parámetros macroscópicos de evaluación con estudios histopatológicos de tomas biopsias o de muestras de tejido obtenidas después del sacrificio del animal.



Fig. 4: Bolsa de la mejilla normal del Hámster evertida para su observación.



Fig. 5: Inducción tumoral mediante la aplicación local periódica de un carcinógeno químico (DMBA).

El desarrollo de un tumor maligno involucra complejas interacciones entre diversos factores, tanto exógenos (ambientales) como endógenos (genéticos, hormonales, etc.) (Weinstein I. B. y col. , 1982). El desarrollo de modelos experimentales de carcinogénesis ha permitido identificar, en la mayoría de los casos, una secuencia caracterizada por las siguientes etapas: **Iniciación, Promoción y Progresión**. La fase de iniciación es inducida por compuestos genotóxicos y resulta de eventos mutacionales. La iniciación ocurre en células individuales que luego se multiplican dando lugar a la formación de clones celulares. El crecimiento de estos clones es el proceso de promoción tumoral. Las células de estos clones pueden sufrir mutaciones adicionales originando células con mayor potencial de proliferación. Esta secuencia de mutación y crecimiento selectivo de nuevos fenotipos puede repetirse resultando en la aparición de tumores de mayor malignidad que son característicos de cada modelo (progresión) (Schulte-Herman y col. , 1994).

Las sustancias promotoras no son, en su mayoría, carcinogénicas por sí mismas y, en ausencia de iniciación, producen cambios reversibles en la proliferación y expresión fenotípica de las células. La aplicación de una dosis subumbral de un carcinógeno completo, que en esta dosis actúa como iniciador, seguida por tratamiento repetido con un promotor no carcinogénico induce la formación de tumores. Una dosis alta y única de un carcinógeno como el 7, 12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) es capaz de inducir tumores en piel de ratón. Si se disminuye la dosis, se hace necesario administrar el DMBA en forma reiterada para inducir los tumores.

En el modelo de carcinogénesis de mucosa bucal de hámster las etapas de iniciación, promoción y progresión no se definen claramente. La forma universalmente utilizada es la aplicación de DMBA en dosis repetidas como "carcinógeno completo". A medida que se van produciendo las topificaciones se van estableciendo diferentes tipos de lesiones de agresividad creciente.

Los protocolos de carcinogénesis en la bolsa de la mejilla inducen alteraciones precancerosas y lesiones tumorales muy similares a las lesiones que se desarrollan en la mucosa oral humana, si bien existen algunas diferencias anatómicas e histológicas (Morris L. 1961; Santis H. y col. , 1964). La inducción

química de la carcinogénesis sería un proceso semejante a la cancerización espontánea de la boca humana. La mucosa bucal se ve con frecuencia sometida a la acción de agentes exclusivamente hiperplasiantes -como las irritaciones por alimentos, lesiones dentarias, y el alcohol- o hiperplasiantes y mutagénicos -como el tabaco ó las radiaciones, accidentales o terapéuticas – (Winder L. y col. , 1977).

Los tumores originados mediante los protocolos de experimentación con DMBA son el resultado de las capacidades combinadas del carcinógeno como iniciador y promotor. A partir de la segunda semana de topicaciones se van evidenciando lesiones macroscópicas y microscópicas cuya gravedad tiende a aumentar progresivamente en el transcurso del tiempo. No existe una correlación estrecha entre tiempo de topicación y tipo de lesión debido a que distintos estadíos pueden coexistir en un mismo momento.

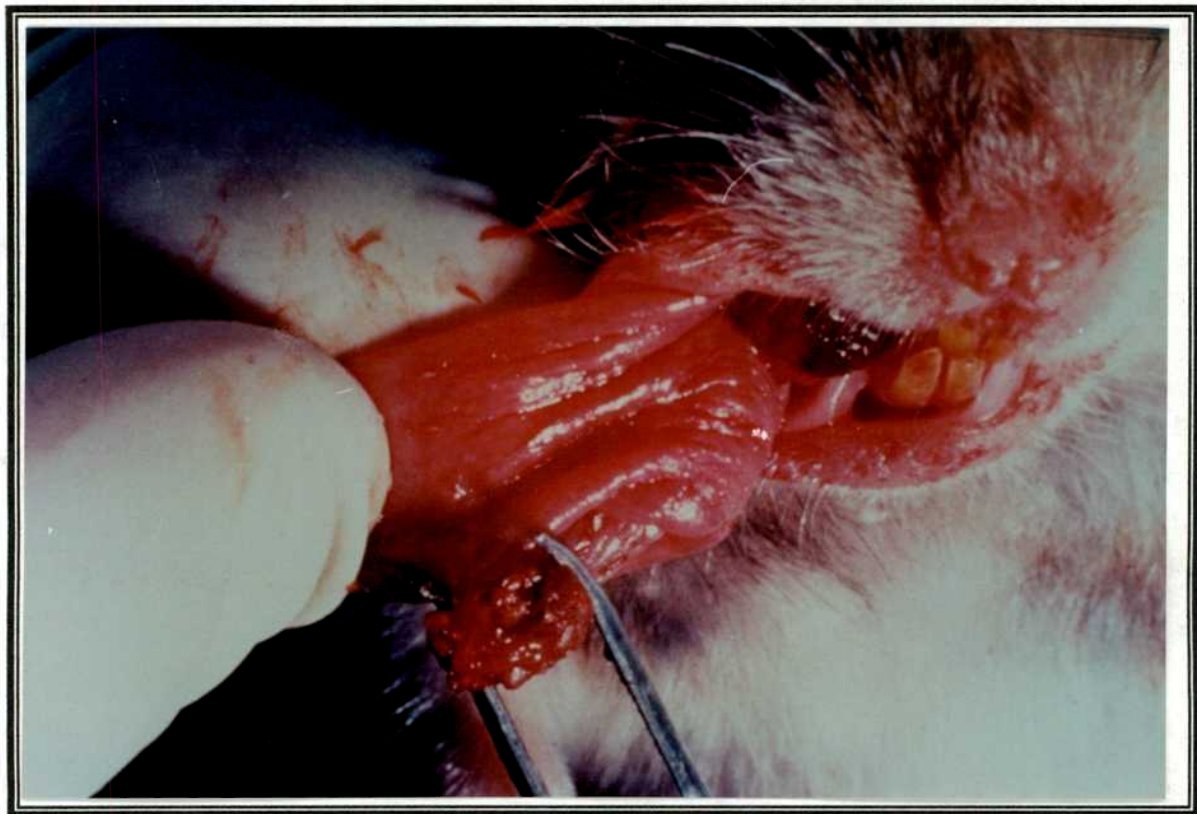


Fig. 6: Bolsa de la mejilla del Hámster tratada con DMBA por 16 semanas. La bolsa ha sido evertida y exhibe una masa tumoral exofítica rodeada de tejido precanceroso.

Se desarrollan progresivamente lesiones leucoplásicas, carcinoma in situ, carcinomas exofíticos (Fig. 6) y endofíticos (después de las 14 semanas) (Slaga y col. , 1992; Kohno N. y col. , 1996). Los tumores endofíticos son de mayor velocidad de crecimiento, menor diferenciación y más infiltrantes. Aparentemente no son formas evolutivas de los tumores exofíticos, sino que constituyen dos formas independientes.

Los tumores exofíticos de la bolsa estudiados en el presente trabajo se asemejan a los carcinomas de la boca humana. Las figuras 7-11 muestran en forma esquemática los distintos estadios del proceso de transformación maligna en epitelio.

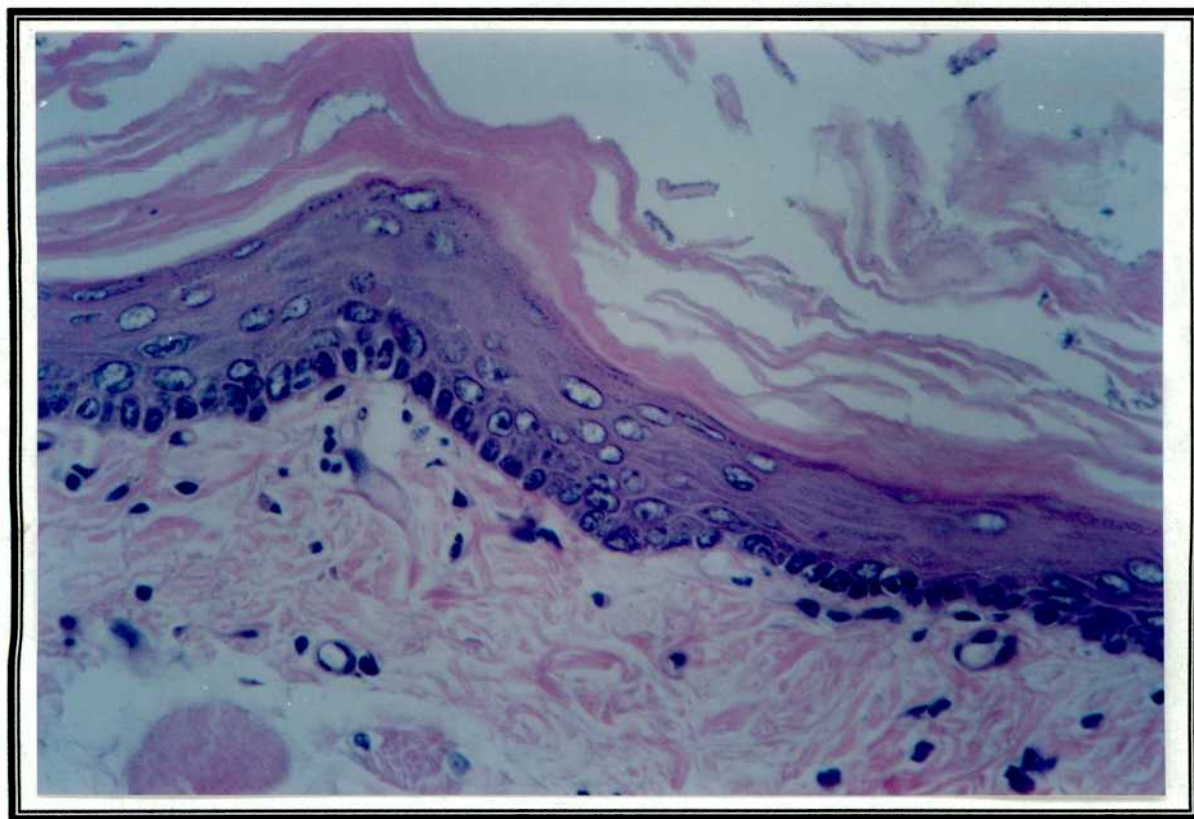


Fig. 7: Epitelio control ortoqueratinizado de 2-3 hileras de células, con capas de granulosa y córnea bien definidas. Se observa una capa de células basales en proliferación activa que dan origen a capas superficiales de células en proceso de diferenciación. H & E; 200 X.

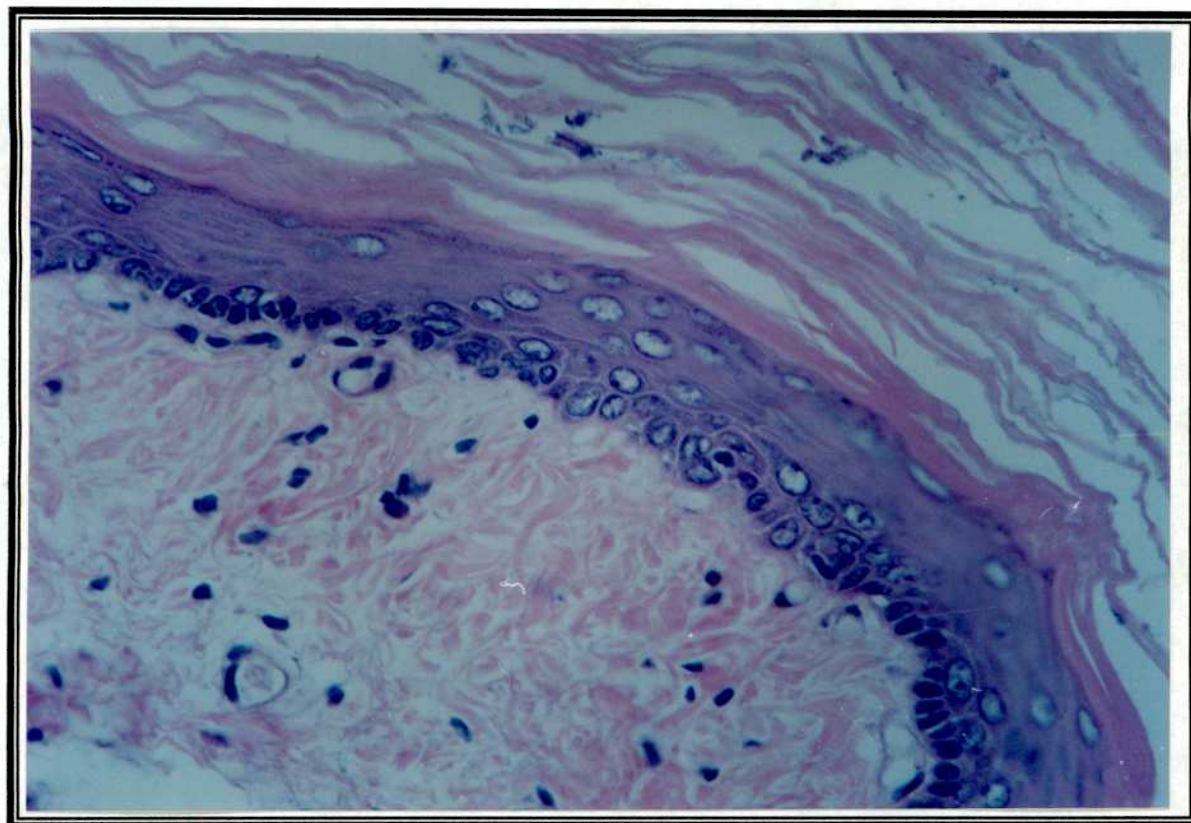


Fig. 8: Bolsa tratada con DMBA: Epitelio con fibrosis y sin características microscópicas inusuales (NUMF por sus siglas en inglés). H & E; 250X.

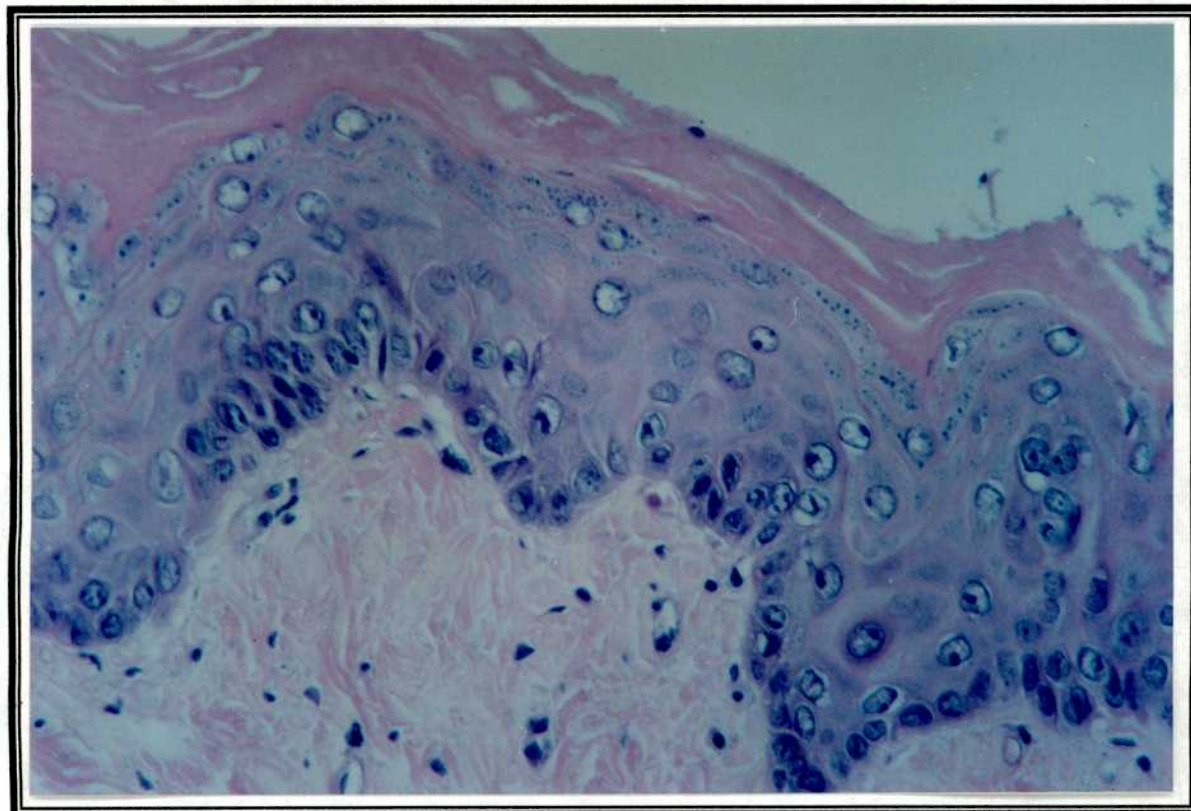


Fig. 9: Bolsa tratada con DMBA: Hiperplasia; las células del epitelio presentan apariencia normal pero aumentan su índice de proliferación. H & E; 250X.

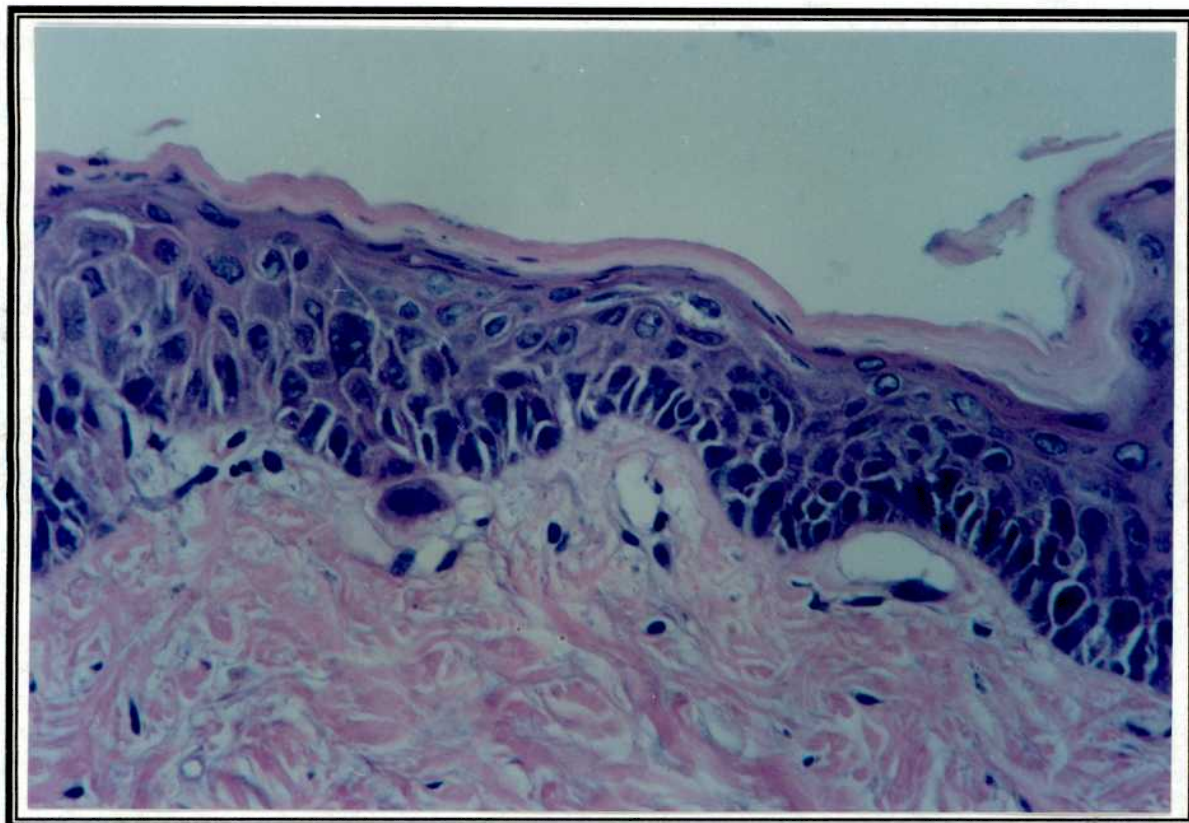


Fig. 10: Bolsa tratada con DMBA: Displasia; se observan alteraciones celulares morfológicas y de orientación. H & E; 250X.

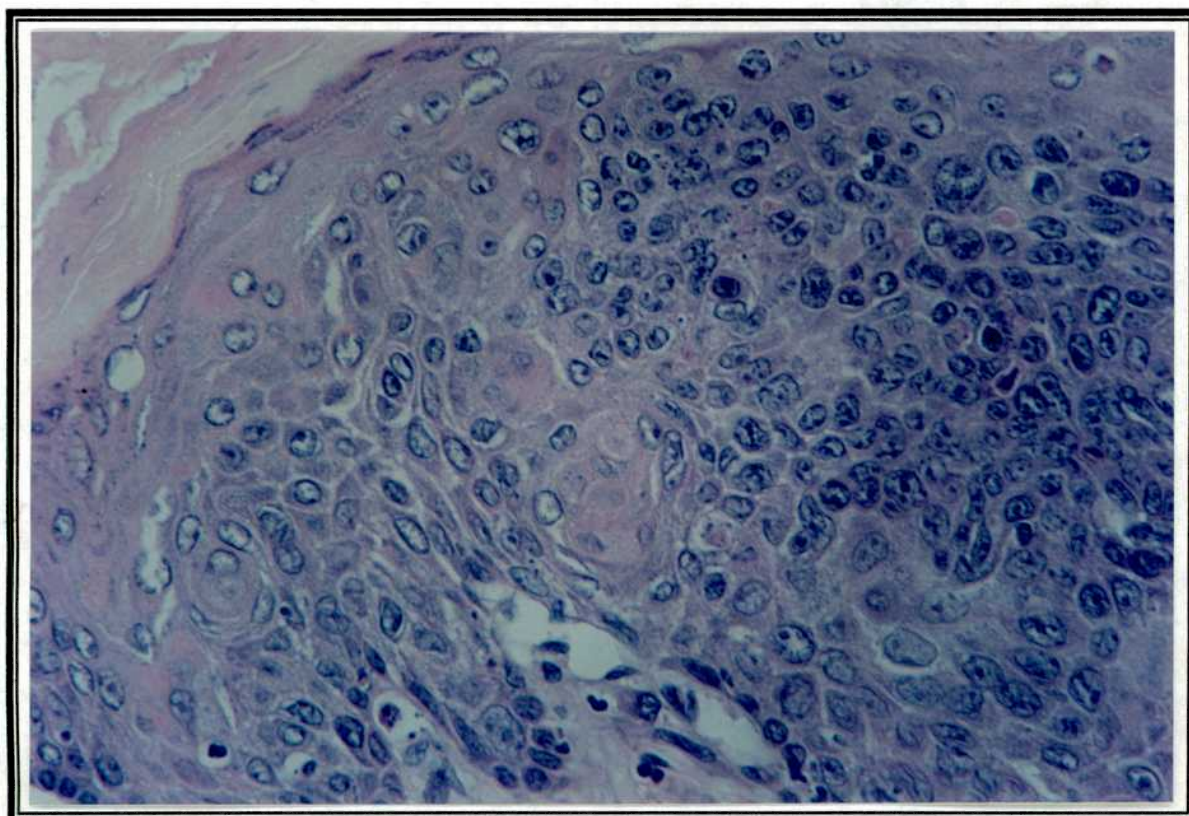


Fig. 11: Bolsa tratada con DMBA: Carcinoma semidiferenciado. Luego de un evento de infiltración donde las células tumorales rompen la capa basal se desarrolla un tumor que crece hacia la superficie de la bolsa y se denomina carcinoma exofítico. H & E; 250X.

El modelo del hámster se ha utilizado ampliamente para realizar estudios del proceso de carcinogénesis inducido por agentes físicos y químicos. Los agentes iniciadores actúan mediante daño al ADN. De acuerdo a su naturaleza, se los clasifica en físicos, químicos y biológicos. En cuanto a los iniciadores físicos, los absolutamente demostrados son la radiación ionizante y la radiación ultravioleta. Respecto de los iniciadores químicos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos constituyen las sustancias mejor estudiadas. En modelos de cancerización epitelial se ha demostrado su acción como iniciadores tumorales, e incluso como carcinógenos completos.

Los estudios realizados en el modelo de la bolsa facial del hámster tuvieron como objetivo la comprensión del proceso de carcinogénesis, su modulación y la prevención de su evolución en distintas condiciones. En nuestro laboratorio se han evaluado las alteraciones en el conectivo subepitelial y su correlación con las distintas fases de alteración epitelial (Mendez A. E. y col. , 1993; Collet A. M. y col. , 1995), las variaciones de las regiones organizadoras del nucleolo asociadas a cambios focales (Schwint A. E. y col. , 1995), el efecto sinérgico de la irradiación X y el DMBA (Méndez A. E. y col. , 1994) y distintos marcadores histoquímicos de alteración celular en respuesta a la radiación (Itoiz M. E. y col. , 1985; Itoiz M. E. y col. , 1986; Schwint A. E. y col. , 1993).

Desde el descubrimiento de los rayos X, la radiación ionizante ha sido reconocida como carcinógeno completo, aunque no se conoce en detalle su efecto in vivo sobre las distintas etapas del proceso de carcinogénesis (iniciación, promoción y progresión). En epitelios escamosos estratificados sin lesiones previas, las radiaciones ionizantes producen hiperplasia y cambios enzimáticos característicos del aumento de actividad celular (Cabrini R. L. y col. 1970; Itoiz M. E. y col. , 1977; Klein-Szanto A. J. P. y col. , 1970; Klein-Szanto A. J. P. y col. , 1972; Klein-Szanto A. J. P. y col. , 1974) que podrían conducir a la formación de tumores, si actuaran sobre células previamente iniciadas. La exposición de células a la radiación ionizante resulta en eventos moleculares asociados con el proceso de progresión tumoral (Woloschak y col. , 1990; Sherman M. L. y col. ,1990). Se ha sugerido que la acción de este tipo de radiación sobre la iniciación y progresión tumoral se relaciona con su habilidad de generar radicales libres y causar daño al

ADN (Mitchel R. E. y col. , 1992). Así, la radiación ionizante produciría efectos como iniciador y promotor tumoral (Ootsuyama A. y col. , 1988).

Si bien hasta el momento no existen datos precisos sobre la forma de activación que producen los diferentes tipos y dosis de radiación sobre el genoma de las células basales del epitelio, existen evidencias de la acción sinérgica con los carcinógenos químicos (Lurie A. G. 1983; Lurie A. G. y col. , 1987). Lurie demostró que la aplicación repetida de 0,2 Gy de rayos X durante y después del tratamiento con DMBA, estimula la carcinogénesis inducida en la bolsa de la mejilla del hámster. El tiempo post-irradiación tiene gran importancia en la determinación del efecto de la interacción entre irradiación y DMBA. No se sabe aún si ocurre un fenómeno similar cuando se produce la interacción entre la irradiación y otros carcinógenos. Sobre la base de estas evidencias resulta de interés el estudio de la transformación maligna de epitelios sometidos a irradiación, con y sin interacción de carcinógenos químicos.

Desde la óptica de la terapéutica, sería de interés estudiar el efecto de la radiación sobre los tumores ya desarrollados, a diferencia de los estudios descriptos previamente, cuyo objetivo fue estudiar el efecto de la radiación sobre el proceso de transformación maligna en sí.

Existe un solo trabajo en la literatura acerca de utilización del modelo del hámster para evaluar el efecto de una terapia radiante sobre los tumores una vez concluido el protocolo de carcinogénesis. En dicho trabajo se aplicó una única fracción de 20 Gy de rayos X en los tumores de la bolsa del hámster. Este estudio muestra un efecto terapéutico transitorio a los 14 días post-irradiación evidenciado por la ausencia de tumores. Este efecto terapéutico no fue suficiente para impedir el crecimiento tumoral a los 39 días post-irradiación (Horn Y. y col. , 1971). El efecto terapéutico de 20 Gy de rayos X conllevó un 25% de muertes por la exposición a la radiación y extensa necrosis e inflamación en la bolsa de la mejilla de animales normales, indicando un daño considerable al tejido normal.

El modelo de la bolsa de hámster brinda una ventaja significativa sobre los modelos animales usados hasta la fecha para estudios de BNCT. La inducción de tumores en la bolsa de la mejilla del hámster imita un proceso de transformación maligna espontáneo y por ende permite estudiar el tejido tumoral, el tejido precanceroso circundante al tumor y el tejido normal que da lugar a la formación de tumores en animales cancerizados. Dado el conocido fenómeno de cancerización de campo mediante el cual los tumores se desarrollarían a partir de áreas multifocales precancerosas (Slaughter D. P. y col. , 1953; Cahan W. G. y col. , 1977; Choy A. T. K. y col. , 1992; Wynder E. L. y col. , 1977; Silverman S. y col. , 1972; Schwint A. E. y col. , 1994) es de gran relevancia clínica el contar con un modelo que permite abordar el estudio del tejido precanceroso. Los modelos animales que se basan en la implantación de células transformadas en un lecho de tejido sano no brindan un modelo de tejido precanceroso (ver estudios de BNCT en otros modelos experimentales).

Otra ventaja importante del modelo es que brinda la posibilidad de estudiar el comportamiento de los tejidos orales normales que pueden limitar la dosis que se puede administrar al tumor durante el BNCT de tumores de cerebro o si esta terapia se aplica eventualmente a tumores de cabeza y cuello. Si bien los ensayos clínicos de BNCT están orientados al tratamiento de glioblastoma multiforme y melanoma, distintos grupos están explorando las posibles nuevas aplicaciones de ésta terapia. En éste marco, el modelo de carcinogénesis en la bolsa de la mejilla del hámster contribuiría a abordar, desde el punto de vista experimental, el estudio de una nueva aplicación de BNCT a una patología que, como el cáncer de cabeza y cuello, podría beneficiarse de terapias alternativas (Busse P. comunicación personal).

2.2. ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN Y BIOCINÉTICA DE COMPUESTOS BORADOS EN DISTINTOS MODELOS EXPERIMENTALES

El primer paso para validar el uso de un nuevo modelo experimental para estudios de BNCT consiste en realizar estudios de biodistribución y biocinética con un compuesto borado cuyo comportamiento se conoce en pacientes y/o en modelos experimentales. Entre los compuestos de boro disponibles en forma comercial se decidió utilizar el p-BPA para estudiar su incorporación en los tumores de bolsa facial del hámster ya que su selectividad es debida a una característica propia de las células tumorales y no a una característica anatómica como es la barrera hematoencefálica.

Existe mucha experiencia en el uso de dicho compuesto en diversos modelos biológicos. Se ha estudiado en detalle la incorporación del BPA en otros tumores experimentales inyectados por vía intraperitoneal (i. p.), intragástrica (i. g.) (Coderre J. A. y col. ,1992), intravenosa (i. v.), e intracarótidea (i. c.) -con y sin alteración de la barrera hematoencefálica- (Barth R. F. y col. , 1997).

La mayoría de los estudios de biodistribución in vivo se realizaron en tumores cerebrales de pacientes y modelos animales. Dentro de este contexto resultó de mucho interés estudiar el transporte de los compuestos borados a través de la barrera hematoencefálica a fin de entender su mecanismo y aumentar la incorporación de boro por parte de las células tumorales. La barrera hematoencefálica previene el pasaje de drogas ionizadas solubles en agua cuyo peso molecular sea > 180 Da. El BPA es un compuesto de bajo peso molecular que puede atravesar libremente la BBB pero con la desventaja de que también puede ingresar libremente a las células normales. El BSH es un compuesto de alto peso molecular que no puede atravesar libremente la BBB intacta. Solo lo hace cuando ésta se encuentra dañada por la masa tumoral.

El aumento de la oferta de BPA ó BSH puede aumentar dramáticamente la incorporación de boro en las células tumorales y la eficiencia terapéutica. Utilizando el modelo de glioblastoma de rata F-98, Barth R. F. y col. (1997) han demostrado que la inyección intracarotídea de BPA y BSH aumenta al doble la incorporación de boro en el tumor comparado con la inyección intravenosa en el mismo modelo. Esta concentración aumenta cuatro veces cuando la barrera se permeabiliza por el uso de manitol. En contraste, los valores de boro en el cerebro normal 2,5 h post-inyección fueron similares para todas las rutas. Los estudios de BNCT realizados por el grupo de Barth en el Brookhaven National Laboratory (BNL) permitieron comparar la eficacia terapéutica de la inyección i. v. vs i. c. con y sin alteración de la BBB. La sobrevivencia de los animales que recibieron BPA ó BSH i. c. con ruptura de la barrera aumentó en 188% y 117% comparado con los controles irradiados. El mejor resultado fue obtenido utilizando ambos compuestos en combinación con la inyección i. c. y la permeabilización de la barrera. Un 25 % de las ratas portadoras del glioblastoma F-98 evidenciaron, por primera vez, cura total (Barth R. F. y col. , 1997; Yang W. y col. , 1997).

La inyección intraperitoneal produce mayores concentraciones de boro en glioblastoma de rata que la inyección intragástrica en el mismo modelo. Cuatro horas después de una inyección de 1200 mg/kg de BPA-F la concentración de boro en el tumor fue de $89,6 \pm 7,6$ ppm comparado con $39 \pm 5,12$ ppm 3 h después de la administración de dos dosis intragástricas de 700 mg/kg.

En conjunto, estos resultados demuestran que puede obtenerse una importante ganancia terapéutica optimizando la oferta de los compuestos borados.

Existe una gran cantidad de compuestos borados llamados de 3° generación desarrollados con el fin de lograr una incorporación mayor y más selectiva dentro de las células tumorales. No todos los compuestos han sido exitosos y hasta la fecha ninguno de ellos pudo incorporarse a los protocolos clínicos. Sin embargo algunos de ellos han arrojado resultados sorprendentes en términos de incorporación y selectividad. En particular queremos destacar un compuesto desarrollado por la Dra. Michiko Miura y colaboradores del Medical Department de Brookhaven National Laboratory, Upton, New York. Se trata de una Carboraniltetrafenilporfirina lipofílica llamada CuTCPH una la cual se puede clasificar dentro del grupo de las tetrafenilporfirinas ó TTPs. En la Figura 12 puede verse su estructura.

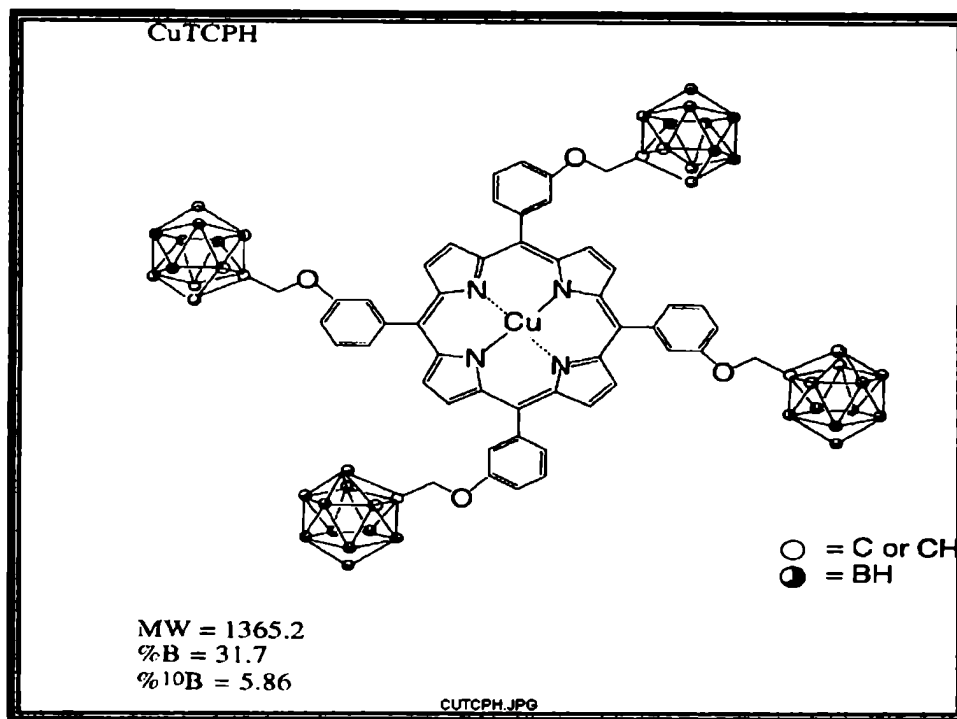


Fig 12: Estructura del CuTCPH. Se observa el núcleo porfírico con la inserción de un átomo de Cobre y 4 grupos borados que aportan en total 40 átomos de Boro por molécula. El compuesto es de carácter lipofílico.

A diferencia del BPA que posee un átomo de boro por molécula, el CuTCPH contiene cuatro grupos borados (Boron Cage) con 10 átomos de boro cada uno insertados en el núcleo de la porfirina, resultando en una cantidad total de 40 átomos de boro por molécula. En el centro del núcleo se encuentra un átomo de Cobre (Cu^{67} ó Cu^{64}) el cual puede ser detectado por métodos no invasivos como la tomografía computada de emisión de fotones simple (SPECT) ó la tomografía de emisión por positrones (PET), dado que dicho compuesto es estable in vivo (Miura M. y col. , 2001). La posibilidad de detectar el compuesto en forma no invasiva constituye una ventaja muy importante con respecto a otros compuestos usados en BNCT. Esto permitiría diseñar el protocolo de irradiación con datos certeros de contenido de boro en tejidos para cada paciente. Los métodos habituales suponen una localización homogénea y se basan en la obtención de valores promedio de boro en el tumor y en el tejido normal en el momento de la cirugía. La extrapolación al momento de la irradiación en el cual se irradia el tumor residual aproximadamente 3 semanas post-cirugía conlleva incertezas. Más aún, el uso de valores promedio para distintos pacientes también introduce errores.

Existe una gran variedad de porfirinas sintetizadas para estudios de BNCT. Sin embargo el mayor problema es que a las concentraciones terapéuticas resultan sumamente tóxicas, por lo cual muchas de ellas han caído en desuso. La característica más notable del CuTCPH es que combina una altísima selectividad y persistencia en el tumor con una muy baja toxicidad. Estudios realizados por Miura y col. en ratones y ratas han demostrado que el CuTCPH no es tóxico aún a dosis cuatro veces mayores ($200\mu\text{g}$) que las necesarias. En general, puede decirse que las especies insolubles en agua (TTPs) resultan menos tóxicas y llevan mayor cantidad de boro al tumor que las TTPs solubles en agua y análogos del hemo (Miura M. y col. , 1998).

Uno de los compuestos ensayados por Miura M. y col. (1998) NiTCP-H es capaz de llevar mas de 100 ppm de boro al tejido tumoral con una relación de tumor/sangre mayor a 500:1 y tumor/cerebro de 50:1, 4 días después de 6 inyecciones de $32\mu\text{g/g}$ p.c. cada una dadas en 2 días sucesivos. Este compuesto en ratones no resultó tóxico aún a dosis de $20\mu\text{g/g}$ p.c. (200 mg/kg de p.c.).

Se ha comparado la incorporación de boro en el tumor y tejidos normales mediada por el CuCTPH y por los compuestos tradicionales: BPA y BSH en un modelo de carcinoma de mama EMT-6 implantado en ratones BALB/c (Miura M. y col. , 2001). Los 3 compuestos fueron administrados en forma intraperitoneal con una inyección simple. Las dosis fueron similares: 53 mg boro/kg p.c. para el BPA, 45 mg boro/kg p.c. para el BSH y 32 mg boro/kg p.c. con CuTCPH.

La mejor relación tumor/sangre lograda con CuTCPH fue de 42:1 a las 48 h post-inyección. Esta relación fue muy superior a la relación de 2:1 y 1:1 lograda con BPA y BSH a las 3 hs y 6 hs post-inyección respectivamente. Cuando se administran 6 dosis de CuTCPH la relación tumor/sangre asciende a 300:1 luego de 2-6 días post-inyección. En resumen, puede decirse que el compuesto CuTCPH es superior a los compuestos tradicionales como transportador de boro en un modelo de carcinoma de mama implantado en forma subcutánea.

2. 3. ESTUDIOS DE BNCT EN DISTINTOS MODELOS EXPERIMENTALES

Todos los modelos animales utilizados en BNCT que han sido descriptos en la literatura se basan en la implantación de células tumorales en un lecho de tejido sano que frecuentemente no corresponde al tejido sano que da lugar a la formación del tumor. Se han utilizado ratas portadoras de tumores cerebrales generados por la implantación de células tumorales de gliosarcoma 9L ó GS-9L (Coderre J. A. y col. , 1992) y glioblastoma indiferenciado F98 (Clendenon N. R. y col. , 1990) en el cerebro de ratas Fischer 344, tumores mamarios murinos (KHJJ) implantados en ratones BALB/c (Coderre J. A. y col. , 1990), tumores SCCVII en ratones C3H/He, explantes de glioma humano U-87 MG s. c. en ratones nude, entre otros(Ono K. y col. , 1999).

La terapia de BNCT resultó efectiva en la cura de distintos tumores experimentales como los sarcomas murinos implantados subcutáneamente en el muslo del ratón, utilizando pentaborato de sodio (como portador de boro) y neutrones térmicos del haz de neutrones de BMRR (Farr L. E. y col. ,1967). El BNCT mediado por BPA inhibió el crecimiento de melanomas con alta tasa de cura en ratones, hámsters y cobayos (Mishima Y. y col. ,1983; Coderre J. A. y col., 1992). El BPA también resulto efectivo en estudios de BNCT en explantes de melanoma de hámsters implantados en el ojo de conejos (Packer S. y col. , 1992).

El primer tratamiento exitoso para tumores de cerebro experimentales fue llevado acabo por Joel y col. (Joel D. D. y col. , 1990) utilizando la forma dimérica del BSH en combinación con neutrones térmicos en el BMRR. Este estudio fue seguido en 1992 por otro realizado en gliosarcoma de rata 9L utilizando BPA (Coderre J. A. y col. , 1992). Dichos experimentos fueron repetidos en 1994, y se observó un alto porcentaje de control del tumor (100%, n=16) sin daño al tejido normal circundante en la mayoría de los animales que sobrevivieron (Coderre J. A. y col. , 1994). El análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) de dichos sobrevivientes mostró una cicatriz en el sitio de implantación del tumor en todos los animales curados. Un año post-tratamiento las ratas tratadas con BNCT exhibieron un tejido cerebral relativamente normal por análisis de microscopía óptica y

electrónica. Se observaron vasos sanguíneos intactos atravesando la cicatriz tumoral. En contraste, los sobrevivientes de largo plazo irradiados con rayos X demostraron una extensa atrofia cortical, pérdida de neuronas y ruptura de la barrera hematoencefálica particularmente rodeando la cicatriz del tumor. (Coderre J. A. y col. , 1994).

Estudios adicionales realizados por Saris y col. , (Saris S.C. y col. , 1992) utilizando el glioma murino GL 261 y Matalka y col. , (Matalka K. Z. y col. , 1993) utilizando una línea celular de melanoma humana (MRA 27) implantada en el cerebro de ratas nude también demostraron la eficacia de la terapia de BNCT con BPA.

El tumor de células F98 ha sido muy utilizado en laboratorios de EE.UU.. Fue producido inicialmente por Wechsler en el laboratorio Koestner de la Universidad de Ohio State mediante la administración de una dosis simple de N-ethyl-N-nitrosurea (ENU) (50 mg/kg de peso corporal) a ratas Fischer preñadas en el día 20 de gestación. El crecimiento in vitro de las células F98 fue descrito en detalle (Ko L y col. ,1980) y clasificado como un glioma anaplásico o indiferenciado.

Este tumor ha sido refractario a la quimioterapia con 1-(4 amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosureahydrochloride (ACNU) radioterapia (Kaneko S. 1983) y a la inmunoterapia adoptiva (Tzeng J-J y col. ,1990). El patrón de crecimiento dentro del cerebro es de tipo infiltrante siendo a su vez muy poco inmunogénico (Tzeng J-J y col. , 1991). Un inóculo intracerebral de 10 células mata invariablemente a los animales. Las características descritas están intimamente relacionadas con el comportamiento del glioblastoma humano y por esta razón resultó un modelo muy bueno para los estudios de BNCT (Barth R. F. y col. , 1998).

Las ratas portadoras del tumor F98 tratadas con BNCT han mostrado un aumento considerable en la supervivencia. La sobrevida media de los animales no tratados fue de 20 días luego de la implantación del tumor, de 25 días luego de la irradiación con neutrones solos y de 60 (8,9 Gy-eq) y 120 días (13,4 Gy-eq) luego del tratamiento con BNCT, incluyendo sobrevivientes de largo plazo (12-15 meses). Los tiempos de sobrevida luego del BNCT con p-BPA intragástrico (i. g.) fueron significativamente mayores que los obtenidos con dosis de 15, 22,5 y 30 Gy de

rayos X de 250 kVp. En el momento del BNCT los niveles de ^{10}B en el tumor fueron de alrededor de 40 ppm y las relaciones tumor/sangre y tumor/cerebro normal fueron de 3,3:1 y 3,9:1 respectivamente (Coderre J. A. y col. ,1992).

La técnica de BNCT con inyección intragástrica de BPA fué posteriormente mejorada con diversas estrategias de inyección con el fin de llevar mayor cantidad de ^{10}B al tumor. También se estudió la administración de p-BPA en forma de complejo con fructosa (BPA-F) lo cual aumenta su solubilidad. Luego de 4 h de una inyección intraperitoneal (i. p.) de 1200 mg/kg de BPA-F la concentración de boro en el tumor, sangre, y cerebro normal fue de $89,6 \pm 7,6$, $27,7 \pm 2,8$ y $17,5 \pm 1,5$ ppm de ^{10}B respectivamente. Las dosis físicas absorbidas por el tumor fueron de 17 y 31,5 Gy. Todas las ratas que recibieron BPA-F i. p. y neutrones térmicos sobrevivieron más de 8 meses. La incorporación preferencial de BPA y BSH por dicho tumor ha sido aumentada considerablemente por la rotura de la barrera hematoencefálica con una inyección intracarotidea de manitol (Yang W. y col. , 1996; Yang W. y col. , 1997). Se ha observado un aumento dramático de la inhibición del crecimiento de dichos tumores luego del tratamiento de BNCT cuando el BPA y BSH fueron combinados con el manitol (Barth R. F. y col. , 1997).

Se han realizado estudios de BNCT utilizando nuevos compuestos de boro. En particular se ha descrito el primer caso de la respuesta al BNCT mediada por porfirinas boradas que ha resultado efectiva en el control de tumores de mama EMT-6 implantados subcutáneamente en la pata de ratones BALB/c (Miura M. y col. , 2001). El mejor resultado en cuanto al control del tumor se logró con una dosis absorbida (considerando un promedio de $85 \mu\text{g/g}$ ^{10}B en el tumor) de 66 Gy con un porcentaje de animales (71%) que no mostraron signos de recurrencia a un año post-tratamiento. Los efectos observados en dichos animales fueron una pérdida de pelo transiente, no se observó daño en la piel de la pata irradiada como tampoco en otras partes del cuerpo. La única disfunción motora observada en la pata irradiada fue, en el 60% de los casos, una hiperflexión que no dificultó su locomoción. Los estudios histológicos sobre cortes de la pata irradiada no muestran diferencias con respecto a la pata contralateral. En resumen estos resultados demostraron que la eficiencia del BNCT mediado por CuTCPh en el control del tumor es similar a la de una dosis de 42 de 100kVp de rayos X pero con la ventaja que genera un daño

significativamente menor a los tejidos normales situados en el campo de irradiación tales como la piel y el músculo.

Se ha estudiado también el efecto del BNCT en los tejidos orales normales de rata los cuales limitarían la dosis al tumor en el tratamiento de tumores de cerebro humano. Tres horas después de una inyección i. p. de 700 mg/ kg de p-BPA-F, la concentración de ^{10}B en sangre y en mucosa de lengua fue de 21 y 23 ppm respectivamente. La dosis física requerida para obtener un 50 % de ulceración (DL_{50}) para la mucosa ventral de la lengua después de la irradiación con rayos X fue de 13,4 Gy, para neutrones solos de 4,2 Gy y para BNCT de 3,0 Gy. En la mucosa ventral de la lengua de ratón el efecto es comparable: la dosis requerida para obtener un 50 % de ulceración (DL_{50}) fue de 16,8 Gy (Moses R. y col. ,1986). Normalmente el tiempo de aparición de las úlceras es de 6-7 días independientemente del tipo de radiación. La cicatrización estuvo relacionada con la dosis y fue relativamente rápida (aproximadamente de 19 días). En resumen la reacción de la mucosa de la lengua ventral de la rata a la irradiación con distintas modalidades fue caracterizada por la aparición de eritema seguido de ulceración y cicatrización.

Con relación a 100 kVp de rayos X, el RBE fue de 3,2 para neutrones solos y 4,9 para los productos de la reacción de captura en boro (ver sección Radiobiología). La mucosa oral es sensible a la irradiación mediada por neutrones y podría constituir un tejido limitante de la dosis en la aplicación del BNCT a tumores cerebrales o a tumores de cabeza y cuello.

2.4. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DEL TEJIDO TUMORAL Y DE LOS TEJIDOS NORMALES AL BNCT

La respuesta del tejido tumoral al BNCT ha sido evaluada empleando distintos criterios según los modelos animales utilizados. Se ha evaluado con un criterio macroscópico la supervivencia de los animales con tumor luego del BNCT y la reducción del volumen tumoral en tumores intracraniales (Farr L. E. y col. , 1967; Coderre J. A. y col. , 1992; Matalka Z. M. y col. , 1993) y melanomas (Coderre J. A. y col. , 1991). Para los tumores de cerebro se ha podido diagnosticar la desaparición ó necrosis de la masa tumoral mediante técnicas no invasivas como la RMN. Se ha observado una cicatriz que aparece en la imagen de RMN como una zona de menor intensidad de color en ratas sobrevivientes a largo plazo luego del tratamiento con BNCT-BPA-F. Esta cicatriz tumoral corresponde a una zona acelular con una matriz de colágeno (Coderre J. A. y col. , 1993).

Los estudios histológicos han servido para corroborar observaciones macroscópicas y han servido de base para explicar o entender mediante qué mecanismo la reacción de BNCT podría provocar la muerte de las células donde se produjo la reacción de captura. También se han realizado numerosos estudios in vitro utilizando cultivos de células cancerosas tales como ensayos clonogénicos (Wittig A. y col. , 1998), evaluación de formación de micronúcleos (Ono K. y col. , 1999), frecuencia de mutaciones (Poller F. y col. , 1996; Kinashi Y. y col. , 2000) entre otros.

Los tejidos normales que pueden limitar la dosis en los tratamientos de BNCT dependen en parte del tumor tratado y de su localización. Sin embargo, se puede considerar que hay tejidos comunes como la epidermis y la sangre que estarán presentes en todos los casos y deben ser considerados en el momento de calcular la dosis que se entregará durante el tratamiento.

Dependiendo de la dosis utilizada la piel irradiada exhibe efectos característicos que en orden de severidad creciente incluyen: eritema, descamación seca, pérdida del pelo, descamación húmeda y finalmente necrosis dérmica. Una dosis única de 18 Gy produce descamación húmeda que generalmente indica el

límite de tolerancia en radioterapia clínica (Douglas B. G., 1982). Las dosis simples sustancialmente mayores que 18 Gy producen un daño crítico en la vasculatura de la dermis que lleva a la necrosis. Dependiendo de la energía de los fotones, la dosis única máxima tolerada por la piel humana (tomando la necrosis dérmica como parámetro de evaluación o "end point") se estima en un rango de 22,5-30 Gy (Cohen L., 1966).

Se ha descrito la respuesta al BNCT de la piel de rata utilizando BPA y BSH (Morris G. M. y col. , 1994c) tomando en cuenta los mismos "end points" descritos anteriormente. Esta respuesta se produce en dos fases: las reacciones agudas se caracterizan por la aparición de eritema y descamación húmeda a las dosis más altas (20,9-24,3 Gy-Eq) 11-21 días post-irradiación. Como respuesta tardía se observa necrosis de la dermis a las 24-25 semanas post-irradiación con una cicatrización que se prolonga para las dosis más altas y se completa 42-43 semanas después de la irradiación. En todos los casos se observa pérdida del pelo para dosis de 12,5-24,3 Gy-Eq (BPA).

La reacción de otro tejido normal como la mucosa ventral de la lengua de rata a diferentes modalidades de radiación -incluido el BNCT mediado por BPA- es monofásica y se caracteriza por eritema seguido de ulceración y cicatrización. Las úlceras se observan con todas las modalidades de tratamiento a los 6-8 días post-irradiación (Coderre J. A. y col. , 1999b). Se encontró una respuesta monofásica similar en la mucosa de lengua y labio de ratón (Parkins C. y col. , 1983; Ang K. K. y col. , 1985; Dörr W. y col. ,1993; Morris G. M. y col. ,1993) y mucosa oral humana (Dutreix J. y col. , 1971; Van der Schueren E. y col. ,1983) luego de la irradiación con fotones.

Existe una amplia evidencia de la activación del proceso de apoptosis en respuesta a radiaciones ionizantes en adición a los mecanismos ya descritos como los cortes doble cadena que matan ó esterilizan las células en respuesta a dichas radiaciones. Se ha estudiado la apoptosis en respuesta al BNCT de tumores intracraneales F-98 implantados en rata Fischer (Domet M. A. y col. trabajo en curso). Este proceso de muerte celular programada puede ser completado en un período tan corto como 4 horas (Bosman F. T. y col. , 1996). Este hecho determina que haya solo una pequeña ventana temporal para determinar si un estímulo específico

es capaz de inducir apoptosis. Los estudios in-vivo de Domet M. A. y col. han demostrado sin lugar a dudas que el BNCT produce un aumento del número de células apoptóticas, que fue máximo a las 6 h post-tratamiento, comparado con lo que ocurre en los animales control. Este hallazgo resulta sumamente interesante. Así, la apoptosis podría constituir un mecanismo de amplificación muy importante por el cual las células tumorales que contengan menor concentración de boro ($<10^9$ átomos de ^{10}B por célula) podrían morir por apoptosis inducida por células tumorales adyacentes con mayor contenido de boro. Este proceso de amplificación se denomina efecto "bystander" y se refiere a los efectos biológicos en células no irradiadas que ocurren como resultado de la exposición de células vecinas a dosis muy bajas de radiación.

El efecto "bystander" se ha evidenciado utilizando radiación de bajo y alto LET, si bien se postula que ocurriría por mecanismos diferentes en ambos casos. Recientemente se ha descrito (Seymour C. B. y Mothersill C. 2000; Lyng F. y col. , in press; Mothersill C. y col. , in press; Mothershill C. y col., 2000) que la exposición de células en cultivo y explantes de tejido a muy bajas dosis de rayos gamma ^{60}Co (1 cGy-5 Gy) inducen la producción de uno o varios factores que son liberados por las células irradiadas. Los mismos pueden aumentar la muerte celular por apoptosis y necrosis, reducir la eficiencia de plaqueo, e inducir la síntesis de proteínas involucradas en el control de la muerte celular en células que nunca estuvieron expuestas a la radiación.

Nagasawa y Little (1992) han descrito la existencia del efecto bystander con radiaciones de alto LET a muy bajo flujo. Ellos han demostrado que si se utiliza una fluencia muy baja de partículas alfa, la probabilidad de que una célula sea atravesada por una de ellas es menor que uno. En estas condiciones se ha encontrado intercambio de cromátidas hermanas en células que no habían recibido impacto alguno. (Nagasawa H. y Little J. B. 1992). Estos estudios han sido confirmados y extendidos por Azzam y col. (Azzam E. I. y col. , 1998; Azzam E. I. y col. , 2000) y Deshpande y col. (1996). El hallazgo más importante de Azzam y col. fué que en dicha respuesta estaban involucradas las uniones estrechas entre células (GAP) mediadas por conexinas. Cuando dichas uniones fueron bloqueadas con un inhibidor de las conexinas, el efecto bystander fue abolido.

El efecto bystander es actualmente objeto de numerosos estudios. Independientemente del mecanismo involucrado, resulta claro que los conceptos previos acerca de la relación dosis-efecto relacionados con la inestabilidad genómica deberían ser modificados para considerar la contribución del efecto bystander a bajas dosis.

2.5. ANÁLISIS DE BORO

Desde el punto de vista de la química analítica, ya sea clásica como instrumental, el boro es un elemento que acarrea dificultades en su detección, determinación, separación química y especiación, debido fundamentalmente a sus propiedades físico-químicas.

Dependiendo de la concentración y la masa de muestra disponible, la determinación cuantitativa de boro en materiales biológicos puede llevarse a cabo por diferentes técnicas, tales como absorción atómica (con llama ó con atomización electrotérmica), espectrofotometría, potenciometría, titrimetría, emisión atómica, espectrometría de masas, y activación neutrónica (prompt gamma). Los métodos de espectroscopía de absorción atómica se encuentran entre los más adecuados para la medición de bajas concentraciones, pero la formación de carburos de boro en la llama o en los atomizadores del tubo de grafito afecta desfavorablemente la repetibilidad de los resultados. La determinación rápida y con alta sensibilidad puede realizarse por espectroscopía de emisión atómica con plasma inductivo (ICP-AES), con la ventaja adicional de una reducción en las interferencias químicas generadas por la matriz. Esta técnica ha sido adoptada por la mayoría de los centros internacionales dedicados a llevar a cabo la técnica del BCNT. Solo es superada en índices de performance analítica (límites de detección menores) por la espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

El ICP-AES posee alto poder de detección en la zona de los ng/g, potencialidad de hacer un análisis multi-elemental en la misma muestra, buena reproducibilidad, está libre de errores sistemáticos y es de fácil calibración. Existen centros que usan o utilizaron en algún momento el espectrómetro de fuente de plasma de corriente continua ó DCP para las determinaciones de boro. Estos

instrumentos trabajan con una fuente de excitación de fuente continua (arco de corriente continua) y poseen ciertas características que los sitúan en un lugar inferior al ICP-AES. Es un instrumento sensible pero que exhibe poca reproducibilidad y fenómenos de autoabsorción. Los átomos de un elemento en estado fundamental absorben la emisión de otro átomo excitado previamente debilitando la intensidad del flujo de fotones, malográndose así la relación lineal esperada.

La determinación de ^{10}B por técnicas nucleares (Prompt gamma) es un método utilizado tradicionalmente en el que se observa la emisión gamma de 478 keV del decaimiento del núcleo de ^7Li (generado por la reacción de captura en boro) a su estado fundamental. Esta técnica no requiere de una preparación especial de la muestra, es no destructiva, pero es de implementación dificultosa. El sistema debe estar asociado al flujo de neutrones proveniente de un reactor a potencias del orden de los MW y el haz de neutrones incidente sobre la muestra debe ser filtrado para eliminar la radiación gamma proveniente del reactor. Se deben utilizar geometrías especiales y materiales absorbentes, y se deben implementar técnicas de difracción de neutrones para desviar las componentes de interés del haz hacia la muestra. Es necesario contar con un sistema de espectroscopía gamma de alta resolución, el que debe ser ubicado cercano a la muestra para aumentar la eficiencia. De esta manera el detector puede estar de sujeto a daños importantes por radiación. Se la utiliza principalmente en la medición on-line de boro durante la irradiación con neutrones en los tratamientos clínicos en los cuales la dosis de neutrones se corrige permanentemente teniendo en cuenta la concentración de boro en sangre.

3. OBJETIVOS

El objetivo general fue realizar estudios de BNCT en un modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster para estudiar una nueva aplicación del BNCT a nivel experimental y realizar estudios básicos que contribuyan al conocimiento de la biología y radiobiología del BNCT. Para ello se plantearon los siguientes objetivos principales:

3.1. Estudios preliminares de BNCT en ratas Fischer portadoras de glioblastoma

Es de notar que el proyecto de BNCT iniciado en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) constituye el primer intento de iniciar un proyecto de investigación a nivel básico y aplicado en BNCT en la Argentina. Por este motivo y dado que esta técnica presenta aspectos sumamente complejos, fue necesaria la puesta a punto de numerosos pasos técnicos que llevarían a la implementación de proyectos de investigación y aplicaciones clínicas. Es decir que no existía al momento de iniciarse este trabajo ninguna experiencia previa con relación a este tema. Fue por tal motivo que el proyecto fue orientado en una primera instancia a corroborar que el sistema implementado arrojará resultados confiables, coherentes con datos de la bibliografía internacional, antes de desarrollar un modelo animal completamente novedoso como el de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Por lo tanto en una primera instancia el esfuerzo estuvo dirigido a reproducir el modelo de ratas portadoras de glioblastoma F-98 intracranial en rata Fischer.

3.2. Estudios de BNCT en el modelo de Cáncer Oral en la Bolsa de la Mejilla del Hámster

Una vez que las diversas técnicas fueron puestas a punto en un modelo conocido, el objetivo fue el de realizar estudios para proponer el uso del modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster para investigación básica y aplicada en BNCT y luego emplear el mismo para abordar distintas áreas de interés en BNCT.

3.3. Objetivos Específicos:

- Realizar estudios de biodistribución y biocinética con BPA-F, un compuesto borado que se ha empleado en los ensayos clínicos en pacientes de glioblastoma multiforme y melanoma.
- Dentro del contexto de la búsqueda de nuevos compuestos borados cuya incorporación al tumor sea mayor y más selectiva, se propuso realizar un estudio de biodistribución y biocinética de un nuevo compuesto borado, una carboraniltetrafenilporfirina borada (CuTCPh) para evaluar su potencial ventaja terapéutica respecto del compuesto tradicional.
- Determinar las variables biológicas de un tumor que modulan la incorporación del compuesto borado.
- Estudiar la respuesta macroscópica y a nivel celular del tumor, del tejido precanceroso y del tejido normal al tratamiento con BNCT (administración de compuesto borado y posterior irradiación con un haz de neutrones térmicos).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Técnicas de inyección en Hámster y Rata

Se puso a punto la inyección intraperitoneal e intrayugular de los compuestos de boro (ácido bórico, ácido bórico enriquecido y BPA-F) en rata y hámster. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilazina i. p. y luego se inyectaron utilizando una u otra vía. Para la inyección i. y. se realizó la cirugía para exponer la vena yugular e inmediatamente se inyectó la solución con el compuesto correspondiente con una jeringa de 1 ml y agujas de 26 G. Posteriormente se realizó la sutura del tejido. El volumen administrado por vía intrayugular fue de 0,2 ml/100g de p. c. y hasta 2ml/100g de p. c. en la inyección intraperitoneal. Por este motivo se prepararon 2 soluciones de distinta concentración en todos los casos. Las primeras pruebas se realizaron con Azul de Evans o solución fisiológica para evaluar la sobrevida del animal después del procedimiento. Se usó la misma técnica para los estudios de biodistribución y BNCT. En todos los casos la sobrevida fue del 100 %.

4.2. Técnicas de anestesia en Hámster (*Mesocricetus auratus*) y Rata

La puesta a punto de esta técnica resultó clave para el posterior uso de los animales en la terapia de BNCT. Los animales debían permanecer 1 h inmovilizados durante la irradiación en el reactor. Asimismo, la anestesia debía ser segura para el animal. La irradiación con neutrones demanda un gran esfuerzo de todo nuestro grupo. Esto hace particularmente importante que todos los pasos técnicos estén debidamente ajustados. En el caso de los estudios de biodistribución, también fue muy importante que los animales estuvieran adecuadamente anestesiados con el fin de evitar el dolor en el paso de toma de muestras de sangre y tejido.

Se probaron distintas combinaciones de ketamina/xilazina inyectadas como una mezcla por vía intraperitoneal. Se tomaron como referencia valores de la bibliografía basados en estudios en ratas Fischer, una mezcla de ketamina 15 mg/100g - xilazina 2,4 mg/100g (Van Pelt L. F. 1977). Con dicha concentración las ratas se murieron a 5 minutos post-inyección. Se probó también ketamina sola a

una concentración de 15mg/100g y también resultó letal (4 ratas en total). En el caso de los hámsters, con dicha mezcla los animales permanecieron anestesiados durante 40 minutos (3 hámsters) y con ketamina sólo 25 minutos (3 hámsters). Luego de esta experiencia se probaron distintas proporciones de la mezcla anterior hasta que finalmente, habiendo hecho pruebas en un total de 10 ratas y 28 hámsters, se obtuvieron las siguientes dosis que combinadas, resultaron efectivas, reproducibles y seguras en todos los experimentos realizados. La duración de la misma fue de: 60 minutos para hámsters y 120 minutos para ratas.

	Ketamina	Xilazina
Rata	9 mg/100g	1,3 mg/100g
Hámsters	13,9 mg/100g	2,1 mg/100g

4.3. Cultivo de células F-98 (glioblastoma de rata Fischer)

La línea tumoral F-98 (glioma indiferenciado de ratas Fischer) fue cedida por el Dr. R. Barth (Department of Pathology, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA) al Dr. Mario Pisarev, Jefe del Departamento de Radiobiología de CNEA. Estas células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle (D-MEM), suplementado con 3,7 g/L de bicarbonato de sodio, 1% de aminoácidos esenciales, 10 % de suero fetal bobino (SFB), 100 mg/L estreptomicina y 1000.000 U/L penicilina. Antes de sembrarlas, las células fueron teñidas con Tripán Blue, contadas en una cámara de Neubauer y sembradas en botellas de 25 cm² en cantidades del orden de 5×10^5 . Luego se incubaron a 37 ° C en una atmósfera con 5 % de dióxido de carbono. Cuando las células llegaron a la fase de quiescencia (aprox. 48 h) fueron despegadas con 1 ml de tripsina-EDTA 0,25%. Una vez centrifugadas y resuspendidas en medio, fueron sembradas en botellas de 25 cm² con 5 ml de medio fresco de manera de continuar su propagación.

Preparación de las células: Se preparó un inóculo de células F-98 para ser implantadas en el hemisferio cerebral izquierdo de ratas Fischer. Este trabajo se realizó en colaboración con la Lic. A. Dagrosa del Departamento de Radiobiología de CNEA. Las células fueron teñidas con Tripan Blue y contadas en una cámara de Neubauer. Se realizaron diluciones de las mismas hasta llegar a una concentración de 5000-10000 células en 5 μ L de medio de cultivo. Al mismo tiempo se preparó una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (Agarose Type VII: Low Gelling Temperature, SIGMA). Cuando la temperatura de la agarosa alcanzó los 37°C, 5 μ L de la misma fueron mezclados con 5 μ L de la solución de células. Por último, el inóculo de 10 μ L de células en agarosa al 1% fue sembrado en una placa de 6 cm de diámetro con 4 mL de medio D-MEM y 10% de SFB e incubada en estufa a 37° C. A las 48 h se comprobó que las células crecían normalmente.

Implantación de células en el cerebro de rata: Las células F-98 en proliferación fueron tratadas con tripsina y disueltas según el protocolo anterior en una concentración de aprox. 5000 cél/10 μ L de medio de cultivo D-MEM con y sin agarosa al 1%. La solución fue mantenida a 37°C en estufa hasta el momento de la implantación.

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina/xilazina (9 mg/100g-1,3/100g de p. c. respectivamente) de a una por vez. Los animales anestesiados fueron inmovilizados, se les cortó el pelo de la cabeza y se realizó una incisión en el cuero cabelludo en la línea media de la misma. Se midieron las siguientes coordenadas con una regla: 4 mm a la izquierda de la línea media, 1 mm anterior al Bregma y sobre ese punto se atravesó el hueso del cráneo con un torno (Dremel Multipro, 10000-37000 rpm) con cuidado de no dañar la masa cerebral. Se realizó el entrenamiento previo necesario para realizar este procedimiento sin la necesidad de emplear un equipo de estereotaxia.

La suspensión de células (aprox. 5000 cél/10 μ L) con agarosa fue implantada con una jeringa Hamilton de 1ml a 5 mm de profundidad desde la superficie del hemisferio cerebral izquierdo, a través del orificio producido en el cráneo. Se tomaron las coordenadas descriptas para implantar las células en el "núcleo

caudado”, uno de los núcleos basales que corresponden a masas de sustancia gris ubicadas profundamente dentro del cerebro. Se sabe que los tumores de los núcleos caudado o lentiforme pueden causar severos síntomas motores o sensitivos en el lado opuesto del cuerpo y por lo tanto resulta fácil detectar el crecimiento tumoral.

Una vez terminada la inyección se realizó la sutura de la piel de la cabeza de la rata y se le administró un antibiótico (Oxitetraciclina: 5 cucharadas/litro) para prevenir infecciones dado que todo el procedimiento se realizó en un ambiente limpio pero no estéril.

Las ratas fueron sacrificadas a partir del día 14 momento en el cual, según datos bibliográficos (Barth R.F. y col. , 1997), el tumor alcanzaría un rango de peso de 89-178 mg (diámetro de 2 mm). Luego del sacrificio se realizaron cortes del hemisferio implantado para localizar la zona de implantación y desarrollo tumoral. Las muestras fueron fijadas en formol 10 %, incluidas en parafina, cortadas y teñidas con Hematoxilina&Eosina. Se realizó el análisis histológico de las muestras.

4.5. Cultivo primario de células de la glía normal de Rata

El cultivo se realizó para la eventual realización de estudios comparativos con células tumorales F-98 empleadas en el modelo de tumor de cerebro en rata Fischer. Para su preparación se utilizaron ratas Wistar de 3 a 5 días de vida, de las cuales se extrajeron por técnicas de disección los hemisferios cerebrales. Una vez extraídos se realizó la disgregación enzimática con 5 mL de tripsina-EDTA 0,25% durante 15 minutos a 37°C. La enzima se neutralizó con suero y medio de cultivo y se realizó una disgregación mecánica con pipetas de 10, 5, 2, y 1mL respectivamente. Las células obtenidas fueron centrifugadas y por último sembradas en placas de cultivo con medio F12/D-MEM, suplementadas con 10% SFB, 1.000.000U/L de penicilina, 100 mg/L de estreptomicina y 1,5 mg/L de anfotericina B e incubadas en estufa a 37°C. Al cabo de 48 h (tiempo necesario para que las células se peguen) se extrajo el medio y se lo reemplazó por medio fresco.

4.6. Inducción de Tumores en la Bolsa de la Mejilla del Hámster

Los hámsters Syrian (*Mesocricetus auratus*) fueron sometidos a un protocolo de carcinogénesis química. Se aplicó un carcinógeno químico completo, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), en la bolsa de la mejilla derecha del animal 3 veces por semana durante aproximadamente 12-14 semanas según el protocolo estándar de carcinogénesis (Shklar G. 1979). Los hámsters fueron anestesiados periódicamente y se examinaron las bolsas tratadas con el fin de monitorear el desarrollo tumoral. Una vez que se desarrollaron los tumores exofíticos los animales fueron usados para estudios de biodistribución, farmacocinética de los compuestos borados y BNCT in vivo.

4.7. Estudios de Biodistribución y Biocinética

a) Ácido Bórico

El ácido bórico tiene una abundancia natural de ^{10}B del 20%, es bien tolerado por los animales en las dosis ensayadas y se trata de un compuesto muy barato. Se utilizó este compuesto para poner a punto todos los pasos de los estudios de biodistribución para luego utilizar los compuestos enriquecidos en ^{10}B como el BPA cuyo costo es mayor. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina y Xilazina y luego fueron inyectados con ácido bórico: 10mg/2ml ó 20mg/4ml (i. p.) y 10mg/0,2ml ó 20mg/0,4ml (i. y.). El ácido bórico se disolvió en solución fisiológica y se llevó a pH: 7 con una espátula de bicarbonato de sodio. La inyección se realizó con jeringas de 1ml y agujas de 26 $\frac{1}{2}$ G (i. p.) y 27 $\frac{1}{2}$ G (i. y.). Luego de 2,5 h (i. p.) y 1,5 h (i. y.) se tomaron las muestras de tejido y sangre.

Las muestras se pesaron y luego se almacenaron a -70°C hasta su análisis. La concentración de boro en la muestra fue determinada por espectroscopía de emisión por plasma inductivo de argón (ICP-AES).

b) Borofenilalanina (BPA)

Para realizar los estudios de biodistribución se utilizó la p-borofenilalanina (BPA; L- enantiomero, > 98 % enriquecida en ^{10}B de Boron Biologicals, Inc. Raleigh, NC) conteniendo 4,9 % de boro por peso de BPA. La inyección se realizó con una solución del complejo BPA-Fructosa (BPA-F) preparado a una concentración 0,14 M para administración intraperitoneal (i. p.) y 0,24 M para administración intravenosa (i. v.). El BPA fue convertido en un compuesto más soluble por formación de un complejo con fructosa en una relación 1:1 molar en PBS 1 X. El pH de la solución fue llevado a 9,5-10 para permitir la formación de los complejos. Se utilizó NaOH 10 M y NaOH 1M para el ajuste fino siempre bajo agitación y controlando continuamente el pH. Una vez que todos los sólidos estuvieron disueltos el pH se reajustó a 7,2-7,4 con HCl 6 N y 0,6 N para el ajuste fino. Finalmente la solución se llevó a la concentración adecuada por agregado de PBS 1 X en cantidad suficiente. La solución obtenida es transparente (Yoshino K. 1989, T. R. LaHann 1993). Esta solución fue esterilizada por filtración en un filtro de 0,22 μm de poro (Nalge Company, Rochester, NY.) y almacenada a 4 °C hasta su utilización.

El BPA-F fue administrado intraperitonealmente (i. p.) a dosis de 300, 600 y 1200 mg/kg de peso corporal (p. c.). Los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos post-administración: 0; 0,5; 1; 1,5; 2,5; 3,5, 6 y 12 horas para la dosis de 300 mg/kg. de p. c.. Basados en estos datos, se seleccionó 3,5 h como el mejor tiempo post.administración en relación a los valores absolutos y relativos de boro en tumor. Este tiempo fue seleccionado para realizar la administración de dosis más altas de BPA (600 y 1200 mg). Las muestras de sangre se extrajeron bajo anestesia de la vena yugular con una jeringa con heparina. Se tomaron muestras de sangre, tumor, tejido precanceroso circundante al tumor (bolsa tratada con DMBA), bolsa de la mejilla normal (bolsa no tratada), mucosa de carrillo, mucosa de paladar, piel de carrillo, lengua, hígado, bazo y cerebro. Un lote de hámsters no inyectados fueron usados como control. Las muestras fueron pesadas y almacenadas a -70 °C (tejidos) y 4 °C (sangres) hasta su uso. Las muestras fueron procesadas para el dosaje de boro por ICP-AES como se describe en la sección 4.9 de Análisis de Boro. La concentración de boro se expresó como partes por millón (ppm) de boro o μg de

boro/g de tejido. Se utilizó un mínimo de 5 muestras por condición experimental con un rango de 5-12 muestras.

Se realizó el análisis farmacocinético de la concentración sanguínea de boro en función del tiempo. Para ello los animales se inyectaron por vía intrayugular y a una dosis de 300 mg de BPA/kg de p.c.. Se realizó una inyección "en bolo" en la vena jugular expuesta quirúrgicamente. Los animales fueron previamente anestesiados con una inyección i. p. de ketamina (140 mg/kg) y xilazina (21 mg/kg) seguida de sutura de la piel. La sobrevida de los animales fue del 100%. Se utilizaron 3 animales por punto. El análisis se realizó usando un programa de regresión no lineal (WIN-NONLIN profesional 3.1.). Este estudio se realizó en colaboración con la Dra. Nélida Mondelo del Laboratorio Gador.

c) Carboraniltetrafenilporfirina Borada (CuTCPH)

Se administró la carboraniltetrafenilporfirina borada ó CuTCPH, un compuesto lipofílico, por vía intraperitoneal como emulsión en Cremophor. Se empleó un protocolo de dosis única (32 µg de CuTCPH/g p. c., 10 µg B/g p. c.) y un protocolo de dosis múltiples (4 dosis de 32 µg de CuTCPH/g p. c. cada 12 horas). Los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de sangre y tejidos a distintos tiempos post-administración: 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas en el protocolo de dosis única y 1, 2, 3 y 4 días después de la última inyección en el protocolo de dosis múltiples. Se tomaron muestras de los siguientes tejidos: sangre, tumor, tejido precanceroso circundante al tumor, bolsa de la mejilla normal, mucosa de carrillo, mucosa de paladar, piel de carrillo, lengua, glándula parótida, hígado, bazo y cerebro. Se utilizó un mínimo de 3 muestras por condición experimental, con un rango de 3-6. Se evaluaron animales control sin inyectar.

4.8. Análisis de Boro: Espectroscopía de Emisión Atómica por Plasma Inductivo, ICP-AES (*modelo ICP Optima 3100 XL UV, axial*)

Características del instrumento: A los fines prácticos se definirá un plasma como cualquier volumen de gas, que emite radiación, consistente en una mezcla de partículas neutras (átomos y moléculas) y una fracción significativa de partículas cargadas (iones y electrones), siendo la presencia de estas últimas la responsable de las peculiares propiedades del estado de plasma.

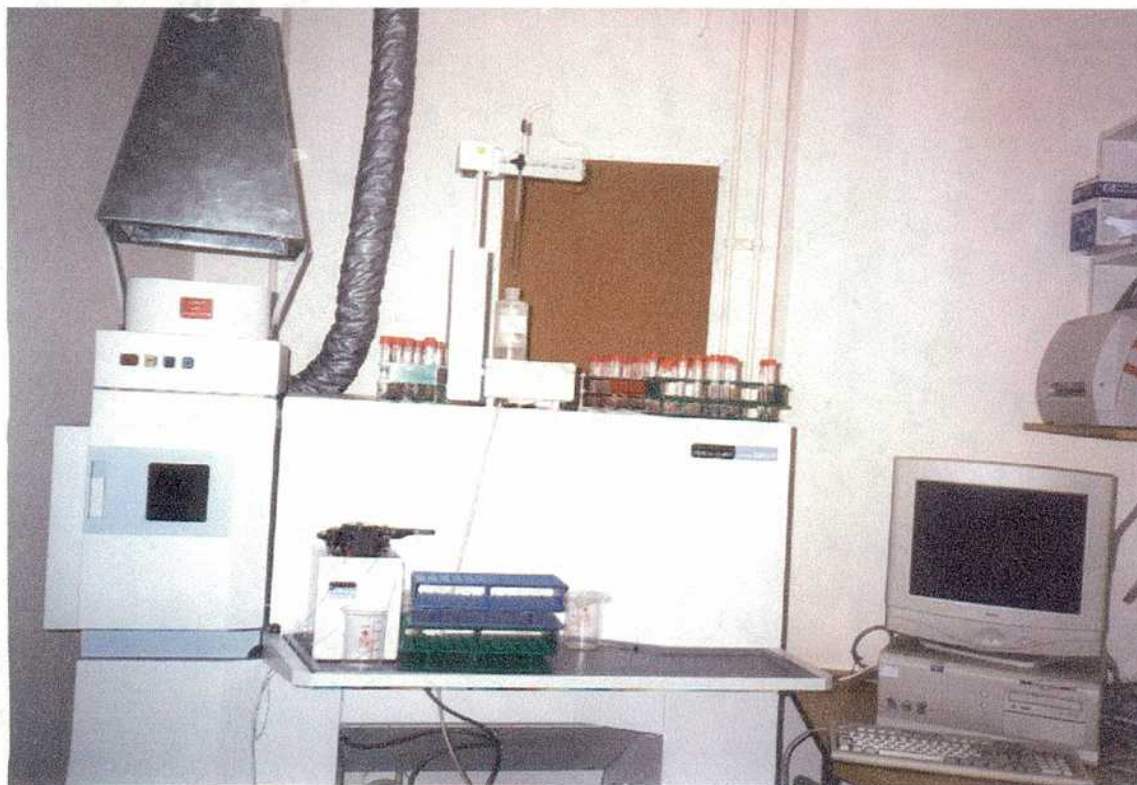


Fig. 13: ICP-AES, foto del dispositivo utilizado.

En un ICP-AES la muestra usualmente se ingresa en el instrumento como un flujo de líquido. Dentro del mismo, el líquido es convertido a un aerosol a través de un proceso conocido como nebulización. La muestra en forma de aerosol es entonces transportada al plasma donde es desolvatada, vaporizada, atomizada y/o ionizada por el plasma. Los átomos e iones excitados emiten su energía característica la cual obedece a un patrón individual (espectro). Esta energía pasa por un dispositivo (en este caso un policromador) que separa la radiación en sus componentes de distintas longitudes de onda. Posteriormente la radiación de interés es detectada y convertida en una señal electrónica que puede ser expresada como una medida de concentración del elemento analizado (Fig. 13-14).

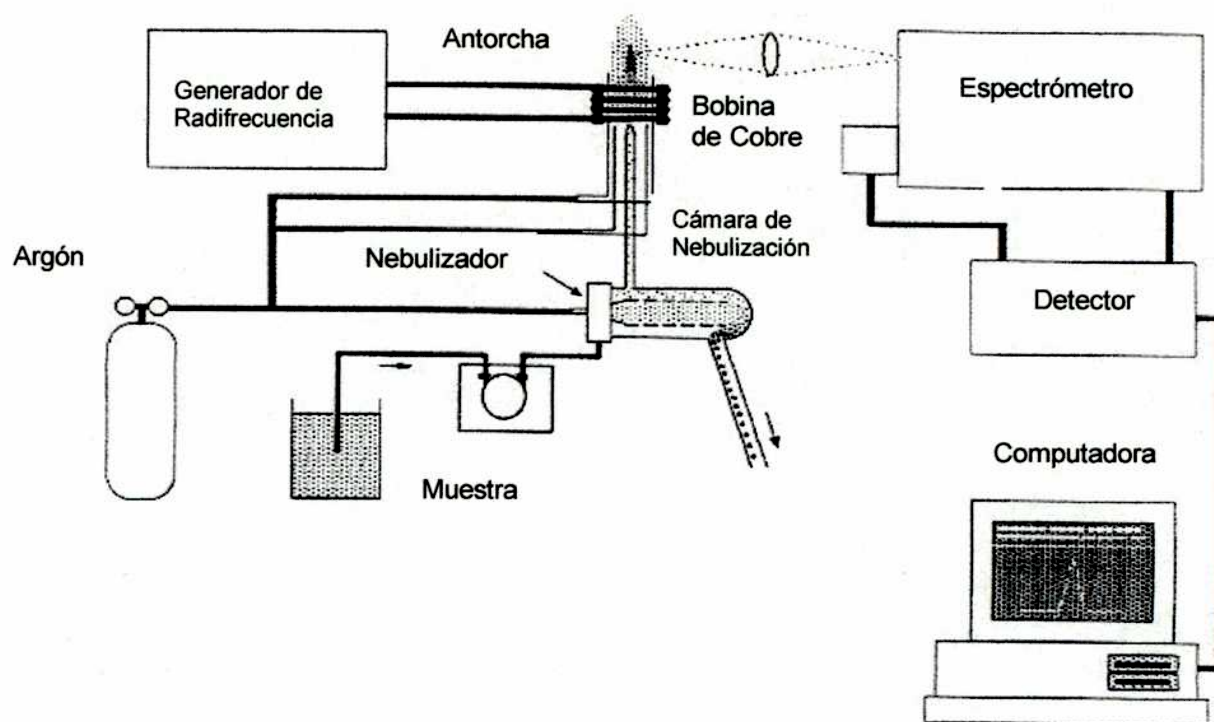


Fig. 13: Esquema básico de un Espectrómetro de Emisión de Plasma.

Componentes: Gas Argón, Antorcha formada por 3 tubos concéntricos de cuarzo o algún material adecuado, Bobina de Cobre en la parte superior de la antorcha conectado a un Generador de Radiofrecuencia refrigerado interiormente con agua, un Generador de radiofrecuencia (RF), Nebulizador, Cámara de Nebulización, Espectrómetro y Detector, Computadora.

La generación del plasma se produce en la antorcha del equipo donde tiene lugar la ionización de los átomos de argón debido a la transferencia de energía desde la bobina de radiofrecuencia y a la excitación de los átomos de la muestra a analizar. Esta antorcha está formada por 3 tubos concéntricos de cuarzo. Por cada uno de ellos circulan distintos caudales de argón con diferentes funciones. El gas exterior que entra tangencialmente a la antorcha es el que forma el plasma por lo que también se lo denomina *Gas Plasmógeno* ó *Cooling* y es el responsable de mantener la llama encendida. Su flujo es muy elevado (12-20 L/m). El flujo intermedio está constituido por el *gas auxiliar*, su flujo es menor (0-2 L/m) y permite optimizar la zona de observación respecto a la parte superior de la antorcha para evitar que ésta se funda. En algunos casos en este gas auxiliar se produce la chispa inicial que inicia la ionización, la cual se mantiene luego por choques entre iones de argón. El flujo de gas central se conoce como *gas portador* ó inyector de la muestra a analizar. Este gas produce un canal central en el plasma por donde pasa la muestra a evaluar. Su flujo es de (0,5-2 L/ m).

Para iniciar la ignición se aplica una chispa a la antorcha donde se encuentra el gas causando la expulsión de algunos electrones de los átomos de argón. A medida que el generador de radiofrecuencia, que está asociado a la bobina, aplica tensión a la misma se genera un campo magnético en la parte superior de la antorcha. El mismo provoca la aceleración de los electrones desprendidos del argón y la colisión de dichas partículas cargadas (electrones, iones) con otros átomos de argón generando una reacción en cadena. El gas recibe energía de la fuente y forma un plasma (gas muy ionizado y confinado en un pequeño espacio) que consiste en átomos de argón, iones y electrones (Fig. 15).

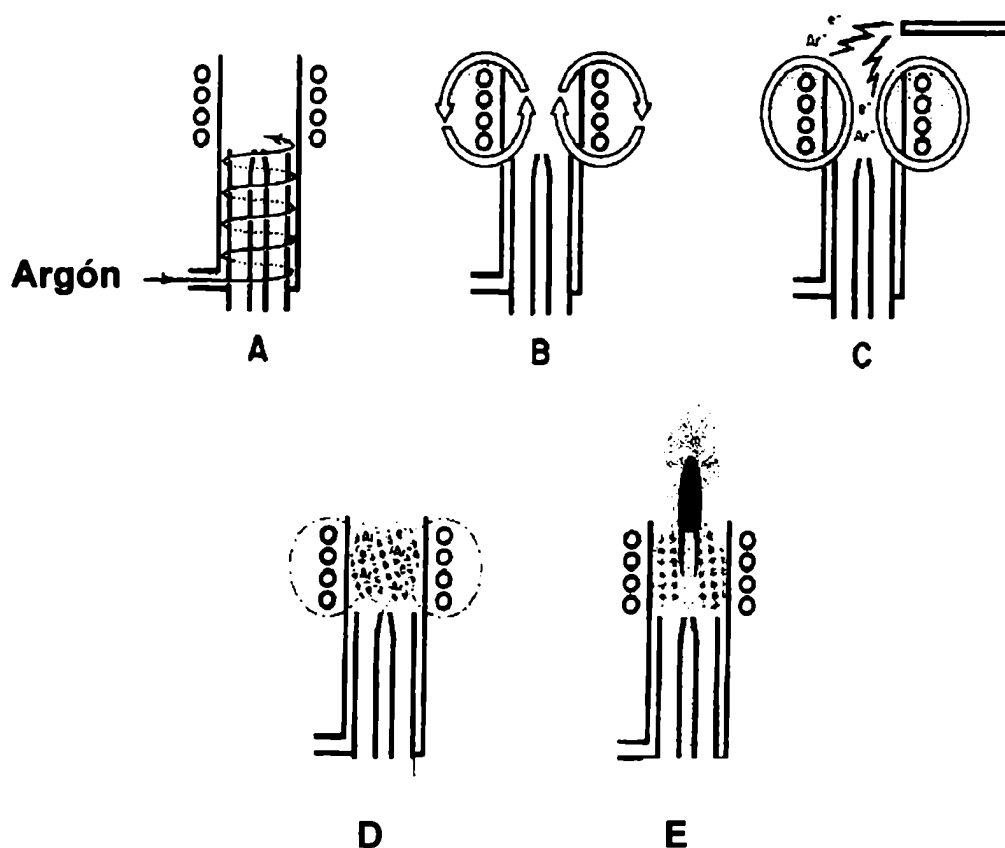


Fig. 15. Vista transversal de la antorcha del ICP y el alambre de cobre representando la secuencia de ignición. A- Gas Argón entrando a la antorcha B- Generador de radiofrecuencia RF C- Una chispa produce electrones libres en el Argón D- Los electrones libres son acelerados por el campo magnético causando una ionización en cadena y formando un plasma E- La muestra en forma de aerosol fluye a través del nebulizador atravesando el plasma.

La descarga del ICP es sostenida por la bobina de cobre que rodea la antorcha de cuarzo en su parte superior, transfiriendo la energía desde el generador de radiofrecuencia (1-2 KW) a través del proceso inductivo (inductive coupling). En la mayoría de los instrumentos de ICP esta frecuencia es de 27 ó 40 Mhz. En nuestro caso es de 40 Mhz.

Una vez generado el plasma, la muestra para análisis debe llegar a la antorcha. Previamente dicha muestra es aspirada por medio de una bomba peristáltica (a razón de 1-2 ml/min) a un nebulizador (flujo cruzado ó concéntrico) y así vaporizada es arrastrada por el flujo de argón hacia la cámara de expansión (cámara de Scott ó Ciclónica). Esta cámara drena las gotas gruesas dejando pasar a la antorcha las de menor tamaño. Sólo una fracción de aproximadamente 1-5 % de la muestra nebulizada finalmente llega a la antorcha. Este proceso es muy poco eficiente por lo cual existe mucha investigación actualmente con el fin encontrar nuevos nebulizadores de mayor eficiencia (Henn, Din, etc.). La Fig. 16 describe el proceso que se desencadena cuando una muestra en forma de aerosol es introducida en el ICP. Los principales procesos que tienen lugar durante el pasaje de la muestra por las zonas de elevada temperatura dentro del plasma (7000 °K) son: a) remoción del solvente ó (desolvatación) del aerosol que contiene a la muestra generando partículas microscópicas de sales; b) el siguiente paso involucra la descomposición de las partículas de sal en un gas de moléculas individuales (vaporización); c) posteriormente se produce disociación en átomos individuales (atomización). Una vez que la muestra de aerosol ha sido desolvatada, vaporizada y atomizada, el plasma puede generar d) excitación de los átomos ó e) ionización y excitación de los iones; cada una de estas especies origina un espectro particular. Para que un átomo ó ion pueda emitir una radiación característica, uno de sus electrones debe ser promovido a un nivel mayor de energía a través de un proceso de excitación que en general se produce por choque con otras partículas. Muchos elementos poseen su línea de emisión mas fuerte en el ICP debido a la excitación de sus iones.

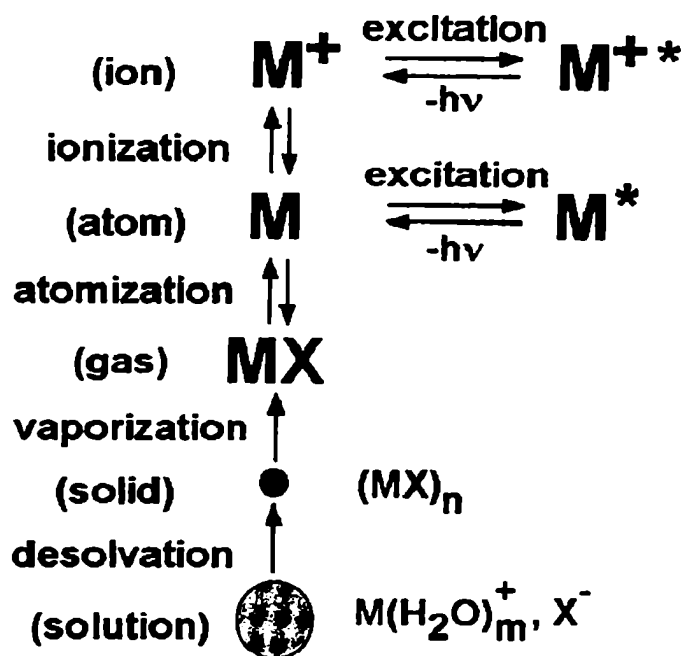


Fig. 16: Proceso que se desencadena cuando una muestra líquida es introducida en la descarga del ICP.

Las especies excitadas en el plasma emiten luz de diferentes longitudes de onda (la emisión es policromática correspondiendo a transiciones entre diferentes estados) que posteriormente son captadas y medidas en el espectrómetro que forma parte del equipo. La radiación policromática debe ser separada en longitudes de onda individuales para identificar cada especie y medir la intensidad sin interferencias de la emisión de otras longitudes de onda próximas. Dicha separación de la luz es realizada en algunos equipos mediante el uso de un monocromador, el cual funciona generalmente mediante una red de difracción. En los equipos de última generación como el "Optima 3100 XL", en lugar del monocromador se utiliza un policromador ó "Red Echelle" cuya ventaja es que se pueden separar y medir distintas longitudes de onda al mismo tiempo y por lo tanto con un mismo volumen de muestra se puede establecer y cuantificar la presencia de diferentes elementos en forma simultánea.

La detección de la luz, una vez separadas las distintas longitudes de onda, se puede realizar mediante el uso de detectores fotosensibles, como el caso de los tubos fotomultiplicadores (PMT), ó mediante detectores de estado sólido como los dispositivos de inyección de cargas (CID) ó detectores de carga acoplada (CCD). El

equipo utilizado cuenta con un CCD de tipo segmentado (SCD) que capta las emisiones en la zona del UV. Este dispositivo posee capacidad para observar simultáneamente un gran número de longitudes de onda, con alta reproducibilidad y con sustracción simultánea del fondo espectral. El SCCD transforma los fotones en carga eléctrica y funciona como un acumulador de cargas que puede integrar la señal durante un tiempo prefijado (tiempo de lectura). Posee un conversor analógico digital y la señal se expresa como cuentas/unidad de tiempo. El tiempo de integración es una variable que puede ser ajustada de forma tal que determinadas longitudes de onda (a las cuales el detector es más sensible) no saturen su capacidad. Este ajuste puede hacerlo automáticamente el software mediante una medición rápida y aproximada ("pre shot"). El operador puede fijar las variables de tiempo de integración y lectura en forma manual.

Una vez detectada, la muestra es analizada en forma cualitativa y cuantitativa. Para el análisis cualitativo es necesario detectar las longitudes de onda características del elemento y en general deben leerse al menos tres líneas espectrales para garantizar que la emisión observada no esté interferida. Estas líneas espectrales seleccionadas no deberían estar interferidas por la emisión de otros elementos presentes en la muestra. Si una línea está interferida ésta debería excluirse del análisis ó no tenerse en cuenta. También puede utilizarse la corrección interelementos o IEC y el MSF o "Multicomponent Spectral Fitting". Estas dos alternativas se usan en última instancia.

Para determinar la cantidad de elemento presente en la muestra es necesario realizar una curva de calibración relacionando la intensidad de la emisión de luz de alguna de las líneas espectrales con la concentración del elemento que es una función lineal creciente. Para dicha curva se utilizan soluciones estándar de concentraciones conocidas y se mide en el ICP la intensidad de emisión característica de la señal para el elemento en cuestión. Dichas curvas deben realizarse para cada uno de los elementos a medir en forma individual. Cuando se mide una muestra incógnita la intensidad encontrada se compara con la intensidad del elemento de la curva de calibración y de esta forma se calcula la concentración del elemento en la muestra. El ICP-AES tiene la capacidad de almacenar matemáticamente en su memoria la curva de calibración. Esta curva es generalmente lineal en 4 ó 6 órdenes de magnitud. Usualmente solo es necesario

medir una ó dos soluciones estándar además de un blanco para calibrar el instrumento (Boss C. B. y Fredeen K. J. 1999)

a) Determinación de Boro en Tejidos

Dado que la masa de la muestra y por consiguiente el volumen de solución resultante es en general muy reducido (1ml) se diseñó y evaluó un procedimiento para inyección automática de micro-volumenes. Debido a que esta modalidad de trabajo no se encuentra entre las permitidas de forma rutinaria por el software comercial del ICP-AES, resultó necesaria una consideración de los tiempos de desplazamiento de la muestra y de los tiempos de integración y lectura de las señales. También se estudió el efecto memoria del nebulizador y se ensayaron diferentes procedimientos de adquisición de datos basados en la altura del pico o de un número fijo de píxeles bajo el pico (área). La consistencia interna del procedimiento se verificó utilizando dos líneas de emisión de boro, con corrección simultánea de fondo (Estas tareas fueron realizadas en colaboración con profesionales del área de Química Analítica del Departamento de Química de la C.N.E.A.)

Las muestras de tejido previamente pesadas (50 mg ó menos) fueron digeridas toda la noche a temperatura ambiente ó a 60 °C por 1h en 0,15 ml de una mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico y ácido nítrico. Luego de la digestión la solución se observó límpida y de color amarillento. A esta mezcla se le agregó un volumen de 500 µl de una solución al 10% de detergente Tritón X-100, 100 µl de itrio 1ppm y se llevó a 1000 µl (1ml) con agua libre de boro. Inmediatamente antes del análisis por ICP-AES la mezcla fue sonicada durante 15 minutos (Corderre J. A. y col. , 1998). El paso de digestión es muy importante debido a que la presencia de partículas pueden tapar el nebulizador del ICP y alterar la medición. En este sentido es importante el uso de un patrón interno, un elemento de concentración conocida que es agregado a cada una de las muestras (el cual no está presente naturalmente en ellas) que funciona como un control para saber si la muestra ingresó correctamente al área de detección. Como patrón interno se utilizó una solución de itrio de 1 µg/g de itrio a una concentración final en la muestra de 0,1 µg/g ó ppm de

itrio. Las líneas de itrio (iónicas) estudiadas fueron dos: 371.029 nm y 324.227 nm. Para realizar el análisis de boro se estudiaron 4 líneas atómicas: 249.772 nm, 249.677 nm, 208.957 nm, 208.889 nm de las cuales las dos primeras son las de mayor intensidad. Se tomó la segunda línea para realizar los cálculos ya que la primera puede estar interferida por hierro (Fe). Se realizó una curva de calibración cada día de medida y se utilizaron soluciones estándar de ácido bórico (Merck de 5000 ppm); aquí se eligió el modo de lectura manual y el tiempo de retardo, de modo tal de poder integrar el transitorio correspondiente al total de muestra disuelta en 1 ml. El límite de detección en tejidos fue de 0,06 µg de B/g de tejido (ppm). El límite de determinación fue de 0,18 ppm.

La concentración de boro en los tejidos se calculó como partes por millón (ppm) o µg/gramo de muestra de tejido:

$$\frac{\text{Conc. elemento (mg/L)} \times \text{Volumen muestra (L)} \times 1000}{\text{Masa muestra de tejido (g)}} = \text{ppm } (\mu\text{g/g})$$

b) Determinación de Boro en Sangre

Las muestras de sangre (200-300 µl) fueron pesadas. Luego de un agregado de 200 µl de solución de 2,5 % de Tritón X-100 y 500 µl de solución de itrio 1 ppm (usado como patrón interno) la mezcla se llevó a un volumen final de 5 ml. La concentración final de tritón fue 0,1%, y la concentración final de itrio de 0,1 ppm. Las muestras fueron agitadas y medidas inmediatamente. Se realizó una curva de calibración cada día de medida y se utilizaron soluciones estándar de ácido bórico (Merck de 5000 ppm). Las muestras se midieron por triplicado, con elección del modo de integración automático. Las líneas de itrio (iónicas) empleadas como estándar internos fueron dos: 371.029 nm y 324.227 nm. Para realizar el análisis de boro se estudiaron 4 líneas atómicas: 249.772 nm, 249.677 nm, 208.957 nm, 208.889 nm de las cuales las dos primeras son las de mayor intensidad. La presencia de hierro en la sangre interfiere la primer línea de emisión del boro, por lo cual se tomó la segunda para realizar los cálculos (249.677 nm) y como línea alternativa la de 208.889 nm.

La concentración de boro en la sangre se calculó como partes por millón (ppm) o $\mu\text{g}/\text{gramo}$ de muestra de sangre:

$$\frac{\text{Conc. elemento (mg/L)} \times \text{Volumen muestra (L)} \times 1000 \times 5}{\text{Masa muestra de sangre (g)}} = \text{ppm } (\mu\text{g/g})$$

4.9. Detección de rayos gamma rápidos inducidos por la reacción Nuclear (Particle Induced Gamma Ray Emission ó PIGE) para la determinación de Boro en Muestras Biológicas.

(Dosaje realizado en colaboración con el Doctor A. Kreiner y colaboradores del Departamento de Física de la CNEA)

La técnica de PIGE consiste en inducir la emisión de radiación gamma característica de un núcleo mediante el bombardeo con protones de energía adecuada. Este rayo gamma de una energía característica es utilizado para la detección del elemento en cuestión, en este caso el boro.

El objetivo de estos ensayos fue poner a punto junto con el Departamento de Física de la CNEA el método PIGE para la determinación de boro en muestras biológicas como método alternativo al ICP-AES.

Curva de calibración: En un primer paso se tomaron muestras biológicas las cuales se usaron como matriz para realizar una curva de calibración. Las muestras de animales sin inyectar con el compuesto borado se dopan con distintas concentraciones del mismo en forma exógena, ácido bórico en este caso.

El siguiente cuadro muestra el resumen de muestras tomadas para realizar la curva de calibración. Se anestesiaron 3 hámsters con tumor. Se tomaron muestras de: tejido tumoral (tumor de bolsa de la mejilla), tejido normal (bolsa normal) y sangre. Se pesaron las muestras y se midió el volumen de sangre. Luego se digirieron en ácido nítrico. En estas condiciones fueron entregadas para su análisis.

Muestra\ Tejido	Vol. de Sangre	Peso: Tej. Normal	Peso: Tej. Tumoral
1	0,25 ml	170 mg	45 mg
2	0,20 ml	160 mg	85 mg
3	0,20 ml	200 mg	80 mg
4	0,16 ml	150 mg	100 mg
5	0,18 ml	123 mg	90 mg
6	0,20 ml	111 mg	100 mg

El siguiente cuadro muestra el resumen de muestras para dosaje. Se utilizaron 2 hámsters con tumor inyectados con 100 mg/kg. de p. c. de ácido bórico en solución fisiológica a través de dos rutas: intrayugular (i. y.) 10 mg/0,2ml e intraperitoneal (i. p.) 10 mg/2ml. El tiempo post-inyección hasta tomar las muestras fue de 1,5 h y 2 h 10' respectivamente. Se tomaron muestras de tumor, tejido normal y sangre. Las muestras fueron pesadas, se midió el volumen de sangre y se digirieron en ácido nítrico.

Hámster\Muestra	Vol.Sangre	Peso:Tej. Normal	Peso:Tej.Tumoral
Hámster (i. y.)	0,25 ml	465 mg	30 mg
Hámster (i. p.)	0,33 ml	390 mg	40 mg

4.9.1. Análisis de la incorporación de BPA-F a las áreas viables y necróticas de muestras de tumores

Se realizaron estudios histológicos de muestras de tumor y dosaje de boro por ICP-AES en muestras contiguas de tumor para establecer una correlación entre las características histológicas del tumor y la capacidad de incorporación de compuesto borado. Para ello se examinó la histología de tumores representativos

con diferentes proporciones de tejido tumoral viable y se analizó la correlación con las concentraciones de boro. Cada uno de los tumores seleccionados fue descripto macroscópicamente y dividido en 2 muestras contiguas de apariencia macroscópica similar. Para ello, los hámsters fueron sacrificados 3,5 h después de la administración de 300 mg de BPA/kg p. c.. Una muestra fue analizada por ICP-AES. La otra muestra fue fijada en formol buffer 10 %, deshidratada e incluida en parafina. Se realizaron cortes de 5 μ m los cuales fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina (H&E) y analizados por microscopía óptica. Se reconocieron las áreas de parénquima tumoral viable, estroma y tejido necrótico. Se utilizó un analizador de imágenes para evaluar cuantitativamente las áreas seleccionadas previamente en el corte histológico (IBAS-Kontron, LANAIS-MEF, CONICET-CNEA). Se calculó entonces el área ocupada por el tejido viable y necrótico y esta medida se correlacionó con la incorporación de boro en el total (tejido viable y necrótico) de la muestra del corte adyacente.

Otro enfoque empleado fue el de administrar 300 mg de BPA/kg p. c. y a 3,5 h post-administración evaluar la captación diferencial de boro en áreas viables y necróticas individualmente. Se disecaron 6 áreas de diferentes tumores que a nivel macroscópico se podían clasificar como necróticas y se procesaron para el análisis. Doce muestras de áreas viables utilizando el mismo criterio fueron procesadas para realizar la comparación. La escasa cantidad de tejido necrótico impidió emplear una porción de la muestra para realizar el análisis histológico.

4.9.2. Análisis Estadístico

Se calculó la significación estadística de las diferencias en el contenido de boro entre diferentes tejidos a un tiempo post-administración dado utilizando análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Se tomó como nivel de significación un $\alpha=0,05$. Si los residuos no estaban normalmente distribuidos se aplicaron transformaciones logarítmicas de los datos. En algunos casos se utilizó el test de Mann-Whitney. El análisis fue realizado con el asesoramiento de la Dra. Beatriz González del Departamento de Bioestadística, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

4.9.3. Tratamiento de Tumores de Bolsa Facial de Hámster por BNCT (experiencias in vivo)

a) Puesta a punto de un sistema de irradiación para modelos biológicos en el RA-6 (CAB)

El desarrollo de la compleja técnica del BNCT implicó la puesta a punto de diversos pasos. Dentro de este objetivo se realizó la primera irradiación de bolsa de la mejilla de hámsters normales y cabeza de ratas en el RA-6 (Centro Atómico Bariloche, CAB), usados como modelos biológicos para dicha terapia. Los objetivos de esta experiencia fueron: 1) poner a punto y poner a prueba el dispositivo para los animales diseñado en el RA-6; 2) evaluar el tiempo de duración de la anestesia en esas condiciones; 3) evaluar el posible daño inducido por la irradiación con el haz de neutrones en el tejido normal. Se irradiaron 6 hámsters y 6 ratas. Cabe aclarar que en esta instancia, y dado que el objetivo fue poner a punto el sistema de irradiación, no se realizó el tratamiento completo con BNCT. Los animales fueron irradiados con el haz de neutrones sin inyección previa del compuesto borado.



Fig. 17: Posicionamiento de los animales en el dispositivo de irradiación. Los animales se encuentran anestesiados e inmovilizados. La bolsa facial derecha ha sido evertida para su irradiación. El dispositivo de irradiación fue diseñado para la irradiación simultánea de 5 animales.

Los animales fueron trasladados en avión al Centro Atómico Bariloche y el experimento se llevó a cabo en un día. El haz epitérmico del RA-6 fue modificado a los efectos de incrementar las dosis absorbidas en superficie. El dispositivo de irradiación permitió el blindaje de la zona del cuerpo que no se desea exponer al haz (Fig. 17). Fue construido en plomo con cavidades para albergar el cuerpo de los animales (Fig. 18). La sala de irradiación fue monitoreada con una cámara de video que permitió detectar posibles movimientos de los animales desde la consola del reactor.



Fig. 18: El dispositivo de irradiación fue construido en plomo, con cavidades para albergar el cuerpo de los animales. Luego de posicionar los animales correctamente se acercó el dispositivo hacia la pared del reactor. Obsérvese la circunferencia central del dispositivo que corresponde al diámetro de la salida del haz de neutrones.

b) Estudios de BNCT en el RA-1(CAC) a bajo flujo de neutrones

Con el objetivo de visualizar el efecto del BNCT a nivel celular se realizó un experimento de BNCT en el RA-1 a bajo flujo de neutrones. El flujo de neutrones térmicos en el RA-1 es de 10^7 n/cm²seg y la fluencia correspondiente a 1 h de irradiación fue de $3,6 \cdot 10^{10}$ n/cm². Dicho valor de flujo se encuentra dos órdenes de

magnitud por debajo del valor que se emplea internacionalmente para la terapia de BNCT. El reactor RA-1 no contaba en dicho momento con la capacidad de generar un flujo mayor de neutrones. La dosis de radiación gamma del haz fue de 2 Gy/h.

Se generaron tumores de bolsa facial de hámster por topicación con un cancerígeno completo 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) durante 14 semanas como fue descrito anteriormente. Una vez desarrollados, los tumores fueron caracterizados en cuanto a su localización, forma, color y tamaño y tratados con BNCT. Para ello, los animales fueron inyectados previamente con ácido bórico enriquecido en ^{10}B y BPA por vía intraperitoneal (i. p.) e intrayugular (i. y.) y luego de 2,5 h y 1,5 h respectivamente, los tumores fueron irradiados con neutrones térmicos durante 1 h. El dispositivo empleado pudo albergar un solo hámster por irradiación (Fig. 19).

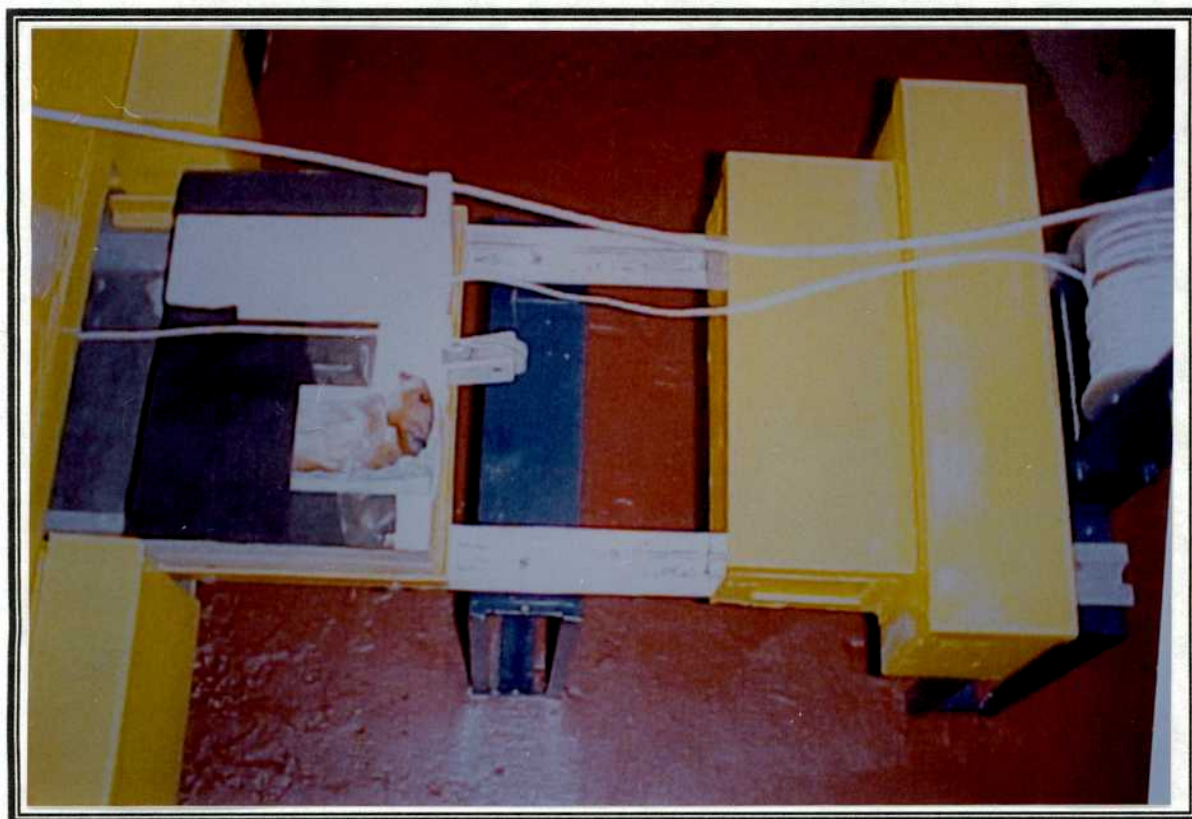


Fig. 19: El dispositivo de irradiación fue construido de manera de albergar un Hámster con la bolsa facial evertida en el sitio de incidencia del haz. Luego de posicionar correctamente el animal, este dispositivo se acercó usando un sistema de poleas, hacia la pared del reactor donde se posicionó en forma vertical.

Luego del BNCT se realizó el seguimiento diario de la evolución macroscópica de los tumores en cada uno de los animales. Se registró la forma, color y tamaño de los tumores y el estado general del animal. Luego de un mes de seguimiento los animales fueron sacrificados. Se procesaron las muestras de tumor para su análisis histopatológico.

La cantidad total de animales irradiados en el RA-1 fue de 25 hámsters con tumor: 13 inyectados con ácido bórico, 8 inyectados con BPA (i. p.), 1 inyectado con BPA (i. y.); y 3 hámsters con tumor sin inyectar. Tres hámsters sin tumor (controles) fueron irradiados para analizar posibles efectos sobre el tejido normal.

c) Estudios de BNCT en el RA-6 (Centro Atómico Bariloche, CAB)

Un lote de hámsters Syrian (*Mesocricetus auratus*) fue sometido a un protocolo de carcinogénesis química. Se aplicó un carcinógeno químico completo, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), en la bolsa de la mejilla derecha del animal 3 veces por semana durante aproximadamente 12-14 semanas según el protocolo estándar de carcinogénesis descrito anteriormente (Shklar G. 1979). Una vez generados, los tumores fueron caracterizados en cuanto a su localización, forma, color y tamaño. Cada animal fue marcado para su posterior reconocimiento y selección. Los animales se dividieron en 5 grupos experimentales según los tratamientos a llevar a cabo:

- I Hámsters con tumor/BNCT/300 mg BPA/kg: 23 tumores (15 animales)
- II Hámsters con tumor/BNCT/600 mg BPA/kg: 4 tumores (4 animales)
- III Hámsters normales/BNCT/300 mg BPA/kg: 13 bolsas normales (13 animales)
- IV Hámsters con tumores/neutrones solos: 3 tumores (3 animales)
- V Hámsters normales/neutrones solos: 3 bolsas normales (3 animales)
- VI Hámsters con tumor (3) y hámsters normales (5) transportados a Bariloche para realizar un simulacro de irradiación.

Los animales fueron trasladados en avión al Centro Atómico Bariloche (CAB), y el experimento se llevó a cabo en tres días sucesivos. Los animales a los cuales se les practicó el BNCT (lotes: I, II y III) fueron anestesiados con la mitad de la dosis de anestesia para producir un adormecimiento e inyectados con la dosis

correspondiente de BPA. Mientras se encontraban inmovilizados se realizó el mapeo de cada uno de los tumores presentes en la bolsa. Se midió en todos los casos el diámetro mayor, menor y la altura del tumor. Se sacaron fotos de la apariencia pre-tratamiento del tumor, del tejido precanceroso y del tejido normal. Luego de 3,5 h post-administración del BPA se anestesió a los animales con la dosis completa (ketamina: 140mg/kg, xilazina: 21mg/kg) y se realizó la irradiación con neutrones. La irradiación duró 62 minutos. La fluencia de neutrones térmicos fue de $1,1 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$.

Para realizar la irradiación el haz epitérmico original diseñado para irradiaciones en profundidad fue adaptado para obtener un haz de neutrones térmicos que permite el tratamiento por BNCT de tejidos en superficie. Para ello se usó un material moderador de espesor adecuado. La selección del material moderador se realizó sobre la base de cálculos comparando el rendimiento de grafito puro, agua pesada y nylon solos ó combinados. La mejor geometría resultó de la construcción de una capa de 3 cm de nylon sobre la pared de bismuto del reactor. En la siguiente figura (Fig. 20) se observa una vista esquemática de la geometría empleada.

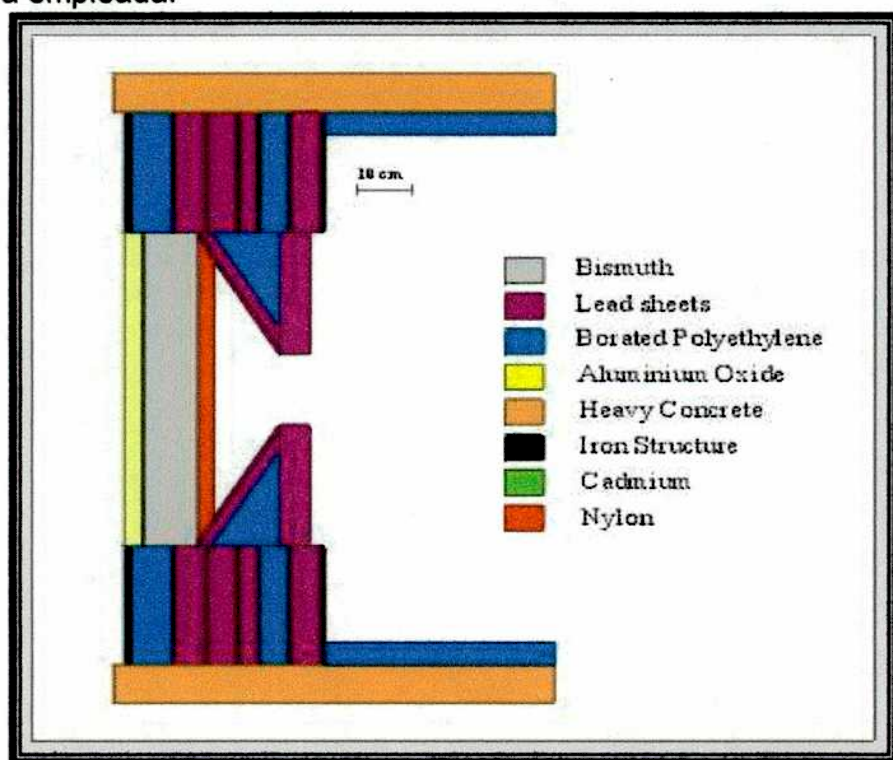


Fig. 20: Sección transversal de la geometría empleada para producir el haz de neutrones térmicos obtenido por la termalización del haz epitérmico del Reactor RA-6 de Bariloche. Se observa un detalle de los materiales elegidos para construcción. El material elegido fue el nylon de un espesor de 3 cm posicionado sobre la pared de bismuto del reactor.

Los hámsters fueron posicionados en la abertura del cono. Por lo tanto el blindaje empleado fue la pared de plomo que tapiza el cono (5 -10 cm de plomo y polietileno borado) delimitando un haz circular de 15 cm de diámetro. Este blindaje no resultó efectivo para la cabeza.

Los siguientes datos corresponden a las dosis medidas en la posición donde se ubicaría posteriormente la bolsa facial del hámster.

Dosis absorbida de neutrones rápidos: 1,65 cGy/ min (D.S.: 8 %)

Dosis gamma absorbida: 2,25 cGy/min (D.S.: 5 %)

Flujo Epitérmico (0,5 eV- 10 KeV): $9,22 \cdot 10^7$ neutrones/ cm² seg. (D.S.: 4 %)

Flujo Térmico: $2,46 \cdot 10^8$ neutrones/ cm² seg. (D.S.: 6 %)

Cálculo de dosis

Para realizar el cálculo final de la dosis es necesario tener en cuenta los distintos componentes físicos de radiación y los blancos biológicos. El contenido de boro utilizado para estimar las dosis fue estimado en 30 ppm en el tumor y 10 ppm en el tejido normal. Estos valores fueron tomados de los estudios de biodistribución y farmacocinética con BPA realizados previamente. La componente de rayos gamma y neutrones rápidos se midió utilizando cámaras de ionización y el flujo térmico de neutrones fue determinado usando alambres de oro.

En la siguiente tabla se consignan las dosis físicas en Gray (Gy) de los distintos componentes de radiación para la bolsa (bolsa con tumor y bolsa normal), cabeza y cuerpo del hámster.

	Neutrones Rápidos	Fotones (gamma)	Boro (30 ppm)	Boro (10 ppm)	Protones Inducidos
Bolsa	1,02 ± 0,08	1,40 ± 0,06	2,52 ± 0,25	0,84 ± 0,08	0,22 ± 0,02
Cabeza	0,72 ± 0,06	0,95 ± 0,04		0,61 ± 0,06	0,15 ± 0,02
Cuerpo	0,41 ± 0,03	0,50 ± 0,02		0,31 ± 0,03	0,08 ± 0,01

Para realizar el cálculo final de las dosis se asumieron valores de efectividad biológica relativa (RBE) para cada uno de los componentes estimados a partir de la literatura. Asimismo, se tomaron los valores de efectividad biológica relativa para el BPA (CBE) de los datos de la literatura.

	Neutrones Rápidos	Fotones (gamma)	Boro Tumor	Boro Bolsa normal	Protones Inducidos
RBE	3,2	1			3,2
CBE			3,8 ^a	2,5 ^b	

^a Coderre y col. , 1999

^b IAEA-TECDOC-1233, Current status of neutron capture therapy, International Atomic Energy Agency, May 2000.

La dosis final se calculó sumando cada uno de los componentes multiplicado por su RBE ó CBE respectivo:

Comp. de Boro + Protones (neutrones rápidos+ captura de neutrones térmicos en nitrógeno) + Gamma

Tumor

$$2,52 \times 3,8 \text{ Gy-Eq} + (1,02 + 0,22) \times 3,2 \text{ Gy-Eq} + 1,40 \times 1 \text{ Gy-Eq} = \boxed{14,9 \text{ Gy-Eq}}$$

Bolsa Normal

$$0,84 \times 2,5 \text{ Gy-Eq} + (1,02 + 0,22) \times 3,2 \text{ Gy-Eq} + 1,40 \times 1 \text{ Gy-Eq} = \boxed{7,5 \text{ Gy-Eq}}$$

Luego del tratamiento correspondiente, se realizó el seguimiento macroscópico (descripción, fotografiado, etc.) de los tumores, tejido precanceroso y del tejido normal a 1, 7, 14, 21 y 30 días post-tratamiento. Se registró la forma, color y volumen de los tumores, el peso y el estado general del animal. Algunos animales fueron sacrificados a distintos tiempos post-irradiación: 1, 7, 14, 21 y 30 días para realizar el análisis histológico. Se tomaron muestras de tejido tumoral, tejido precanceroso circundante al tumor y tejido normal de la bolsa.

5. ESTUDIOS PRELIMINARES: RESULTADOS

5.1. Ratas Fischer

a) Cultivo de células de la glía normal y glioblastoma F-98

Se puso a punto el cultivo primario de células de la glía normal de rata. A la semana de realizar los cultivos las células se hallan en fase proliferativa y aproximadamente a los diez días las células llegan al estado de confluencia. Se logró, asimismo, poner a punto el cultivo de células de glioma F-98. Las células fueron propagadas con el fin de realizar la implantación de las mismas en el cerebro de ratas Fischer y reproducir dicho modelo para estudios de BNCT.

b) Implantación de células tumorales en cerebro de Rata Fischer

Implantación sin agarosa: de las 5 ratas Fischer implantadas, dos de ellas murieron inmediatamente luego del transplante. Tres de ellas despertaron normalmente luego de la anestesia y su evolución fue evaluada en los días subsiguientes. Las ratas fueron sacrificadas a los 13, 21 y 35 días luego de la implantación. En el último caso la rata presentaba una parálisis en la zona posterior del cuerpo y sangrado periorbital. Estos síntomas han sido descritos en la literatura (Yang W. y col. , 1997) y permiten inferir la evolución tumoral.

Solo en uno de los cortes histológicos del cerebro, correspondiente a la rata sacrificada el día 35 post-implantación se observó un tumor (glioblastoma) de alto grado, totalmente infiltrado en el hemisferio implantado (Figs. 20-21). Como puede verse en las Figs. 22-23 el tumor es vital y tiene gran cantidad de mitosis. El aspecto del tejido de cerebro normal del hemisferio contralateral es visiblemente diferente (Fig. 26)

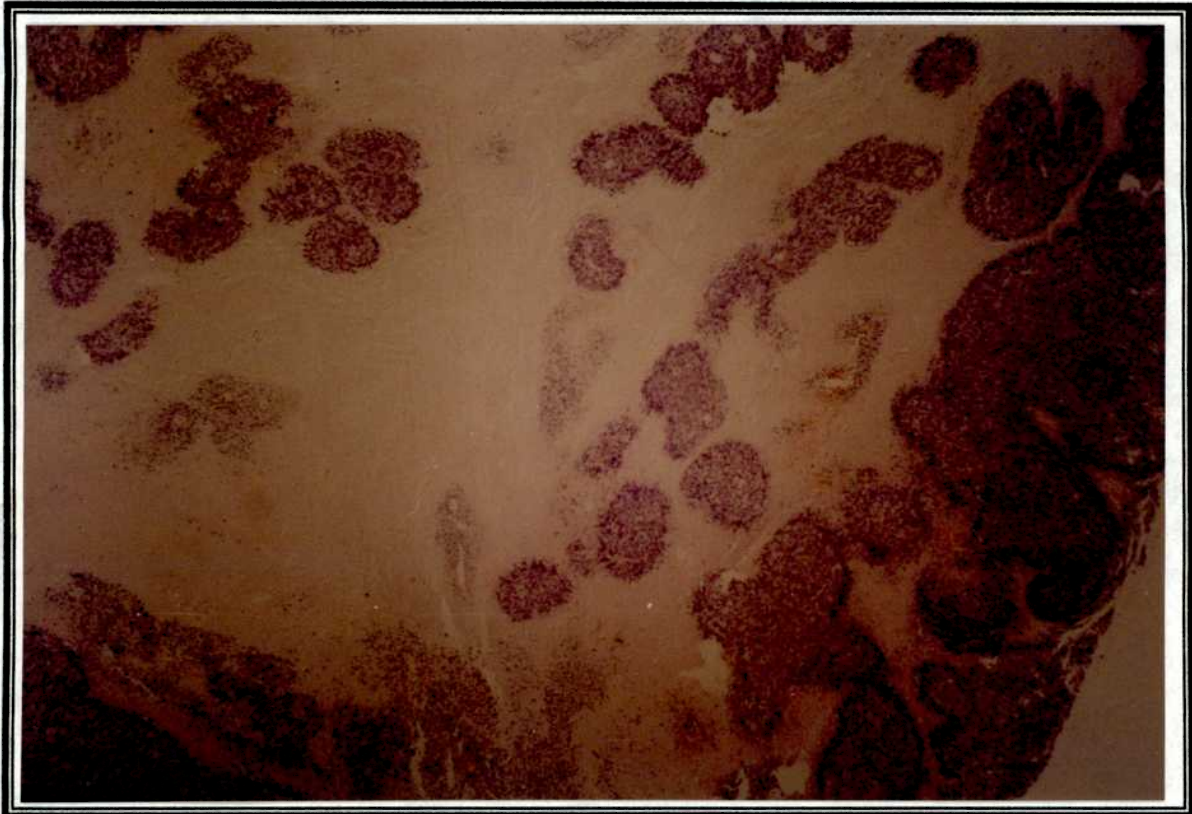


Fig. 20: Vista del corte de cerebro de rata Fischer implantada con células F-98, 35 días post-implantación. Se observa un tumor totalmente infiltrante en el hemisferio implantado. H&E, 55X.

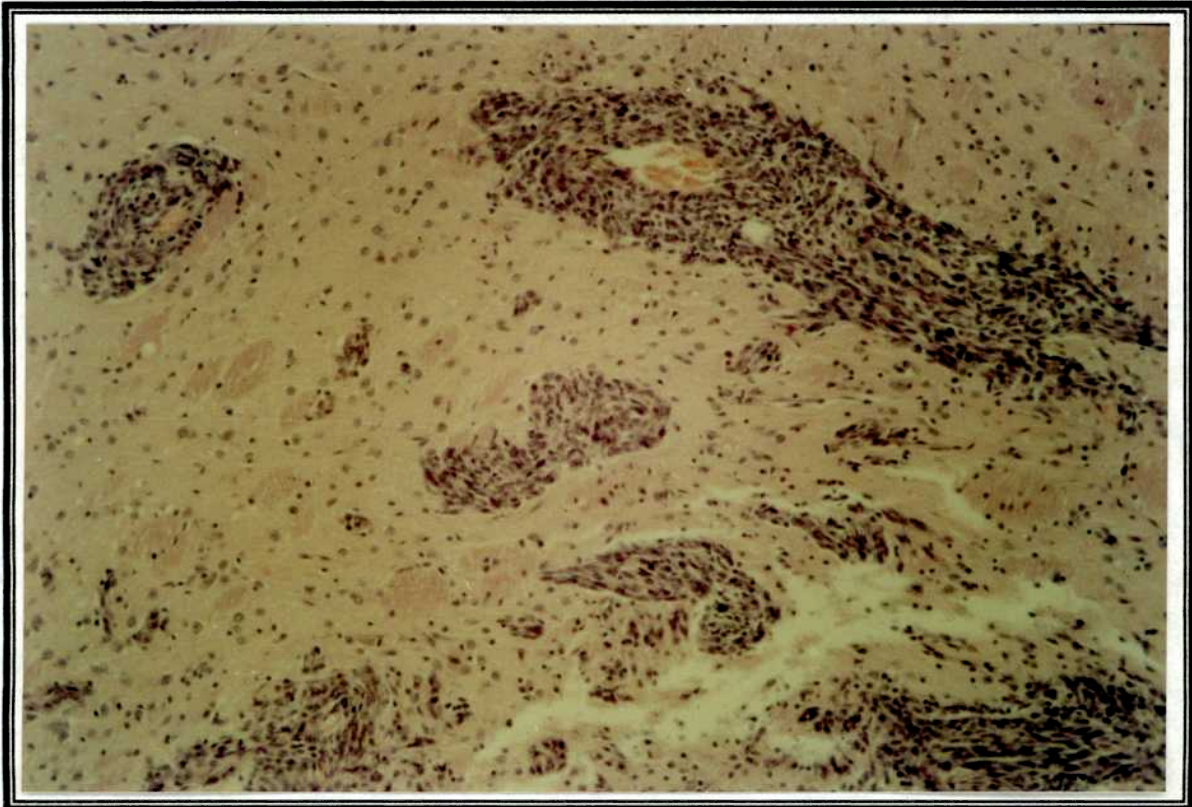


Fig. 21: Células de glioblastoma infiltrando el tejido normal. H&E, 120X.

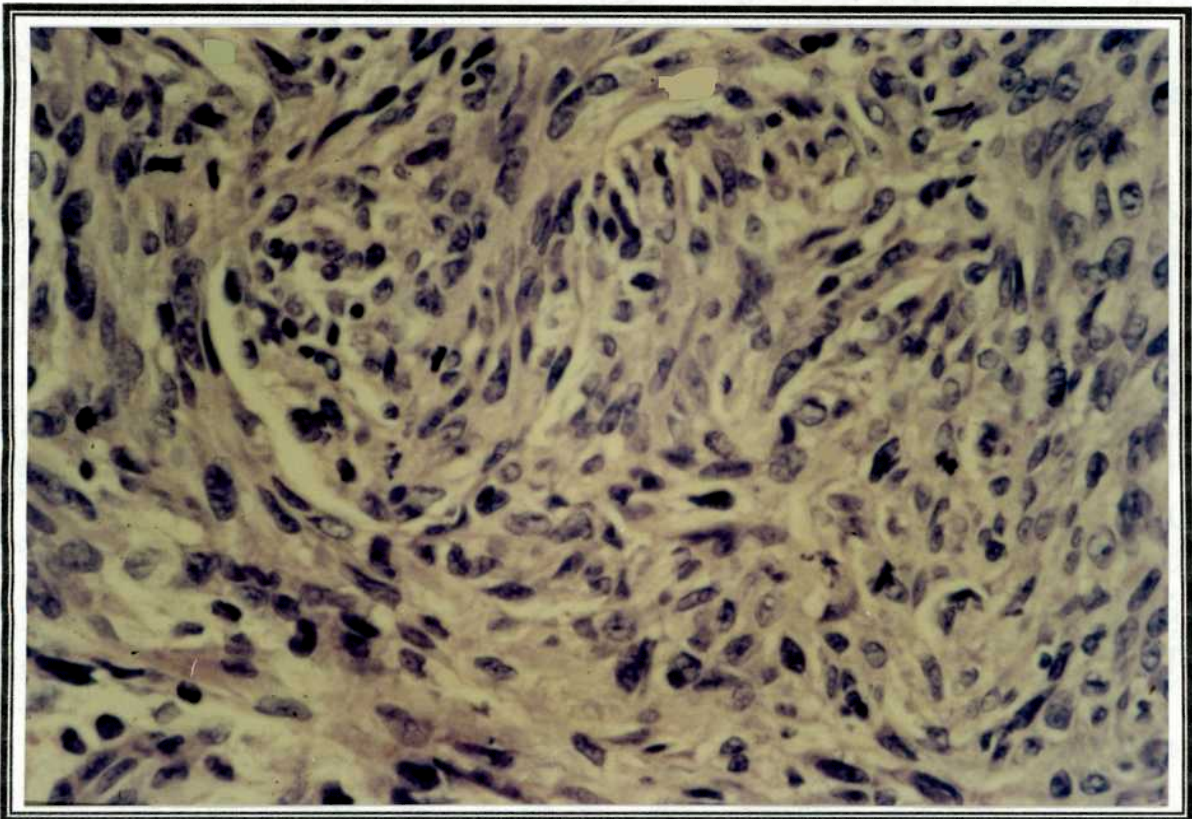


Fig. 22: El tumor corresponde a un Glioblastoma de alto grado, con una gran cantidad de células mitóticas. H&E, 180X.

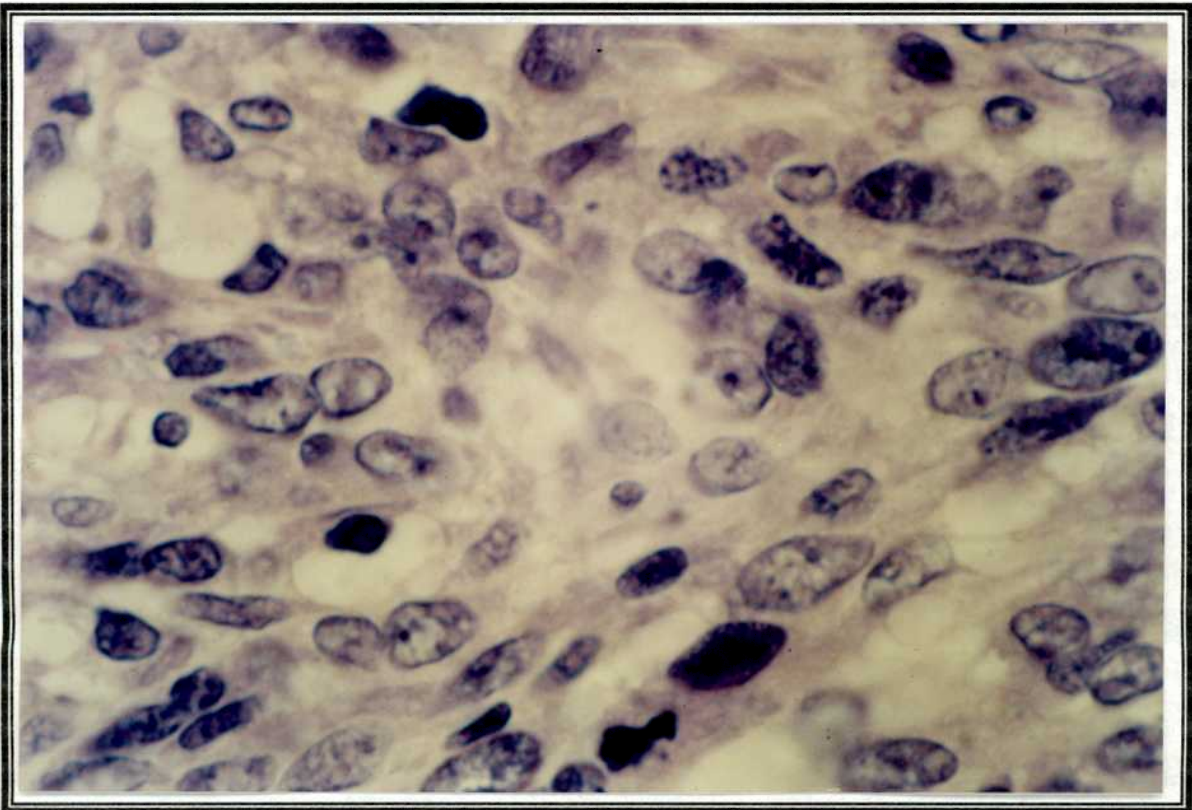


Fig 23: El tumor corresponde a un Glioblastoma de alto grado, con una gran cantidad de células mitóticas. H&E, 800X.

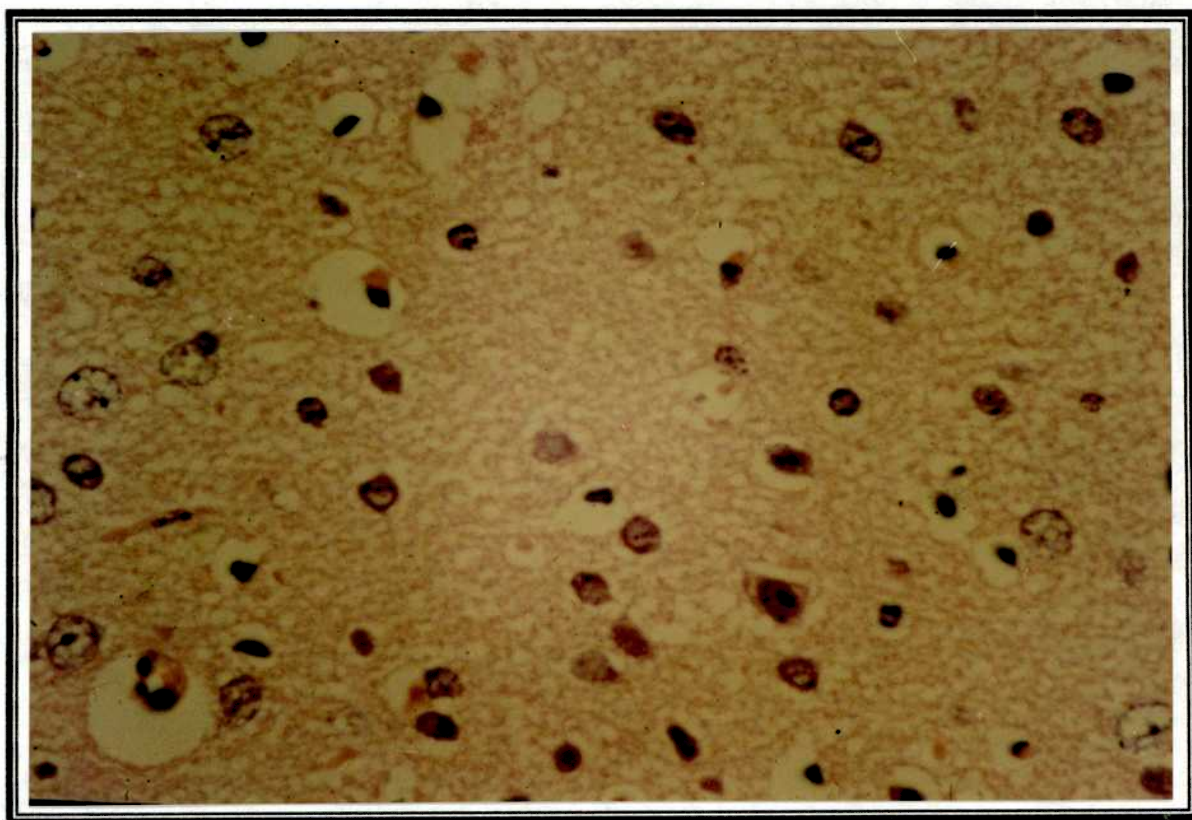


Fig. 24: Tejido nervioso normal de rata. H&E, 275X.

Implantación con agarosa: Se implantaron un total de 9 ratas Fischer con células F-98 en una suspensión de agarosa 1% con el fin de prevenir la diseminación de las células tumorales y lograr un crecimiento localizado. A los 22 días post-implantación los animales fueron sacrificados para realizar el análisis histológico de los tumores. En 6 de las 9 ratas (66%) se observó el desarrollo de tumores. Los mismos no se diseminaron dentro del cerebro como había ocurrido sin agarosa (Fig. 25). En el resto de las ratas el tumor no se desarrolló.

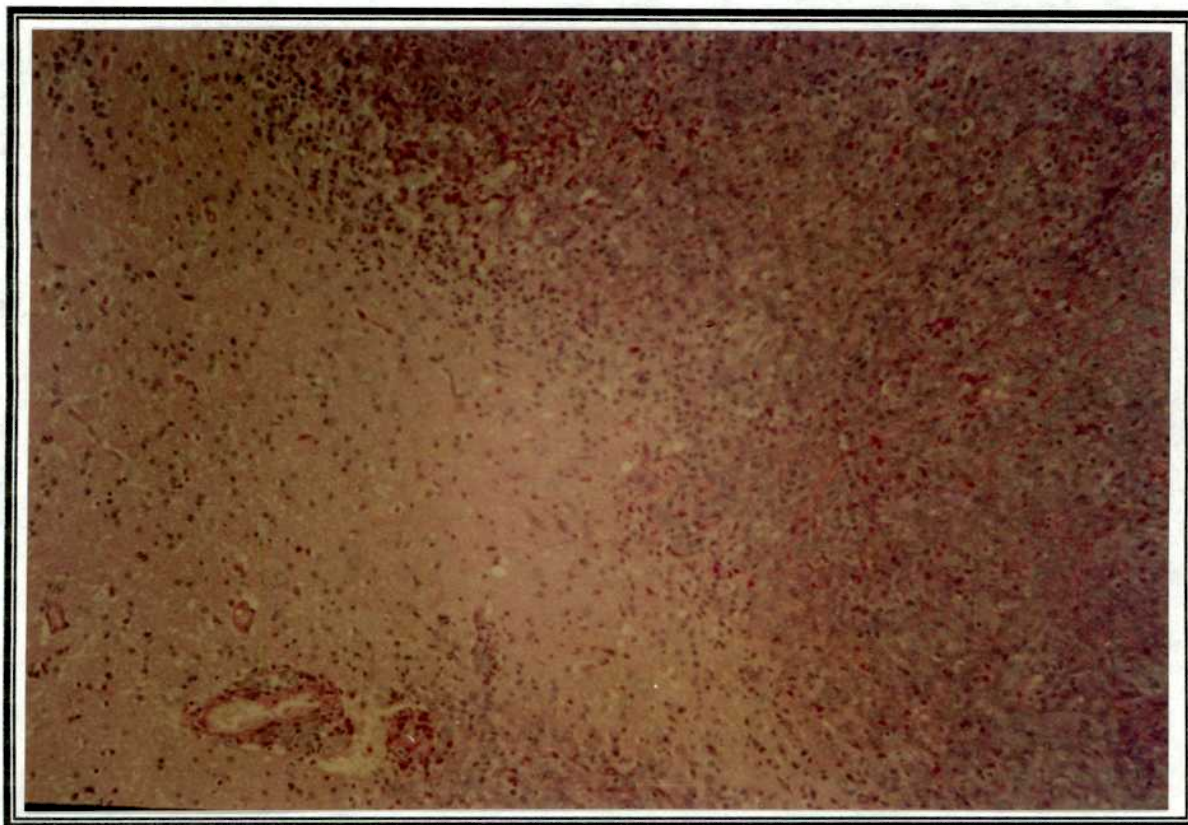


Fig. 25: Sección histológica de un cerebro de rata Fischer implantado con células tumorales F-98 suspendidas en agarosa 1%. El tumor corresponde a un Glioblastoma de alto grado. Se observa un tumor localizado con una gran cantidad de células mitóticas. H&E, 60X

c) Concentración de Boro en Tejidos de Rata inyectadas con Ácido Bórico (ppm de ^{10}B)

Tejido/ Vía	Acido Bórico (200 mg/kg)	
	i. p.	i. y.
Hígado	6,7	6,0
Bazo	6,4	5,2
Cerebro	2,3	2,1

En los tejidos de rata inyectados con 200 mg/kg no se observan diferencias importantes entre las dos vías de inyección. El resultado de mayor relevancia de estos estudios preliminares es el valor de cerebro normal de rata de 2,1 ppm. Este valor es comparable con el de 1,7 ppm descrito en la literatura.

5.2. HÁMSTER

a) Estudios de Biodistribución

En la siguiente tabla se describen los resultados de los estudios preliminares de biodistribución con BPA-F en tejidos de hámster. Se observan los valores de concentración de boro a 1,5 h (i. y.) y 2,5 h (i. p.) post-administración de BPA-F expresados en ppm.

Vía	Tumor	Bolsa Normal	Sangre
i. y.	65,5	19,2 16,7 16,6 11,0 18,0	10,7 9,3 13,7
i. p.	17,5	8,3 11,4 10,2	7,9 6,0

En el modelo del hámster no contamos con datos bibliográficos para comparar los valores preliminares de BPA obtenidos, por tratarse de un modelo original para estudios de BNCT. Sin embargo, son notables las relaciones de tumor/tejido normal: 4,5:1, tumor/sangre: 6,0:1 para la inyección i. y. de BPA, que indicarían una captación selectiva del compuesto de boro en las células del tumor de la bolsa. Hasta el momento, en el modelo de glioblastoma en rata usando BPA se ha logrado una relación tumor/cerebro y tumor/sangre de 3,2:1 y 2,1:1 respectivamente y actualmente se están buscando estrategias para mejorar estas relaciones.

Sobre la base de estos resultados se realizaron estudios completos de biodistribución y biocinética en hámster utilizando diferentes protocolos de dosis y tiempo post-administración. Se utilizaron como agentes portadores de boro: BPA-F y CuTCPH tal como fuera descripto en la sección "Materiales y Métodos".

b) Puesta a punto del sistema de irradiación para modelos biológicos en el Reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche (CAB)

Se irradiaron 6 hámsters y 6 ratas bajo anestesia. El tiempo de irradiación fue de 23 minutos en hámsters y 50 minutos en ratas. De los animales irradiados, 1 hámster se cayó del dispositivo y fue descartado, 2 hámsters y 3 ratas murieron durante la irradiación probablemente por la baja temperatura del dispositivo donde fueron alojados y la posición vertical (hacia abajo) del animal. Luego de la irradiación se evaluó la evolución de los animales que sobrevivieron (3 hámsters y 3 ratas).

Resultados Dosimétricos:

Hámsters (en la zona de la bolsa irradiada):

Radiación gama: 1,33 Gy/h.

Neutrones rápidos: 0,1 Gy/h.

Neutrones térmicos: $< 10^6$ n/cm² seg.

Ratas (en la cabeza):

Radiación gama: 1,40 Gy/h

Neutrones rápidos: 0,3 Gy/h.

Neutrones térmicos: $< 10^6$ n/cm² seg.

Tres meses después de la irradiación no se observó daño a nivel macroscópico en ninguno de los animales tratados. Con respecto a esto puede decirse que el flujo de neutrones térmicos fue muy bajo ya que se encuentra 3 órdenes de magnitud por debajo de los utilizados en la terapia del BNCT. Además, los animales no habían sido inyectados con el compuesto borado con lo cual la reacción de captura no contribuyó a la dosis total entregada.

La temperatura del dispositivo para irradiar los animales fue un factor crítico. El dispositivo utilizado era de plomo y estaba muy frío debido a la baja temperatura del ambiente durante la noche previa al experimento. En el momento de realizar la irradiación el material continuaba a baja temperatura y esto afectó notablemente actividad metabólica de los animales que se encontraban anestesiados.

Otro factor para tener en cuenta es la posición de los animales dentro del dispositivo ya que las ratas que murieron durante la irradiación estaban posicionadas con la cabeza hacia abajo.

La dosis de anestesia en hámster y rata resultó efectiva, los animales permanecieron dormidos e inmovilizados durante el tiempo que duró la irradiación.

Como conclusión, puede decirse que esta experiencia resultó imprescindible como puesta a punto para optimizar los estudios de BNCT in vivo en el RA-6.

C) Detección de ^{10}B en muestras biológicas utilizando la técnica PIGE (particle induced gamma ray emission)

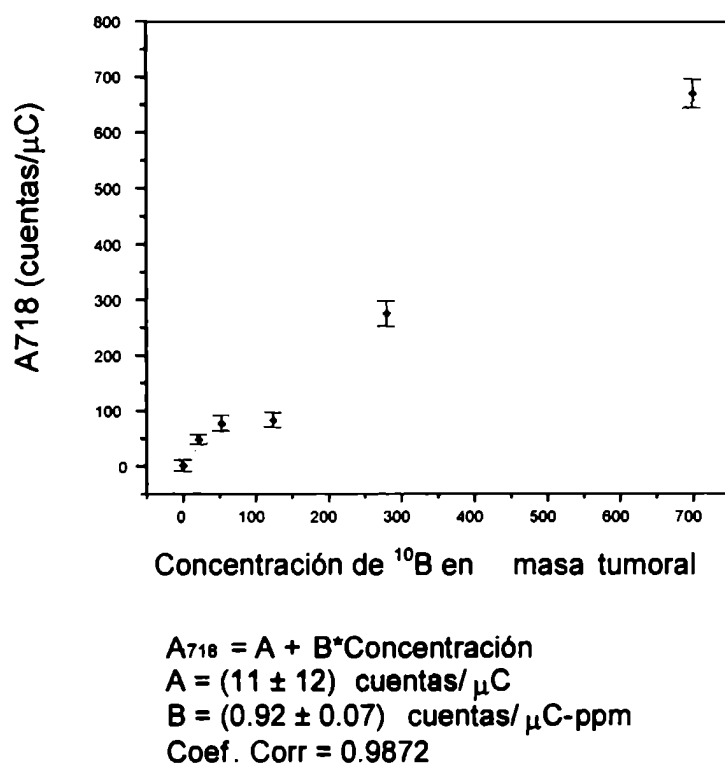


Fig. 26: Recta de calibración para los tumores de Hámsters.

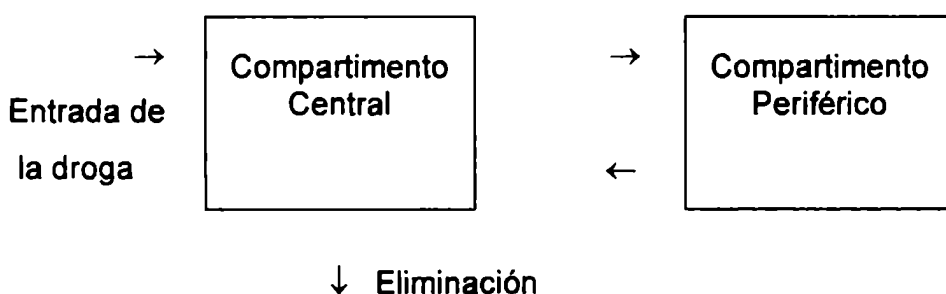
Se obtuvieron límites de detección de alrededor de 10 ppm para los tumores. En el caso de la muestra de tumor de hámster inyectado por vía intrayugular (810 mM de ácido bórico), la concentración medida utilizando la recta de calibración correspondiente arrojó un valor de $(115 \pm 23) \text{ ppm}$ de ^{10}B .

6. RESULTADOS

6.1. ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN Y FARMACOCINÉTICA EN TUMORES DE LA BOLSA DE LA MEJILLA DEL HÁMSTER

a) Estudios de Biodistribución y Farmacocinética con BPA-F

Los análisis farmacocinéticos demuestran que el boro se distribuye siguiendo un modelo de 2 compartimentos (ver apéndice) según el cual existiría un compartimento central en el cual se inyecta el compuesto y del cual se elimina, y un compartimento periférico. No existe una separación anatómica entre los dos compartimentos y generalmente los tejidos de rápida perfusión pertenecen al compartimento central.



Entre los tiempos 0 h y 12 h luego de la administración de BPA-F i. v. se puede describir una fase de distribución (alfa) y una fase de eliminación (beta) (Fig. 27) sobre las cuales se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos: $t_{1/2\alpha} = 0,21 \pm 0,12$ h; $t_{1/2\beta} = 3,30 \pm 2,20$ h; Volumen de distribución del compartimento central $V_1 = 0,50 \pm 0,04$ l/kg, Clearance total aparente $CL_T = 365,4 \pm 145,5$ ml/h.

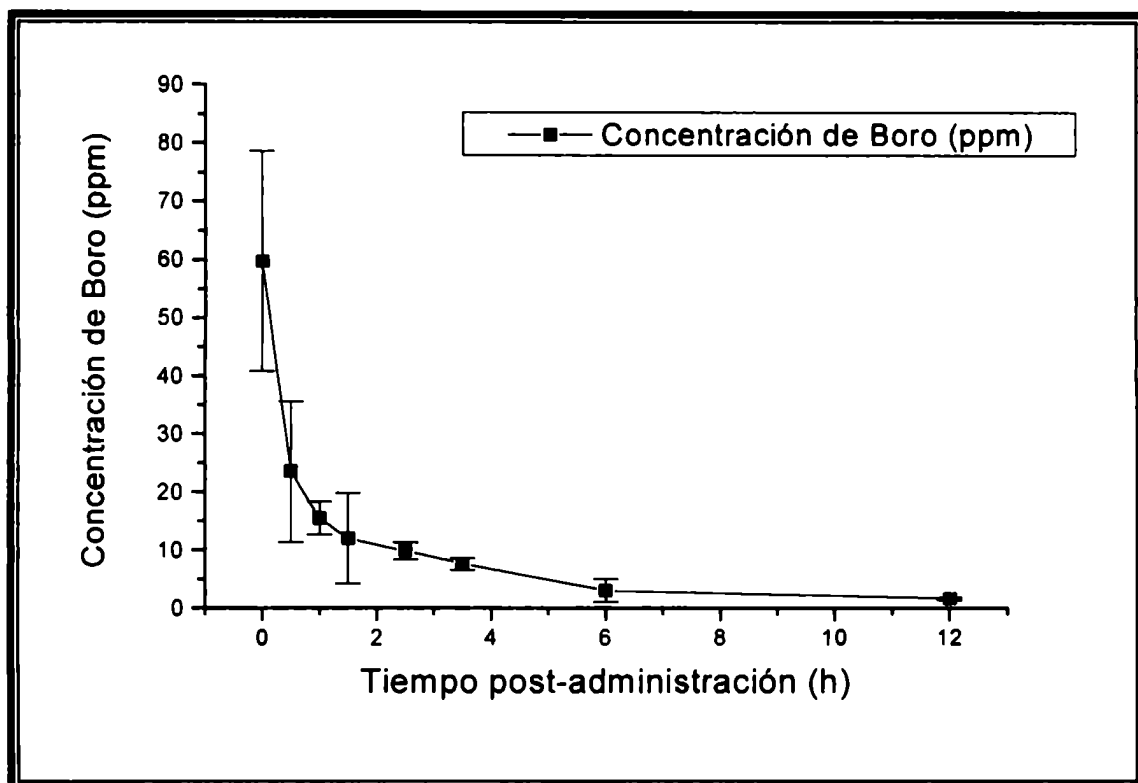


Fig. 27: Curva de concentración de Boro ajustada a un modelo de decaimiento exponencial de segundo orden. Los datos corresponden a la sangre extraída de Hámsters normales inyectados con 300 mg de BPA/kg p. c. (i. v.) sangrados por vía intrayugular.

El $t_{1/2\alpha}$ obtenido es bajo, lo cual indica que dicha droga se distribuye muy rápido en el organismo. Un volumen de distribución alto indica que la droga tiene una incorporación preferencial, es decir que se debe concentrar en por lo menos algún órgano o tejido. Este resultado concuerda con los resultados de los estudios de biodistribución que evidencian una acumulación significativa en el tejido tumoral.

Se han realizado estudios farmacocinéticos de BPA-F en humanos (Kiger III W. S. y col. , 2001) (Harvard-MIT, 24 pacientes). Luego de una infusión de 350 mg/kg durante 90 minutos, se obtuvo un $t_{1/2\alpha}$ de $0,34 \pm 0,12$ h el cual no difiere demasiado del valor obtenido en el hámster. El $t_{1/2\beta} = 9,0 \pm 2,7$ h en cambio, resulta significativamente mayor en humanos que en el hámster, $t_{1/2\beta} = 3,30 \pm 2,20$ h, lo cual demuestra una eliminación más rápida del BPA-F en este último. En un estudio realizado por Yang y col. (Yang W. y col. , 1996) en ratas Fischer portadoras de Glioblastoma F-98 inyectadas con 300 mg de BPA/kg p. c. se obtuvo un $t_{1/2\beta} = 2,5$ h calculado entre las 0,5

-4 h post-administración del compuesto borado.

En humanos se observó que los pacientes en mejores condiciones físicas mostraban un clearance más rápido. Los datos obtenidos en el hámster corresponden a animales normales, sin el tratamiento con el carcinógeno químico. Es probable que estos animales posean un clearance más rápido que los animales con tumor tratados con DMBA. Sería necesario realizar más estudios para determinar si existe alguna diferencia significativa en el clearance de ambos grupos.

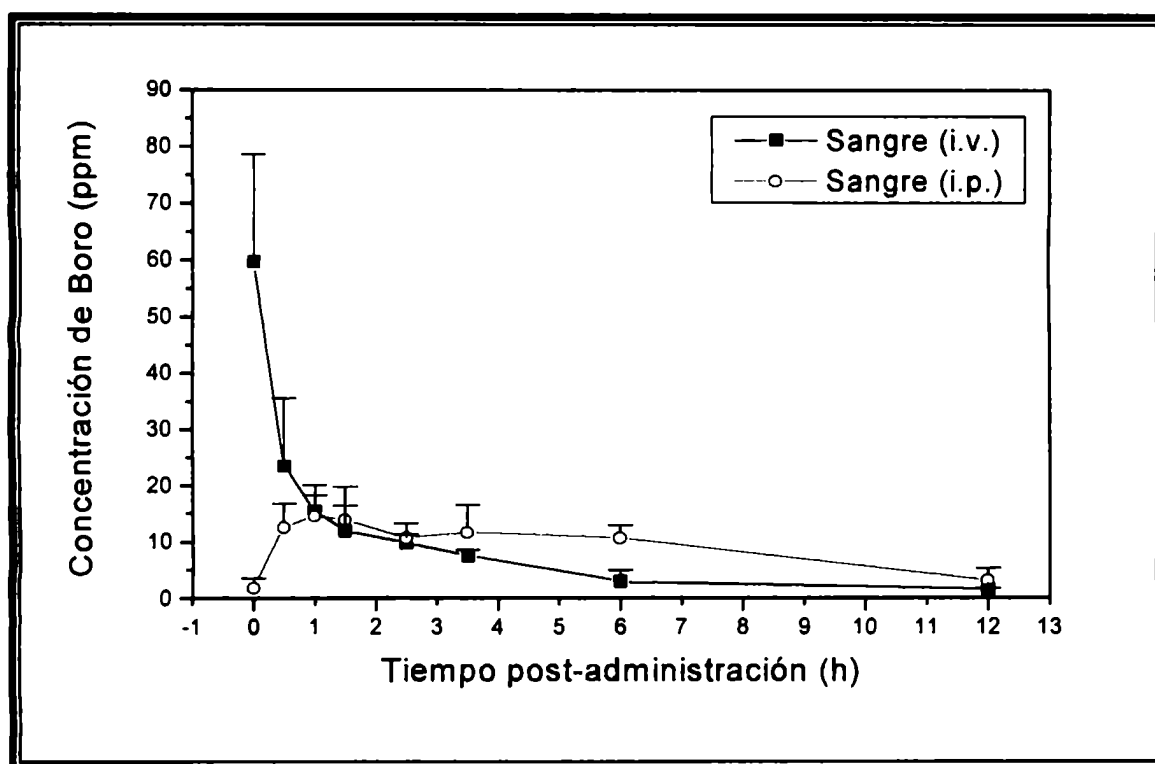


Fig. 28: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, en función del tiempo post-administración de una inyección i. p. ó i. v. de BPA-F a una dosis de 300 mg/kg de peso corporal. Cada punto representa la media $\pm$ D. S. de 5-12 muestras.

Con respecto a las vías de administración (Fig. 28) se puede observar que no existen diferencias significativas en los valores medios de boro en sangre en el intervalo comprendido entre 1-12 h post-administración del compuesto borado, con excepción de una diferencia en el clearance a las 6 h, tiempo en el cual la concentración de boro administrada por la inyección i. v. es menor que el valor correspondiente a la vía i. p.. La concentración de boro en sangre luego de la inyección i. p. alcanza su pico 1 h post-inyección indicando una rápida absorción del BPA en la cavidad peritoneal.

Para la dosis de 300 mg de BPA/kg. p.c. (Fig. 29, Tabla 4) la concentración de boro en tumor fue significativamente mayor que en el tejido normal (bolsa no tratada) para las 0,5 h ($p=0,0212$), 1 h ($p=0,00416$), 2,5 h ($p=0,00105$) y 3,5 h ($p=1,6 \cdot 10^{-5}$) post-administración de BPA-F. En el tiempo 1,5 h esta diferencia no fue significativa probablemente debido a la dispersión de los valores para el tejido tumoral. Las concentraciones de boro fueron mayores que en la sangre entre las 0,5 hs y 6 hs. Las diferencias fueron significativas para 0,5 h ($p=0,04331$), 1 h ($p=0,02668$), 2,5 h ($p=0,01798$), 3,5 h ($p=1 \cdot 10^{-6}$) y 6 hs ($p=0,00775$).

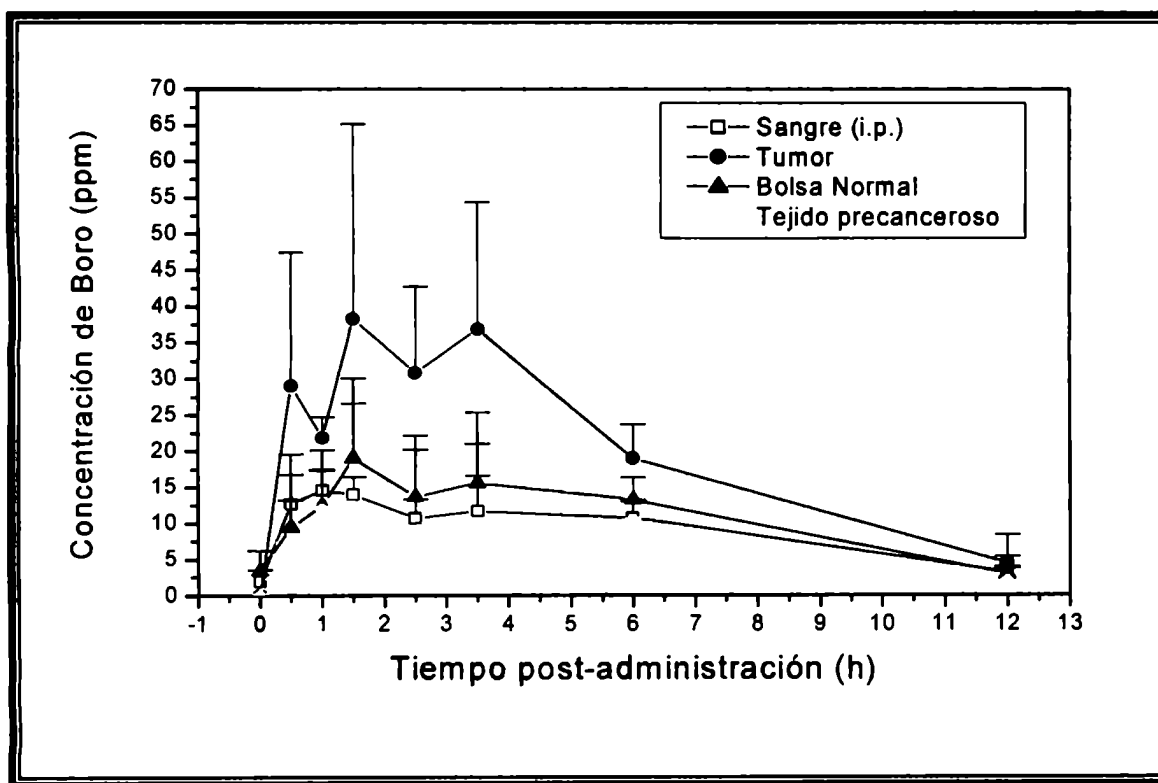


Fig. 29: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, bolsa normal, tumor y tejido precanceroso circundante al tumor en función del tiempo post-administración de una dosis de BPA de 300 mg/kg de p.c.. Cada punto representa la media y D.S. de 5-12 muestras.

TABLA 4: CONCENTRACIÓN DE BORO (PPM) EN SANGRE Y TEJIDOS DE HÁMSTER A DIFERENTES TIEMPOS LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS DE 300 mg/kg DE BPA-F

Tej/ Tiempo post-adm	0,5 h	1 h	1,5 h	2,5 h	3,5 h	6 h	12 h
Sangre (i. v.)	23,5±12,1 (n=3)	15,5±2,8 (n=3)	12±7,9 (n=3)	9,8±1,5 (n=3)	7,6±1,0 (n=3)	3,0±2,0 (n=3)	1,6±0,2 (n=3)
Sangre (i. p.)	12,6±4,2 (n=5)	14,6±5,5 (n=6)	13,9±2,5 (n=6)	10,7±2,6 (n=8)	11,7±4,9 (n=11)	10,7±2,3 (n=5)	3,2±2,1 (n=5)
Tumor	29,0±18,4 (n=8)	21,8± 2,9 (n=5)	38,3±26,8 (n=6)	30,8±11,9 (n=5)	36,9±17,5 (n=12)	19,0±4,7 (n=5)	4,5±3,9 (n=5)
Tejido Precanc.	14,5±5,0 (n=5)	12,0± 5,5 (n=5)	22,3±7,8 (n=5)	18,8±3,4 (n=5)	19,6±5,8 (n=8)	10,4±2,8 (n=5)	2,0±1,9 (n=5)
Bolsa Normal	9,5± 3,7* (n=10)	12,4± 4,8 (n=6)	19,0±7,6 (n=11)	13,7±6,5 (n=13)	15,6±5,4 (n=9)	13,2±3,1 (n=5)	2,9±0,8 (n=5)
Mucosa de Carrillo	11,0±7,0 (n=5)	10,7±3,0 (n=5)	14,4±4,2 (n=5)	15,3±4,5 (n=6)	18,2±8,9 (n=7)	11,2±2,5 (n=5)	2,5±1,0 (n=5)
Lengua	9,2±3,2 (n=5)	10,3±3,0 (n=6)	12,9±3,4 (n=5)	13,4±3,3 (n=6)	14,1±6,9 (n=6)	7,2±4,5 (n=5)	1,8±1,7 (n=5)
Mucosa de Paladar	10,1±5,7 (n=5)	10,2±3,4 (n=6)	15,4±5,3 (n=5)	15,4±4,3 (n=6)	13,0±4,3 (n=5)	9,4±4,8 (n=5)	3,3±2,1 (n=5)
Piel de la Mejilla	9,9±4,5 (n=6)	6,3±5,2 (n=5)	16,1±1,6 (n=5)	10,7±7,1 (n=6)	14,2±8,3 (n=7)	12,0±6,0 (n=5)	1,5±2,0 (n=5)
Bazo	17,0±2,1 (n=5)	17,3±3,6 (n=5)	24,0±8,0 (n=5)	16,1±1,6 (n=5)	12,9±6,3 (n=6)	5,5±1,5 (n=5)	1,5±1,3 (n=5)
Hígado	11,9±3,4 (n=5)	19,1±7,3 (n=5)	18,3±3,4 (n=5)	10,8±4,5 (n=5)	11,4±4,5 (n=5)	4,7±1,3 (n=5)	1,1±0,7 (n=5)

* Los resultados están expresados como la media ± DS. El número de muestras por condición fue de 5-12.

Los tumores de la bolsa acumulan selectivamente el compuesto borado en todos los tiempos evaluados. Las relaciones medias calculadas promediando las relaciones individuales de tumor/bolsa normal y tumor/sangre para cada uno de los animales son mayores que uno en todos los casos (Tabla 4). Estas relaciones se encuentran dentro del rango descrito en otros modelos experimentales, perros y pacientes para el caso de glioma y melanoma donde la concentración media de boro en el tejido normal es aproximadamente igual o un poco menor que en la sangre, pero en promedio, la concentración de boro en tumor es entre 2-4 veces mayor que en tejido normal y sangre (Matalka K. y col. , 1993; Fukuda H. y col. , 1994; Coderre J. A. y col. , 1990; Coderre J. A. y col. , 1987; Barth R. F. y col. , 1997; Coderre J. A. y col. , 1992; Huiskamp R. y col. , 1996).

TABLA 5: RELACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BORO A DIFERENTES TIEMPOS LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE 300 mg/kg DE BPA-F.

RELACIÓN	0.5 h	1 h	1.5 h	2.5 h	3.5 h	6 h	12 h
Tumor/ Bolsa Normal	3.1*	1.8	2.0	2.3	2.4	1.4	1.6
Tumor/ Sangre (i. p.)	2.3	1.5	2.8	2.9	3.2	1.8	1.4

* Las relaciones se calcularon haciendo el cociente entre las medias correspondientes a cada tiempo post. administración.

El punto de 3,5 h post-administración arroja el mayor valor medio absoluto encontrado en tumor ($36,9 \pm 17,5$ ppm) con relaciones de tumor/bolsa normal y tumor/sangre de 2,4:1 y 3,2:1 respectivamente. Este tiempo fue seleccionado como el más adecuado para llevar a cabo la terapia completa del BNCT por ser el que ofrece la combinación más favorable de valores absolutos y relativos de boro.

El tejido precanceroso circundante al tumor (bolsa tratada con DMBA) muestra una tendencia a concentrar más boro que la bolsa normal en todos los tiempos ensayados. No obstante, esta tendencia no alcanzó significación estadística. Este comportamiento sugiere una relación entre el grado de proliferación y/o malignidad y la incorporación del BPA-F en dicho tejido.

La captación de boro en los tejidos orales normales como la mucosa de carrillo, mucosa de paladar, lengua y piel de la mejilla del hámster fue similar al de la bolsa facial en todos los tiempos estudiados. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 30, Tabla 4). En algunos casos el contenido de boro en los tejidos orales fue mayor que en la sangre. Esta diferencia sólo fue estadísticamente significativa para el tiempo de 2,5 h comparando la mucosa de carrillo y la sangre ($p=0,03195$). Es de notar que la bolsa constituye un buen modelo para estudiar el resto de los tejidos orales con relación a los valores absolutos de incorporación de boro y a la cinética de incorporación y eliminación del mismo.

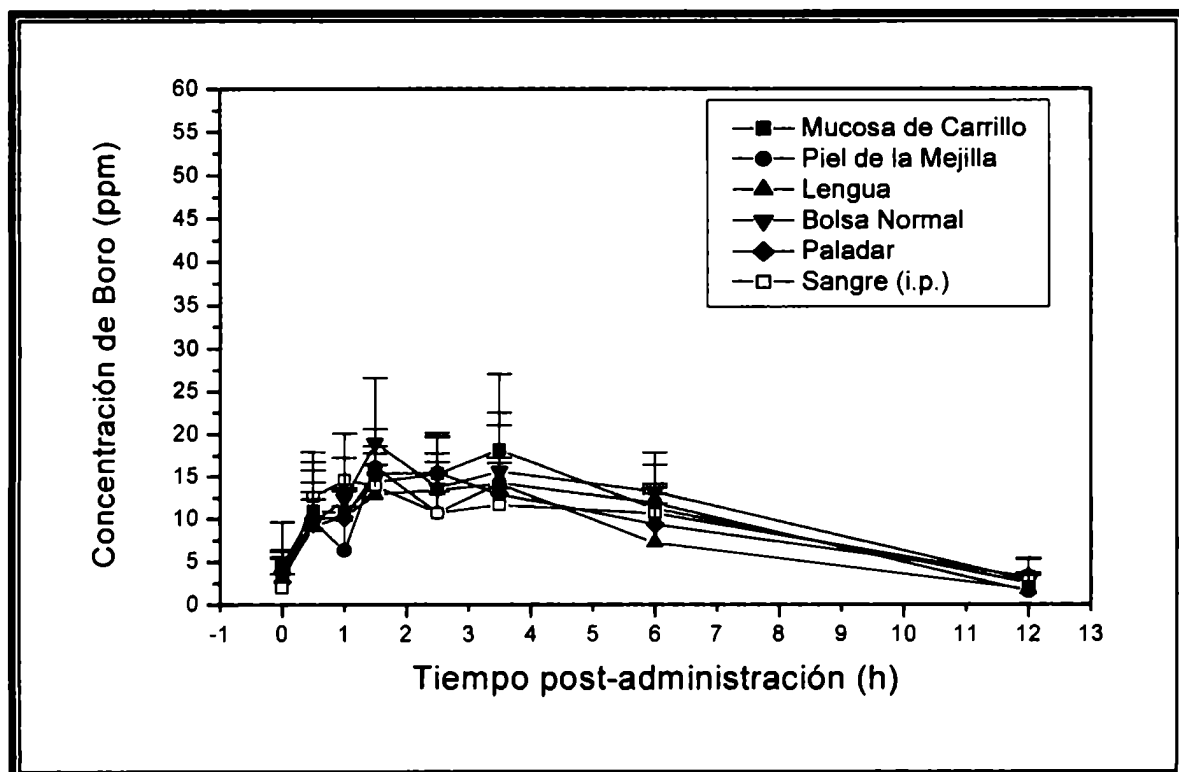


Fig. 30: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, mucosa de carrillo, mucosa de paladar, piel de la mejilla, lengua y bolsa normal en función del tiempo post-administración de una dosis de BPA-F de 300 mg/kg de p.c. Cada punto representa la media $\pm$ D. S. de 5-12 muestras.

La Figura 31 muestra los valores de captación de boro en hígado y bazo los cuales se encuentran dentro del rango encontrado en otros tejidos normales como la bolsa facial. El BPA no sería retenido preferentemente en estos órganos y por lo tanto no constituye un factor adicional limitante de la dosis. Otros compuestos borados como las porfirinas poseen una alta incorporación hepática que puede resultar citotóxica por el compuesto en sí mismo y además obligaría a blindar este órgano en el momento de realizar la irradiación.

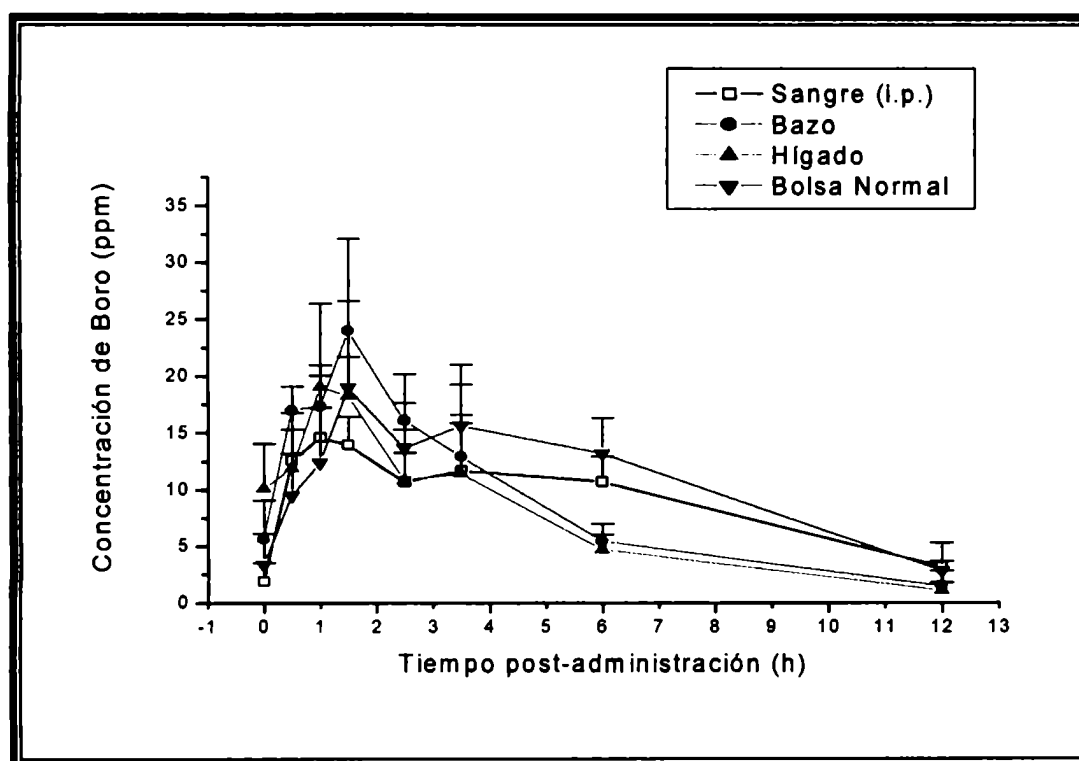


Fig. 31: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, hígado, bazo y bolsa normal en función del tiempo post-administración de una dosis de BPA-F de 300 mg/kg de p.c. Cada punto representa la media $\pm$ D. S. de 5-12 muestras.

En los hámsters inyectados con dosis más altas de BPA, 600 y 1200 mg/kg p. c., se observa una mayor incorporación de boro en el tejido tumoral (Tabla 6). Con la dosis de 600 mg/kg p.c. los niveles de boro en bolsa normal son similares a los obtenidos con 300 mg/kg p.c.. Con la mayor dosis de 1200 mg/kg p.c. los valores de boro en bolsa normal, sangre y mucosa resultan más altos que lo deseable en vistas de una aplicación terapéutica ya que el daño a dichos tejidos podría ser mayor que el

aceptable (Yang W. y col. , 1997). Sin embargo, otros autores opinan que dosis mayores de boro a iguales relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre permitirían un aumento de la ganancia terapéutica de esta terapia ya que el aporte proporcional de dosis de la componente de boro será mayor (Coderre J. A. y col. , 1999). Los valores de boro en sangre para 600 y 1200 mg/kg p. c. resultaron el doble de lo obtenido con 300 mg/kg.

TABLA 6: CONCENTRACIÓN DE BORO (PPM) EN SANGRE Y TEJIDOS PARA DIFERENTES DOSIS DE BPA 3,5 H POST-ADMINISTRACIÓN.

Tejidos	Dosis de BPA (mg/kg)		
	300	600	1200
Sangre (i. p.)	11,7±4,9 ^a (n=11)	23,1±3,8 (n=5)	25,3±5,3 (n=5)
Tumor	36,9±17,5 (15,2-75,8) ^b (n=12)	64,3±34,4 (11,9-120,2) (n=12)	194,3±203,1 (61,3- 510) (n=7)
Tejido precanceroso	19,6±5,8 (n=8)	20,9±1,6 (n=5)	44,1±6,3 (n=5)
Bolsa Normal	15,6±5,4 (n=9)	19,6±5,9 (n=5)	47,7±17,6 (n=5)
Mucosa de Carrillo	18,2±8,9 (n=7)	18,7±5,1 (n=5)	44,9±7,1 (n=5)
Lengua	14,2±6,9 (n=6)	14,3±2,8 (n=5)	37,7±9,3 (n=5)
Mucosa de Paladar	13,0±4,3 (n=5)	24,2±12,4 (n=5)	46,6±7,7 (n=5)
Piel de la Mejilla	14,2±8,3 (n=7)	13,7±5,4 (n=5)	37,2±10,6 (n=5)
Hígado	11,4±4,5 (n=6)	12,5±5,4 (n=5)	33,2±5,3 (n=5)
Bazo	12,9±6,3 (n=7)	14,8±5,5 (n=5)	27,5±4,4 (n=5)

a: Los resultados estan expresados como la media ± D.S.. El número de muestras por condición está indicado entre paréntesis.

b: En el caso de los tumores, se agregó entre paréntesis el rango de valores individuales.

En la siguiente figura (Fig. 32) se observa que la concentración de boro en los tejidos aumenta en forma aproximadamente lineal con la dosis de BPA-F. Estos datos concuerdan con otros datos de la literatura en otros modelos experimentales y en pacientes. La concentración de boro en sangre alcanza un plateau posiblemente

debido a la saturación del sistema de transporte activo que media la incorporación del BPA-F desde la cavidad peritoneal a la sangre (Yang y col. , 1997).

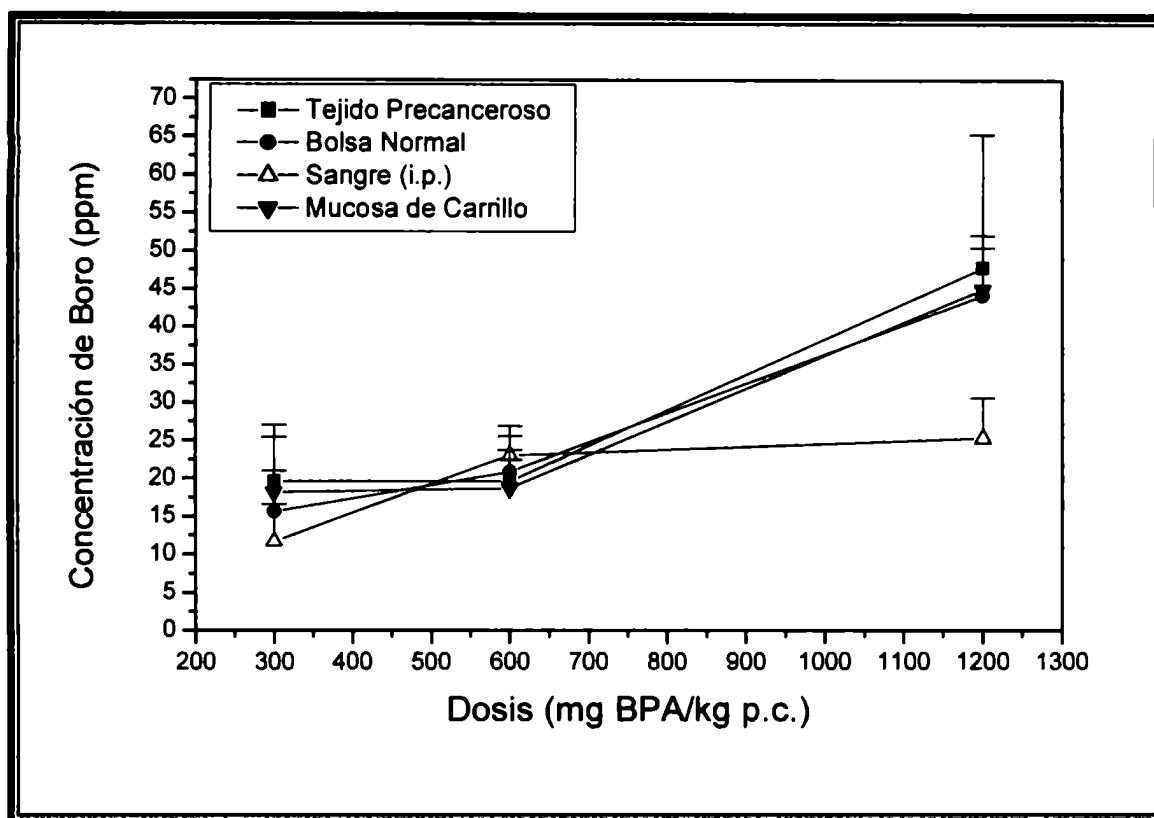


Fig. 32: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, mucosa de carrillo, bolsa normal y tejido precanceroso en función de la dosis de BPA-F a 3,5 h post-administración. Cada punto representa la media $\pm$ D.S. de 5-12 muestras.

b) Heterogeneidad tumoral con respecto a la captación de Boro

La Tabla 7 muestra los resultados de la determinación de boro en 14 muestras de tumor de animales inyectados con 300 mg de BPA-F/kg p.c.. Los tumores están compuestos por distinta proporción de tejido viable y necrótico.

La concentración de boro en el tumor fué marcadamente heterogénea con un rango de 8,1 ppm en tumores compuestos predominantemente por tejido necrótico hasta 32,0 ppm en tumores compuestos mayormente por tejido viable. Los datos fueron agrupados en intervalos de frecuencias y se calculó la media $\pm$ D.S. de cada intervalo; 0-40% de tejido

viable: 8,1 ppm (n=1), 40-70% de tejido viable: $18,4 \pm 2,0$ ppm (n=2), 75-100% de tejido viable: $32,0 \pm 13,5$ ppm (n=11) (Fig. 33). Se observó una diferencia estadísticamente significativa (Test de Student, $p \leq 0,01$) en la captación de BPA entre los tumores moderadamente necróticos ($18,4 \pm 2,0$ ppm) y tumores principalmente compuestos de tejido viable ($32,0 \pm 13,5$ ppm). La única muestra de tumor compuesto mayoritariamente por tejido necrótico suficiente para establecer una correlación entre la histología y la evaluación por ICP-AES muestra una incorporación de boro muy baja (8,1 ppm).

TABLA 7: ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN DE BORO EN TUMORES CON DISTINTA PROPORCIÓN DE TEJIDO VIABLE, MEDIDO CON ANALIZADOR DE IMÁGENES EN CORTES DE TEJIDO.

Tumor	ppm Boro	Porcentaje de tejido viable
1	8,1	8.4
2	31,7	93.8
3	39,2	83.8
4	42,2	91.3
5	44,4	83.7
6	60,1	97.6
7	19,8	57
8	15,1	100
9	24,5	98
10	27,8	100
11	17,1	67
12	16,8	100
13	21,0	100
14	28,4	92,5

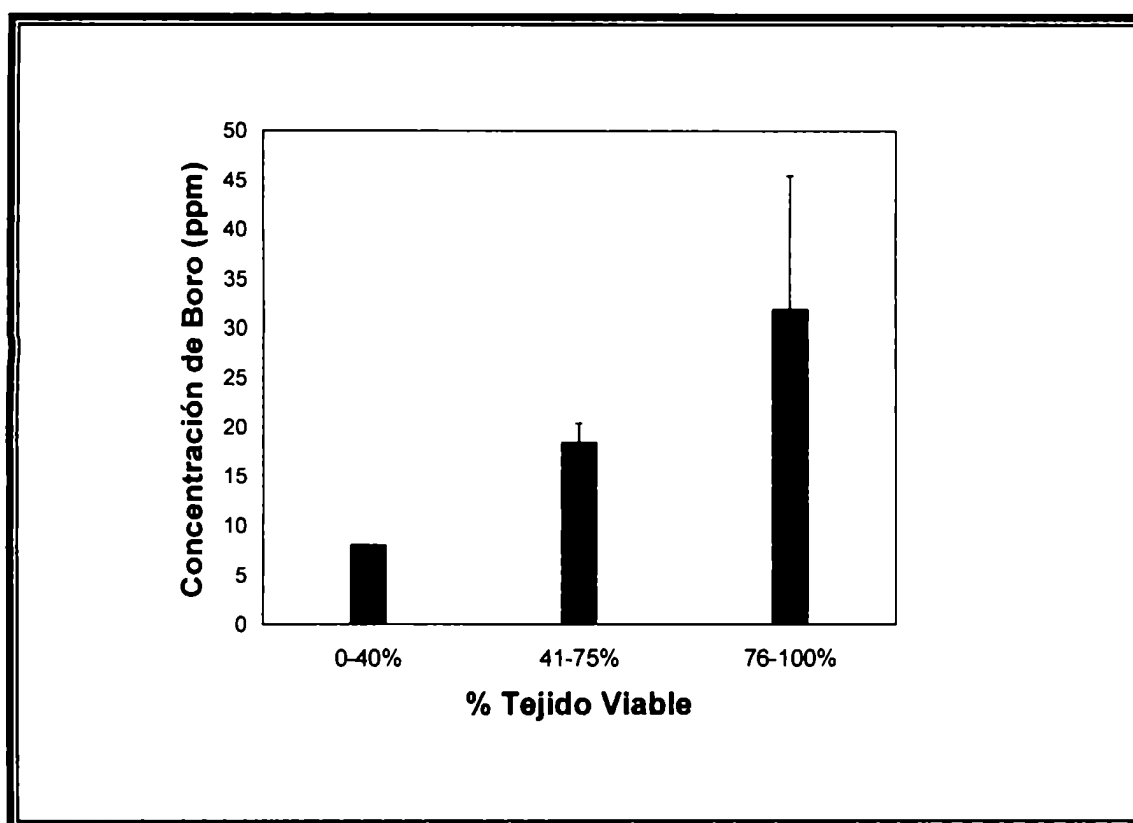


Fig 33: Gráfico de la concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) para 3 intervalos de porcentaje de tejido viable en muestras de tejido tumoral. Los análisis de Boro y la evaluación histológica fueron realizadas en piezas contiguas de tejido para cada muestra de tumor. Las barras representan la media $\pm$ D.S.. El intervalo de 0-40% corresponde a una sola muestra.

La descripción macroscópica del tumor es un parámetro que se puede correlacionar con el análisis histológico. La figura 34 muestra áreas típicas de la tinción con H&E de cortes con tejido predominantemente viable (Panel A) y predominantemente necrótico (Panel B).

Se encontró un resultado similar al anterior cuando se determinó la concentración de boro en muestras de tejido viable y necrótico disecadas del tumor sobre la base de un criterio macroscópico. El resultado del análisis mostró una tendencia, no significativa estadísticamente, de las áreas viables a incorporar más BPA que las áreas necróticas: $36,9 \pm 17,5$ ppm vs. $25,2 \pm 18,5$ ppm. A pesar de la dispersión en los valores, la incorporación de boro en el tejido viable del tumor sería de aproximadamente un 50% mayor que en el tejido necrótico o pre-necrótico.

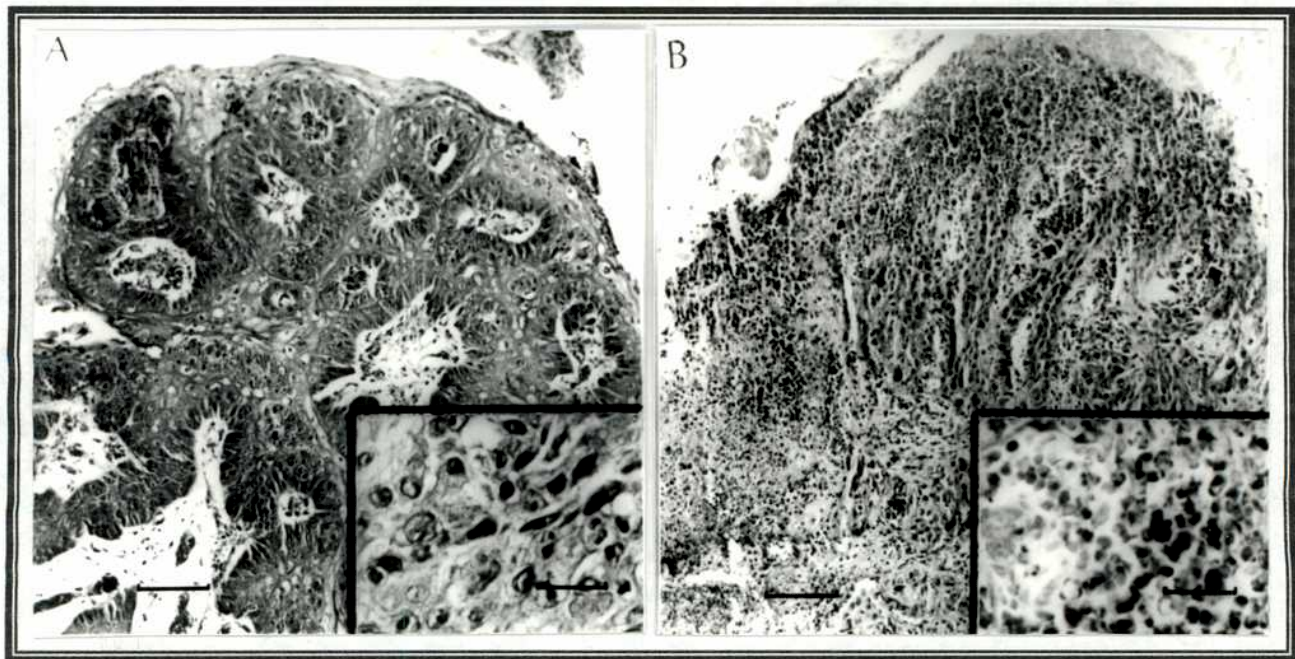


Fig. 34: Microfotografías de cortes de tejido coloreados con Hematoxilina y Eosina tomados de muestras de tejido tumoral contiguas a las cuales se les realizó la determinación de Boro. Panel A: Carcinoma de células escamosas (SCC) semidiferenciado y exofítico; a mayor magnificación se observan células atípicas y viables. Panel B: SCC con áreas extensas de necrosis; a mayor aumento se observan áreas donde las únicas células viables corresponden a células inflamatorias. La magnificación está indicada por una Barra de 80 μm en la foto de menor aumento y 20 μm en el recuadro inferior.

c) Estudio de Biodistribución y Biocinética con un compuesto nuevo: Carboraniltetrafenilporfirina Borada (CuTCPH)

El compuesto CuTCPH fue selectivamente incorporado en el tejido tumoral tanto en el protocolo de dosis simple (Tabla 8, Fig. 35) como en el de dosis múltiples (Tabla 9, Fig. 37). En ningún caso se observaron signos de toxicidad de dicho compuesto.

TABLA 8: CONCENTRACIÓN DE BORO (PPM) EN SANGRE Y TEJIDOS A DIFERENTES TIEMPOS LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA DOSIS SIMPLE DE CuTCPH DE 32 µg/g DE P.C..

Tejidos	Tiempo post-inyección (h)					
	3	6	12	24	48	72
Sangre	3,0±2,4 ^a (n=5)	9,5±9,0 (n=5)	21,7±18,5 (n=4)	6,65±3,29 (n=3)	2,0±3,1 (n=4)	0,46±0,36 (n=5)
Tumor	1,3±2,7 (n=7)	1,6±2,7 (n=5)	8,57±5,0 (n=3)	16,0±14,3 (n=9)	11,9±6,1 (n=9)	8,4±5,4 (n=12)
Tejido precanc.	1,3±0,8 (n=3)	6,78 (n=2)	2,1±2,3 (n=3)	6,0±6,0 (n=6)	4,6±3,7 (n=6)	5,0±5,6 (n=7)
Bolsa Normal	0,3±0,6 (n=4)	0,23 (n=2)	0,6±0,5 (n=3)	2,1±1,4 (n=6)	3,8±2,2 (n=6)	1,5±1,3 (n=6)
Mucosa de Carrillo	0,9±0,3 (n=3)	2,2 (n=2)	4,9±3,7 (n=3)	4,8±3,4 (n=6)	2,8±1,5 (n=6)	2,0±2,2 (n=7)
Lengua	0,7±0,7 (n=4)	0,82 (n=1)	2,2±2,7 (n=3)	4,7±2,3 (n=5)	4,3±1,7 (n=5)	2,6±2,0 (n=6)
Mucosa de Paladar	1,0±0,8 (n=4)	1,1 (n=2)	4,1±2,5 (n=3)	3,7±1,7 (n=7)	3,1±1,8 (n=7)	1,8±1,2 (n=7)
Piel de la Mejilla	0,4±0,4 (n=3)	2,1 (n=2)	1,8±1,0 (n=4)	4,2±2,3 (n=7)	5,1±2,9 (n=6)	2,0±1,1 (n=5)
Bazo	5,7±5,6 (n=4)	12,1 (n=2)	11,5±6,0 (n=4)	19,2±7,7 (n=7)	33,8±13,6 (n=6)	41±13,8 (n=7)
Hígado	3,1±1,5 (n=4)	25,3 (n=2)	21,0±6,1 (n=3)	56,5±12,6 (n=6)	106,1±29,2 (n=6)	117,7±27,8 (n=6)
Cerebro	0 (n=2)		1,4 (n=1)	1,1±0,7 (n=4)	0 (n=4)	0,2 ±0,4 (n=6)
Glándula Parótida	1,3 (n=1)	0,7 (n=2)	0,4±0,6 (n=3)	1,18±0,8 (n=5)	0 (n=2)	0,4±0,3 (n=6)

a: Los resultados estan expresados como la media ± D.S.. El número de muestras por condición esta indicado entre paréntesis.

La mejor relación individual obtenida con el protocolo de dosis simple fue de tumor/bolsa normal: **32,7:1 (24 h)** y tumor/sangre: **31,8:1 (48 h)**. La cantidad de boro en el tumor alcanzó un valor máximo de **43,8 ppm (24 h)** con una media de **16 ± 14,3 ppm (24 h)**. A pesar de las buenas relaciones obtenidas, el valor medio de boro en el tumor no sería suficiente para alcanzar los valores terapéuticos. Los niveles de boro en sangre y bolsa normal son significativamente menores que en el tumor a partir de las 24 h post-administración. El tejido precanceroso circundante al tumor tiene una captación mayor que el tejido normal a las 6, 24 y 72 h post-administración.

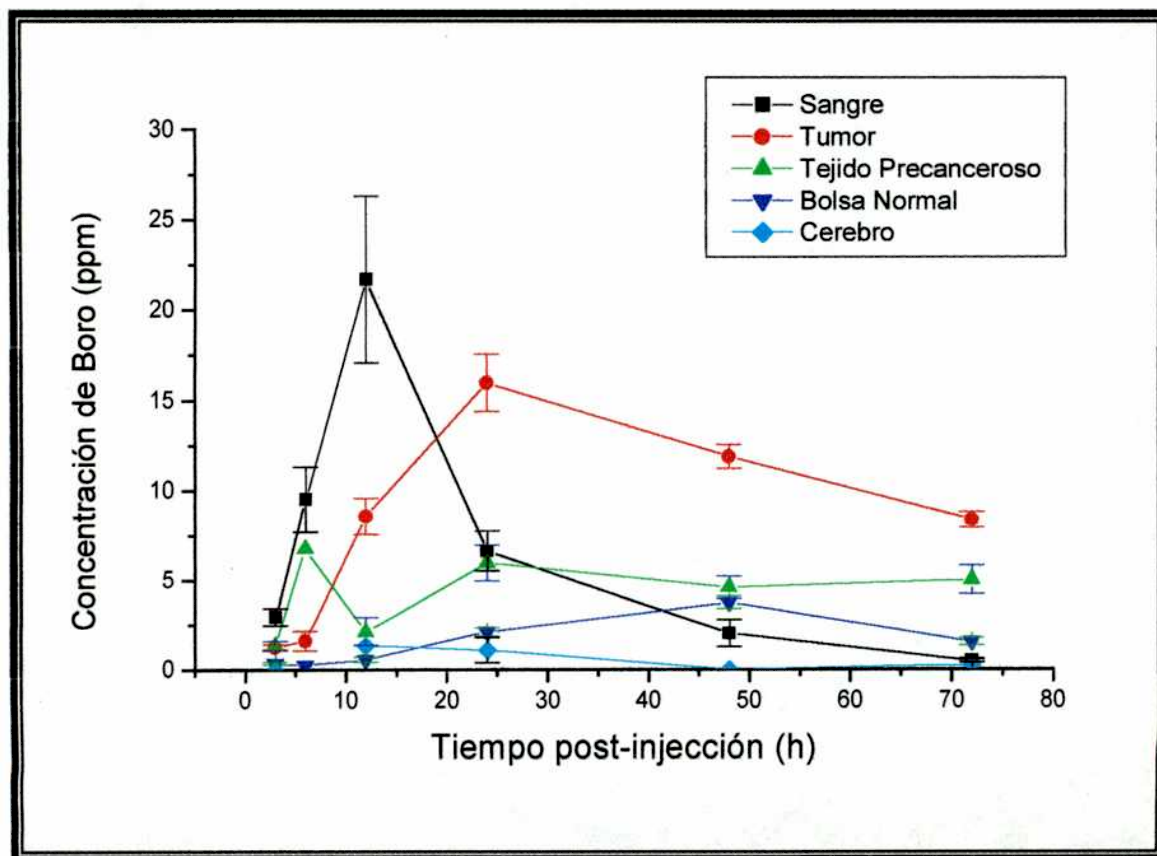


Fig 35: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, bolsa normal, tumor y tejido precanceroso circundante al tumor en función del tiempo post-administración de una dosis simple de CuTCPH i. p. 32 $\mu\text{g B/g p.c.}$. Cada punto representa la media $\pm$ D. S..

Los tejidos orales alcanzan concentraciones de boro similares a los encontrados en la bolsa y son levemente mayores que los valores de sangre a las 48, y 72 h (Fig. 36). Esta diferencia, sin embargo, no resultó significativa. Los valores de boro en la piel son similares a los de los tejidos orales en todos los tiempos ensayados.

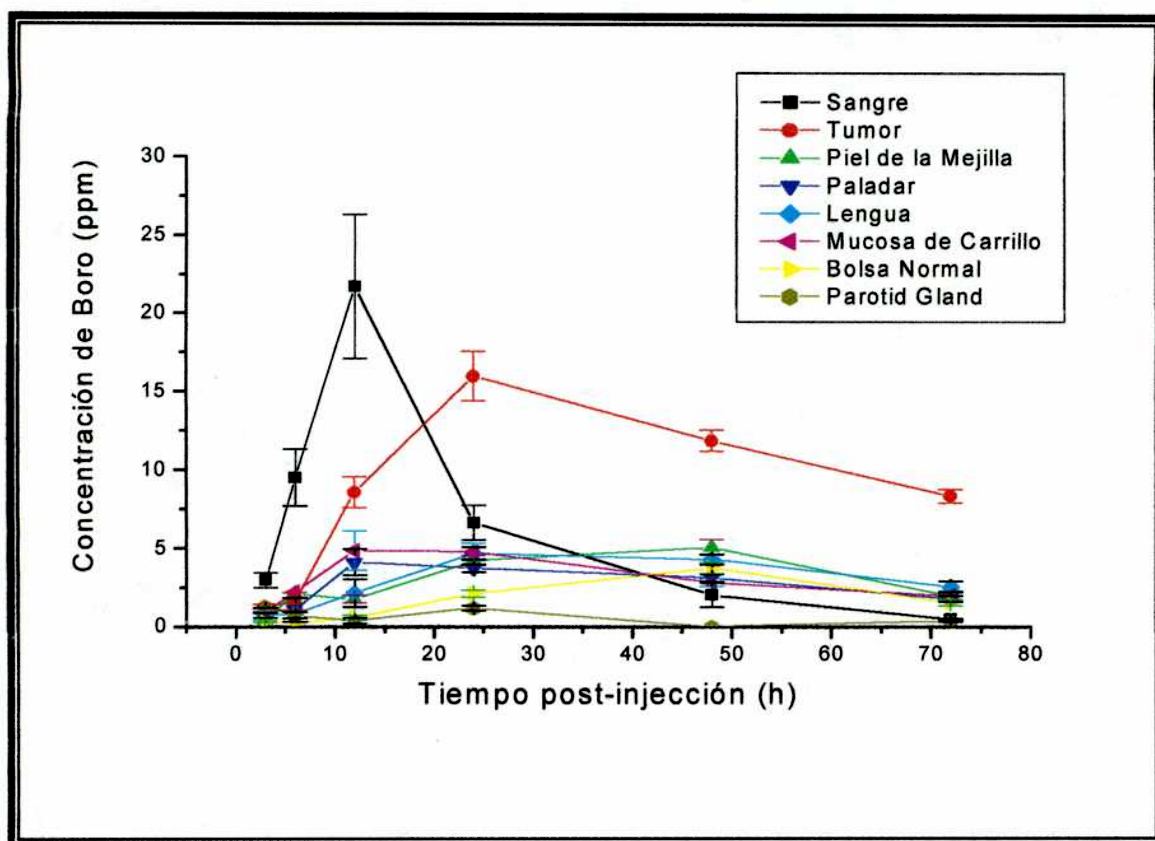


Fig. 36: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, mucosa de carrillo, mucosa de paladar, piel de la mejilla, lengua y bolsa normal en función del tiempo post-administración de una dosis simple de CuTCPH i. p. 32 $\mu\text{g/g}$ p.c.. Cada punto representa la media $\pm$ D.S..

Con el protocolo de dosis múltiples las máximas relaciones individuales fueron en el caso de tumor/bolsa normal: **53,3:1 (3 días)** y en el caso de tumor/sangre: **3633:1 (4 días)**. El valor medio en tumor a los 3 días fue de **68 ± 25 ppm** (Tabla 10, Tabla 9). En todos los tiempos estudiados los valores de boro en tumor fueron significativamente mayores que en la bolsa normal y en la sangre (Fig. 37). Se observó una mayor captación de boro en el tejido precanceroso con respecto al tejido de la bolsa normal y a la sangre. Las diferencias entre el tejido precanceroso y la sangre resultaron estadísticamente significativas a partir de los 3 días.

En resumen, el esquema de administración de 4 inyecciones de CuTCPH (esquema de dosis múltiples) dadas en 2 días sucesivos permitió mantener alta la concentración de boro en el tumor en combinación con una considerable eliminación del compuesto de la sangre.

TABLA 9: CONCENTRACIÓN DE BORO (PPM) EN SANGRE Y TEJIDOS A DIFERENTES TIEMPOS LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN DE 4 DOSIS DE CuTCPH DE 32 µg/g DE P.C..

Los resultados se presentan como la media $\pm$ D.S. del número de muestras consignadas para cada condición.

Tejidos	Tiempo post-iny			
	1 día	2 días	3 días	4 días
Sangre (i. p.)	31,2 $\pm$ 11,2 (n=4)	11,1 $\pm$ 6,5 (n=3)	0,2 $\pm$ 0,2 (n=3)	0,1 $\pm$ 0,1 (n=4)
Tumor	61,6 $\pm$ 11,8 (n=4)	66,2 $\pm$ 6,9 (n=3)	68,0 $\pm$ 25,0 (n=3)	42,1 $\pm$ 36,1 (n=6)
Bolsa Normal	7,1 $\pm$ 3,3 (n=3)	5,0 $\pm$ 5,1 (n=3)	3,4 $\pm$ 3,1 (n=3)	5,0 $\pm$ 1,39 (n=4)
Tejido Precanc.	16,2 $\pm$ 4,9 (n=3)	17,1 $\pm$ 13,6 (n=3)	10,3 $\pm$ 3,2 (n=3)	15,6 $\pm$ 10,5 (n=4)
Hígado	163,8 $\pm$ 53,1 (n=3)	239,8 $\pm$ 23,8 (n=3)	276,7 $\pm$ 77,3 (n=3)	258,1 $\pm$ 77,4 (n=4)
Piel de la mejilla	17,0 $\pm$ 5,2 (n=3)	13,4 $\pm$ 8,4 (n=3)	17,7 $\pm$ 13,1 (n=3)	13,3 $\pm$ 1,78 (n=4)
Mucosa de Carrillo	10,1 $\pm$ 5,5 (n=3)	7,7 $\pm$ 5,1 (n=3)	5,4 $\pm$ 1,1 (n=3)	5,6 $\pm$ 1,9 (n=4)
Lengua	14,6 $\pm$ 0,9 (n=3)	13,3 $\pm$ 7,1 (n=3)	12,9 $\pm$ 4,1 (n=3)	12,0 $\pm$ 1,5 (n=4)
Mucosa de Paladar	15,1 $\pm$ 2,1 (n=3)	11,8 $\pm$ 4,9 (n=3)	16,6 $\pm$ 14,6 (n=3)	8,1 $\pm$ 1,9 (n=4)
Glándula parótida	5,2 $\pm$ 1,3 (n=3)	6,2 (n=2)	3,8 $\pm$ 0,5 (n=3)	3,3 $\pm$ 1,6 (n=4)
Cerebro	1,8 $\pm$ 0,2 (n=3)	1,8 $\pm$ 0,4 (n=3)	2,7 $\pm$ 3,0 (n=3)	0,8 $\pm$ 0,3 (n=4)
Bazo	71,8 $\pm$ 11,3 (n=3)	72,5 $\pm$ 59,0 (n=3)	103,7 $\pm$ 21,8 (n=3)	56,4 $\pm$ 23,0 (n=3)

En los tejidos orales normales: mucosa de carrillo, lengua, mucosa de paladar, bolsa normal, parótida y piel de la mejilla, el contenido de boro fue significativamente mayor que en la sangre para los 3 y 4 días post-administración. Todos ellos captaron menor cantidad de boro que el tumor en todos los tiempos ensayados (Fig. 38). Dentro de los tejidos orales se observan dos poblaciones que difieren levemente entre sí en cuanto a la concentración de boro. La piel de la mejilla, mucosa de paladar y la lengua captaron más boro que la mucosa de carrillo, bolsa normal y glándula parótida. Esto solo refleja una tendencia pues las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

Los valores de boro en cerebro fueron bajos en el protocolo de dosis simple (0 - 1,4 ppm) y en el protocolo de dosis múltiples (0,8 – 2,7 ppm) (Tabla 8, Tabla 9). Estos resultados son consistentes con el hecho que dicho compuesto no atraviesa la barrera hematoencefálica (Gregoire V y col. ,1993).

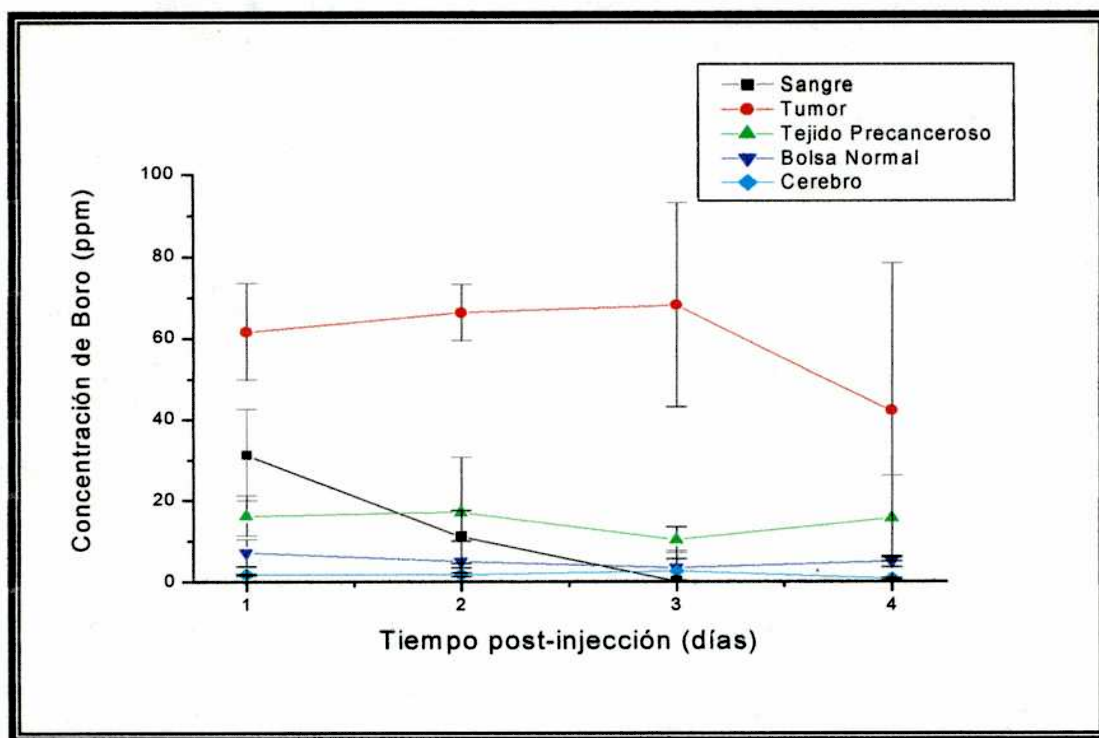


Fig. 37: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, bolsa normal, tumor y tejido precanceroso circundante al tumor en función del tiempo post-administración de 4 dosis de CuTCPH i.p. 32 $\mu\text{g/g}$ p.c.. Cada punto representa la media $\pm$ D.S..

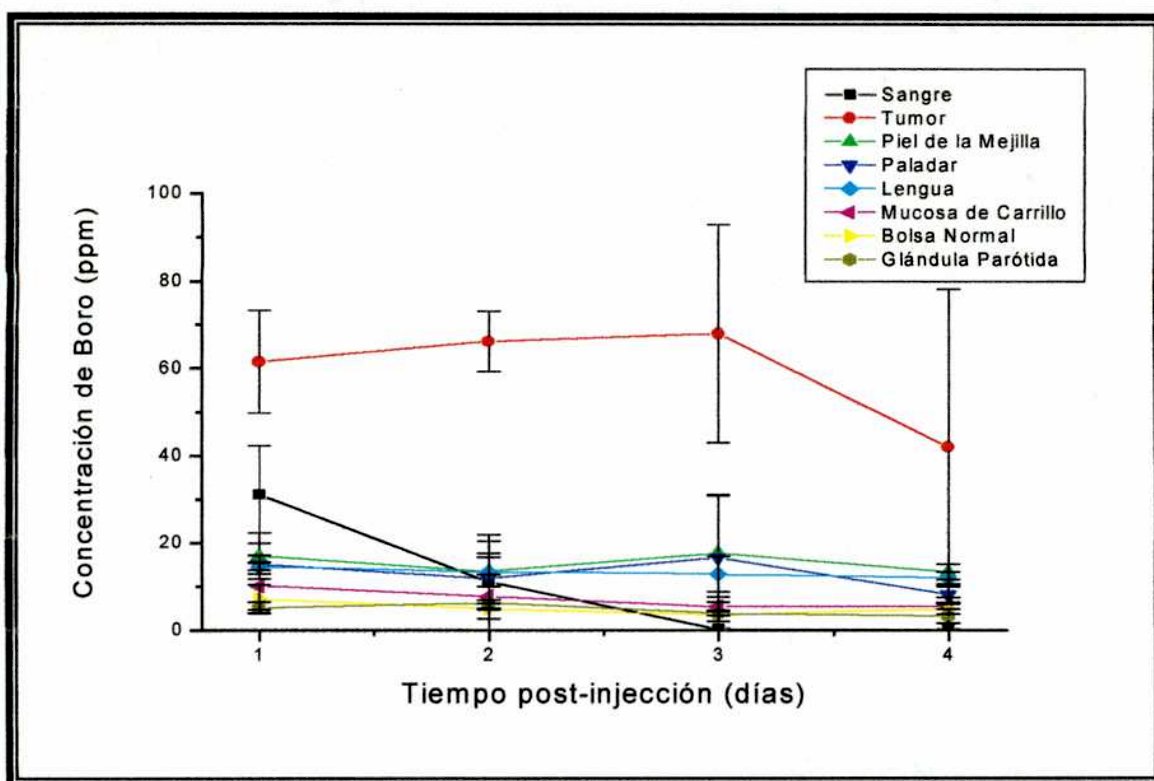


Fig. 38: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, mucosa de carrillo, mucosa de paladar, piel de la mejilla, lengua y bolsa normal en función del tiempo post-administración de 4 dosis de CuTCPH i. p. 32 $\mu\text{g/g}$ p.c.. Cada punto representa la media $\pm$ D. S..

Una desventaja del CuTCPH consiste en su alta acumulación en hígado: 117,7 ppm (dosis simple, valor máximo) y 276,7 ppm (dosis múltiples, valor máximo) y en bazo 41 ppm (dosis simple, valor máximo) y 103,7 ppm (dosis múltiples, valor máximo). En el caso del hígado se han descrito casos de toxicidad para otras porfirinas evaluadas. En nuestro caso no se observaron signos severos de toxicidad en los tiempos estudiados. De todos modos en el momento de realizar la irradiación con neutrones estos órganos deberían ser blindados pues resultarían sumamente radiosensibles dada la cantidad de boro acumulada (Fig. 39).

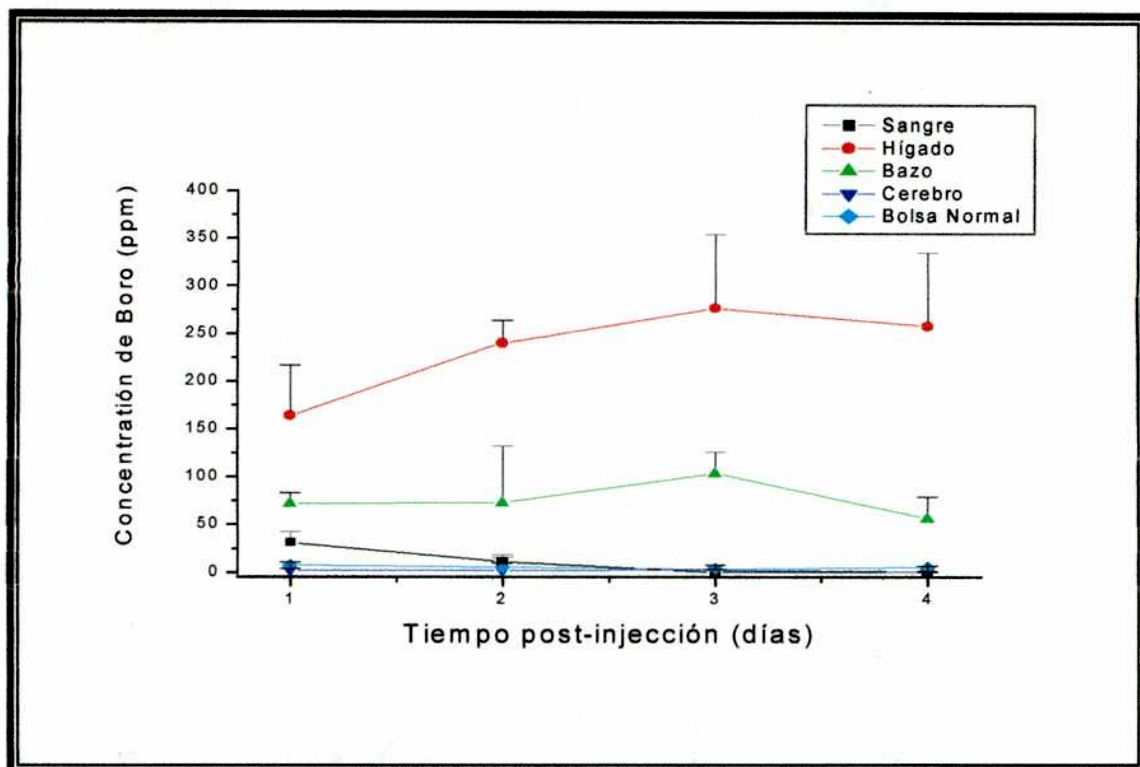


Fig. 39: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en tumor, sangre, hígado, bazo, y bolsa normal en función del tiempo post-administración de 4 dosis de CuTCPH i.p. 32 $\mu\text{g/g}$ p.c.. Cada punto representa la media $\pm$ D. S..

El compuesto CuTCPH se acumula preferencialmente en las células tumorales y en menor medida en los tejidos normales. Se elimina casi completamente de la sangre en condiciones en las cuales todavía persiste en gran cantidad en el tumor.

Comparando los dos protocolos utilizados (simple y múltiple) se observó, en ambos casos, **relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre mayores que el valor de 3,5:1** que se consigue con los compuestos comercialmente disponibles utilizados en el ámbito clínico. Más aún, el protocolo de administración con dosis múltiples fue capaz de entregar mayor cantidad absoluta de boro al tumor en el cual alcanzó **valores muy por encima del umbral terapéutico de 30 ppm**.

d) Estudio comparativo de dos compuestos de Boro: CuTCPH y BPA-F

La Tabla 10 compara los resultados de los estudios de biodistribución y farmacocinética con los dos compuestos borados utilizados. Las relaciones individuales máximas de contenido de boro fueron de tumor/bolsa normal (T/N): 53,3:1 y de tumor/sangre (T/S): 3633:1 para CuTCPH (dosis múltiples) y de T/N: 5,1:1 y de T/S: 4,8:1 para BPA-F. Los valores absolutos máximos en tumor fueron de 106,40 ppm de boro para CuTCPH y 64,4 ppm para BPA. Los tiempos de retención de boro en el tumor son más largos para CuTCPH que los observados para BPA. Esto representaría una ventaja pues habría un margen de tiempo mayor para realizar la irradiación con neutrones.

Con ambos compuestos el tejido precanceroso circundante al tumor mostró una tendencia a incorporar mayor cantidad de boro que el tejido normal, pero menos que el tumor tal como se detalla a continuación. Tumor: $68,0 \pm 25,0$; tejido precanceroso: $10,3 \pm 3,2$; bolsa normal: $3,4 \pm 3,1$ ppm de boro para CuTCPH (dosis múltiples, 3 días post-administración) y $36,9 \pm 17,5$; $19,6 \pm 5,8$; $15,6 \pm 5,4$ ppm para BPA (3,5 h post-administración) respectivamente (Fig. 40).

Como se mencionó anteriormente, una desventaja del compuesto CuTCPH es su alta concentración en hígado y bazo en contraposición a lo que ocurre con el BPA, el cual se acumula en dichos tejidos en la misma proporción que en otros tejidos normales como la bolsa de la mejilla (Fig. 40).

TABLA 10: COMPARACIÓN DE LA CAPTACIÓN DE BORO Y BIOCINÉTICA EN SANGRE Y TEJIDOS DE DOS COMPUESTOS BORADOS: CuTCPH (DOSIS SIMPLE Y DOSIS MÚLTIPLES) Y BPA-F.

	BPA	CuTCPH (Dosis Simple)	CuTCPH (Dosis Múltiples)
Dosis del Compuesto	300 mg/kg p. c.	32 mg/kg p. c.	128 mg/kg p. c.
Dosis de Boro	15,5 mg/kg p. c.	10mg/kg p. c.	40 mg/kg p. c.
<u>Relaciones Individuales Máximas</u>			
Tumor/Bolsa Normal	5,1/1 (3,5h)	32,7/1 (24h)	53,3/1 (3d)
Tumor/Sangre	4,8/1 (3,5h)	31,8/1 (48h)	3633/1 (4d)
<u>Valores Máximos Absolutos</u>			
Valor Individual	64,4 (1,5 h) 43,8 (3,5 h)	43,8 (24 h)	106,4 (4d)
Valor Medio	36,9 ± 17,5 (3.5h)	16,0 ± 14,3 (24 h)	68,0 ± 25,0 (3d)
<u>Relaciones Medias</u>			
Tumor/Bolsa Normal	3,1/1 (0,5h) 1,8/1 (1h) 2,0/1 (1,5h) 2,3/1 (2,5h) 2,4/1 (3,5h) 1,4/1 (6 h) 1,6/1 (12 h)	3,8/1 (3h) 7,0/1 (6h) 15,3/1 (12h) 7,6/1 (24h) 3,2/1 (48h) 5,4/1 (72h)	8,7/1 (1d) 13,4/1 (2d) 19,9/1 (3d) 8,5/1 (4d)
Tumor/Sangre	2,3/1 (0,5h) 1,5/1 (1 h) 2,8/1 (1,5h) 2,9/1 (2,5h) 3,2/1 (3,5h) 1,8/1 (6 h) 1,4/1 (12h)	0,4/1 (3h) 0,2/1 (6h) 0,4/1 (12h) 2,4/1 (24h) 5,9/1 (48h) 18,2/1 (72h)	2,0/1 (1d) 6,0/1 (2d) 400/1 (3d) 300/1 (4d)

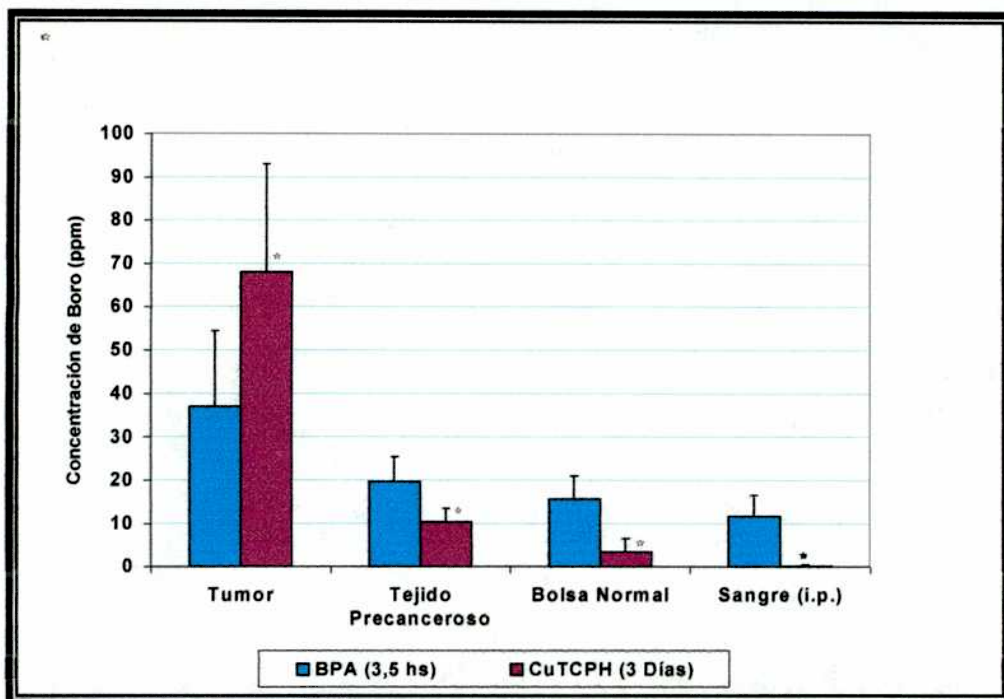


Fig. 40: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en sangre, bolsa normal, tumor y tejido precanceroso circundante al tumor al tiempo post-adm. Indicado de 4 dosis de CuTCPH i. p. $32 \mu\text{g/g}$ p. c. (3 días) y BPA-F 300 mg/kg de p. c. (3,5 h). Cada punto representa la media $\pm$ D. S.. * indica diferencias significativas entre ambos compuestos.

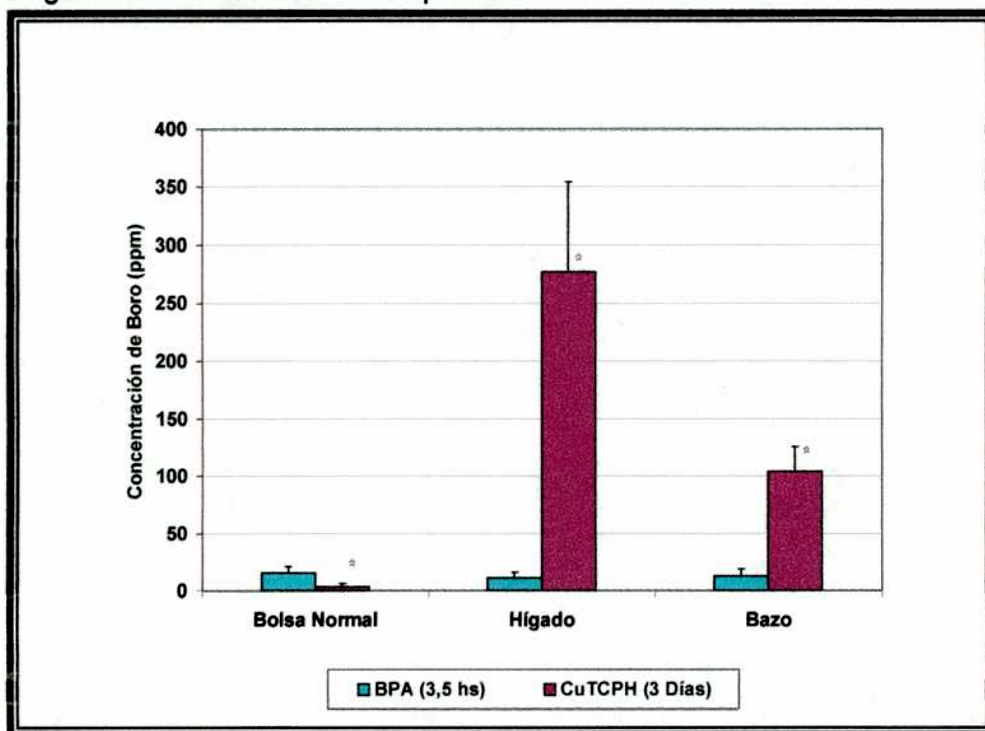


Fig. 41: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en bolsa normal, hígado y bazo al tiempo post-adm. indicado de 4 dosis de CuTCPH i. p. $32 \mu\text{g/g}$ p.c. (3 días) y BPA-F 300 mg/g de p. c. (3,5 h). Cada punto representa la media $\pm$ D. S.. * indica diferencias significativas entre ambos compuestos.

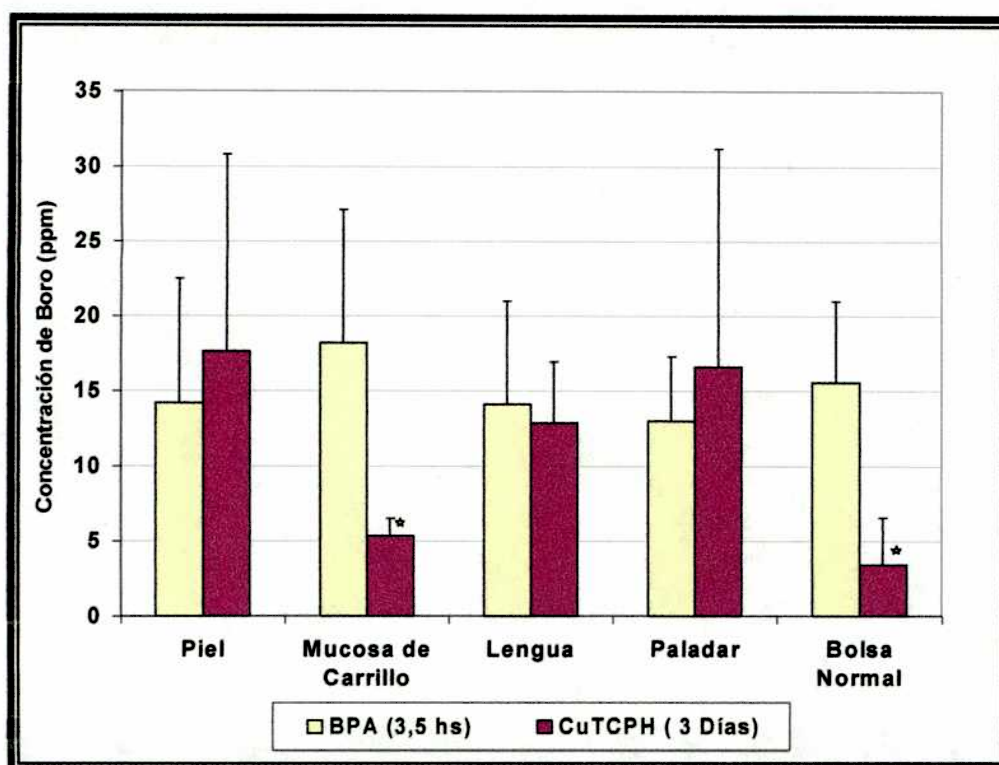


Fig. 42: Concentración de Boro ($\mu\text{gB/g}$) en mucosa de carrillo, mucosa de paladar, piel de la mejilla, lengua y bolsa normal al tiempo post-adm. indicado de 4 dosis de CuTCPH i. p. $32 \mu\text{g/g p. c.}$ (3 días) y BPA-F $300 \text{ mg/kg de p. c.}$ (3,5 h). Cada punto representa la media $\pm$ D. S.. * indica diferencias significativas entre ambos compuestos.

Ambos compuestos se incorporan a los tejidos orales sanos en cantidades similares a las que se incorporan al tejido de la bolsa normal. Tanto el BPA como el CuTCPH son no tóxicos en las dosis empleadas.

6.2. ESTUDIOS DE BNCT EN TUMORES DE LA BOLSA FACIAL DEL HÁMSTER (RA-6, CAB)

a) Respuesta del tejido tumoral y normal al BNCT

Se irradiaron un total de 38 animales en las condiciones mencionadas anteriormente en Materiales y Métodos. Debido a la disposición de las bolsas de la mejilla en el momento de la irradiación, parte de la cabeza del hámster fue expuesta al haz de neutrones de 15 cm de diámetro. El dispositivo funcionó bien pues los animales quedaron perfectamente inmovilizados y sostenidos (Fig. 43).

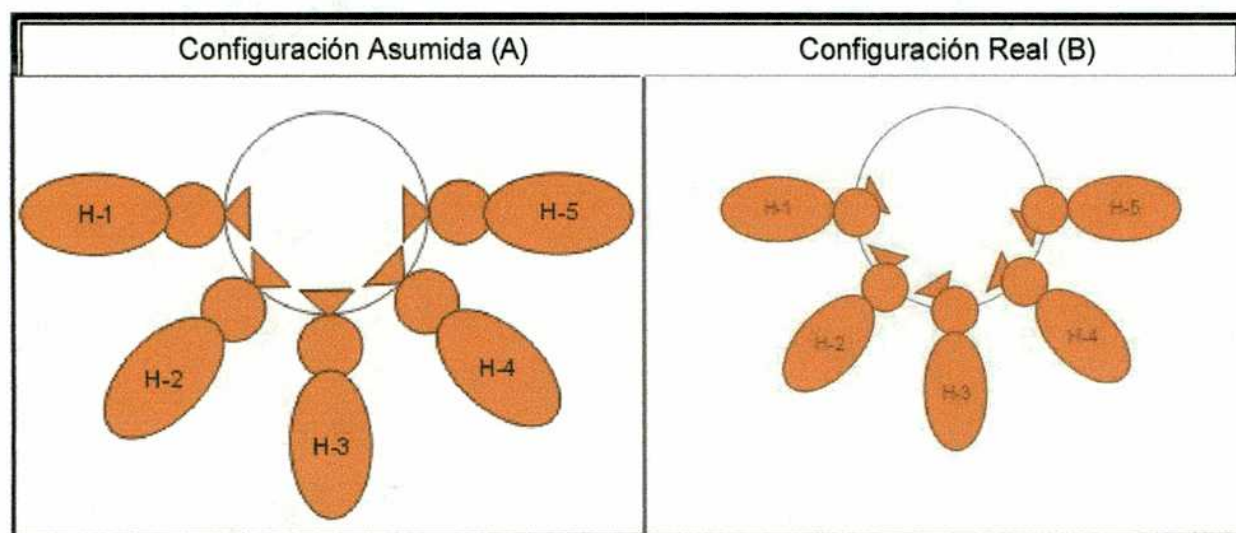


Fig. 43: En la figura A se observa la configuración asumida para realizar los cálculos preliminares de dosis, y en el panel B se observa la configuración real de los Hámsters en el momento de la irradiación que fue empleada para el cálculo final de dosis.

La Fig. 44 muestra los hámsters posicionados, anestesiados e inmovilizados en el dispositivo de irradiación del RA-6. El mismo fue construido en madera con una apertura central de 15 cm de diámetro que corresponde a la salida del haz de neutrones (perpendicular al plano de la foto). Sobre esta apertura se colocó una lámina de cartón duro en el centro para poder fijar las bolsas faciales evertidas. Solo una parte de la cabeza fue expuesta también al haz. Todo el cuerpo del animal se blindó con el blindaje de la pared del reactor (Fig. 20). Sobre esta pared se encuentra la apertura que corresponde a la salida del haz. Para inmovilizar a los animales se usó una cinta de velcro que permitió sujetarlos. Se verificó que su respiración fuera normal. Una cámara de video fue colocada

en la sala de irradiación para monitorear el estado general del animal. De los 38 hámsters tratados solo uno murió por una sobredosis de anestesia. El resto de los animales despertaron normalmente luego de la irradiación. No se observó injuria por irradiación en ninguno de los animales tratados.



Fig. 44: Dispositivo de irradiación. La foto muestra los Hámsters posicionados, anestesiados e inmovilizados en el dispositivo de irradiación. El mismo fue construido en madera con una apertura central de 15 cm de diámetro correspondiente a la salida de haz de neutrones (perpendicular al plano de la foto). Sobre esta apertura se colocó una lámina de cartón duro en el centro para poder fijar las bolsas de la mejilla evertidas. Sólo una parte de la cabeza también fue expuesta al haz.

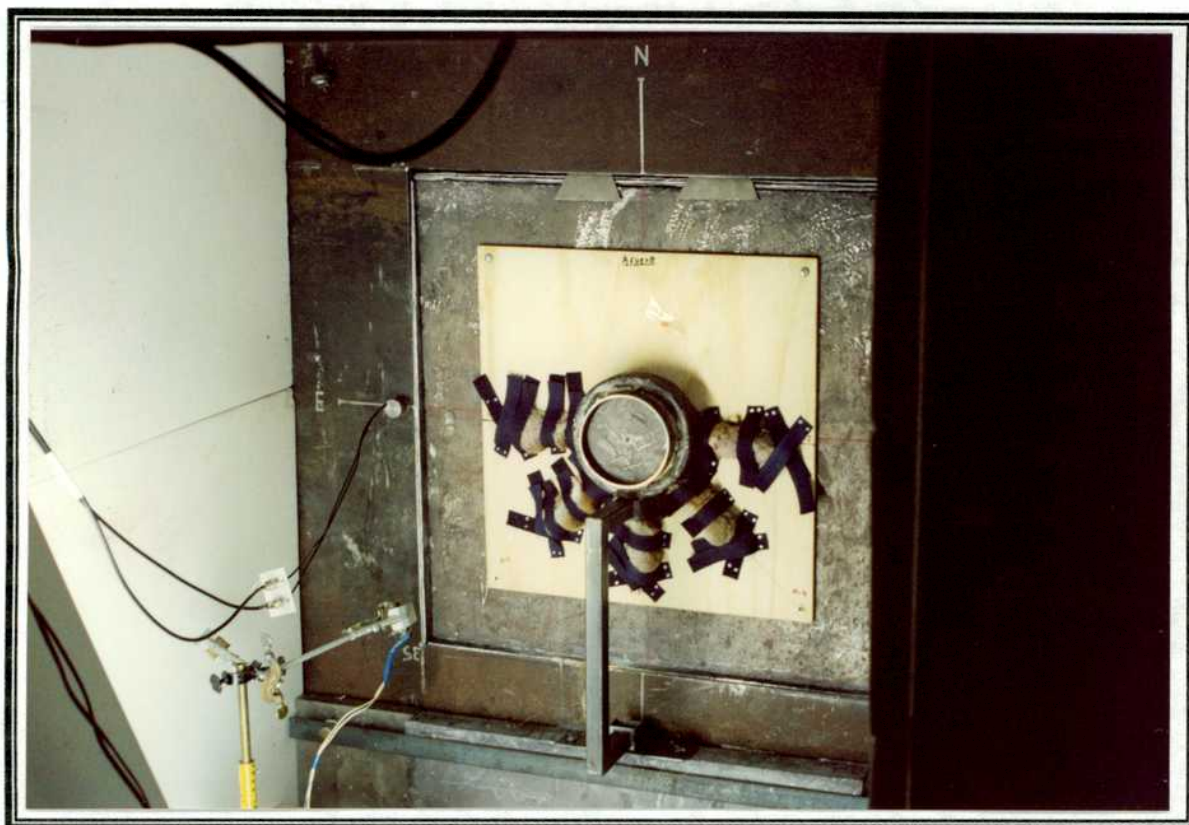


Fig. 45: Dispositivo de irradiación. Todo el cuerpo del animal está blindado con el blindaje de la pared del reactor. Sobre esta pared se encuentra la apertura que corresponde a la salida del haz. Para inmovilizar a los animales se usó una cinta de velcro que permitió sujetar a los animales. Se verificó que su respiración fuera normal. Se observa la apertura en el blindaje que corresponde a la salida del haz. Una cámara de video fue colocada en la sala de irradiación para monitorear el estado general del animal.

En la Tabla 11 se describen las dosis en Gy-Eq correspondientes a 62 minutos de irradiación, para cada uno de los componentes de la reacción de BNCT. La dosis total absorbida en el tumor asumiendo una concentración de boro de 30 ppm y un CBE de 3,8 fue de aproximadamente 15 Gy-eq y la dosis en la bolsa normal asumiendo una concentración de boro de 10 ppm y un CBE de 3,2 fue de 7,5 Gy-Eq.

TABLA 11: DOSIS (Gy-Eq) PARA CADA COMPONENTE

	D_n	D_G	D_{Boro} (30ppm)	D_{Boro} (10ppm)	D_N	$DT_{Tej.Nor}$	DT_{Tumor}
Bolsa	3,26	1,40	9,58	1,09	0,70	7,50	14,94
Cabeza	2,30	0,95		0,79	0,48	4,52	
Cuerpo	1,31	0,50		0,40	0,26	2,47	

D_n es la dosis de neutrones rápidos, D_G corresponde a la dosis gamma la cual es una sumatoria de la radiación gamma propia del haz de neutrones y la componente gamma de la reacción de captura en Boro. D_{Boro} se refiere a la dosis por la reacción de captura del neutron térmico por el Boro que depende de la concentración de Boro en el tejido y estaría dada por la dosis entregada por las dos partículas de alto LET producidas durante la reacción (Li y alfa). D_N corresponde a la dosis por captura de los neutrones térmicos por el Nitrogeno presente en los tejidos. DT se refiere a la dosis total que es la suma de todos los componentes de dosis.

Luego del tratamiento con el BNCT se observó la respuesta individual de cada tumor. La Tabla 12 muestra los datos que corresponden a los animales inyectados con 300 mg de BPA/kg p.c.. Se consigna el volumen tumoral antes del BNCT y a distintos tiempos post-tratamiento (1, 7, 14, 21 y 30 días).

En los tumores 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, y 22 se observó la remisión completa, en los casos 4, 8, y 22 la remisión fué parcial y en un solo caso (18) se observó progresión tumoral. En el caso 20 se sacrificó el animal para realizar el análisis histológico antes de poder clasificar la respuesta tumoral. En todos los casos el análisis histológico permitió confirmar los hallazgos macroscópicos como se describe más adelante.

TABLA 12. HÁMSTERS CON TUMOR INYECTADOS CON 300 mg de BPA/kg p.c. Y TRATADOS CON BNCT (volumen expresado en mm³)

Hámster	Tumor	Pre-trat.	1 día	7 días	14 días	21días	30días
1	1	24	21,9	0	-	-	-
2	2	48	0	-	-	-	-
2	3	9	0	-	-	-	-
3	4	110	75	13,1	-	-	-
3	5	7,5	18	0	-	-	-
4	6	62,5	62,5	-	0	0	0
5	7	30	28	0	0	-	-
6	8	17,5	10,5	-	-	-	-
6	9	5	0	-	-	-	-
6	10	2	0	-	-	-	-
6	11	2,3	0	-	-	-	-
7	12	90	88	168	0	0	0
8	13	17,5	2,6	2,6	0	-	-
9	14	22,5	12	0	0	0	0
9	15	5	14	0	0	0	0
10	16	27	30	0	-	-	-
10	17	9,4	6	0	-	-	-
11	18	60	40	12,3	30	105	294
12	19	28	6	0	-	-	-
13	20	11,3	15	-	-	-	-
13	21	13,5	0	-	-	-	-
14	22	720	600	780	360	-	-
15	23	12	0	0	0	0	0

A un día post-BNCT se sacrificaron los hámsters portadores de los tumores: 2, 3, 8, 9, 10, 11, 20, 21; a 7 días post-BNCT se sacrificaron los hamsters portadores de los tumores: 1, 4, 5, 16, 17, 19, a 14 días post-BNCT se sacrificaron los hámsters portadores de los tumores: 7, 13, 22 y a 30 días post-BNCT se sacrificaron los hámsters portadores de los tumores: 6, 12, 14, 15, 18, 23.

El tumor número 20 no pudo ser debidamente clasificado pues el animal número 13 fue sacrificado a las 24 h post-irradiación, momento en el cual el tumor todavía estaba presente. Dado que un gran número de tumores entraron en remisión y

desaparecieron a tiempos más largos no fue posible clasificar la respuesta tumoral en este caso.

Con el fin de visualizar mejor la respuesta tumoral los datos fueron normalizados al 100 % de su volumen inicial (Tabla 13).

TABLA 13. HÁMSTERS CON TUMOR INYECTADOS CON 300 mg de BPA/kg p.c. Y TRATADOS CON BNCT (porcentaje del volumen inicial)

Tumor	Pre. Trat.	1 día	7 días	14 días	21 días	30 días
1	100	92	0	-	-	-
2	100	0	-	-	-	-
3	100	0	-	-	-	-
4	100	68	12	-	-	-
5	100	240	0	-	-	-
6	100	100	-	0	0	0
7	100	93	0	0	-	-
8	100	60	-	-	-	-
9	100	0	-	-	-	-
10	100	0	-	-	-	-
11	100	0	-	-	-	-
12	100	98	187	0	0	0
13	100	15	15	0	-	-
14	100	53	0	0	0	0
15	100	280	0	0	0	0
16	100	111	0	-	-	-
17	100	64	0	-	-	-
18	100	67	20	50	175	490
19	100	21	0	-	-	-
20	100	133	-	-	-	-
21	100	0	-	-	-	-
22	100	83	108	50	-	-
23	100	0	0	0	0	0

En la Figura 46 se puede observar la respuesta del tumor a la terapia de BNCT luego de la administración de 300 mg de BPA/kg p.c. en función del tiempo post-tratamiento. En dicho gráfico los valores de volumen tumoral se normalizaron al 100% en el momento de la irradiación.

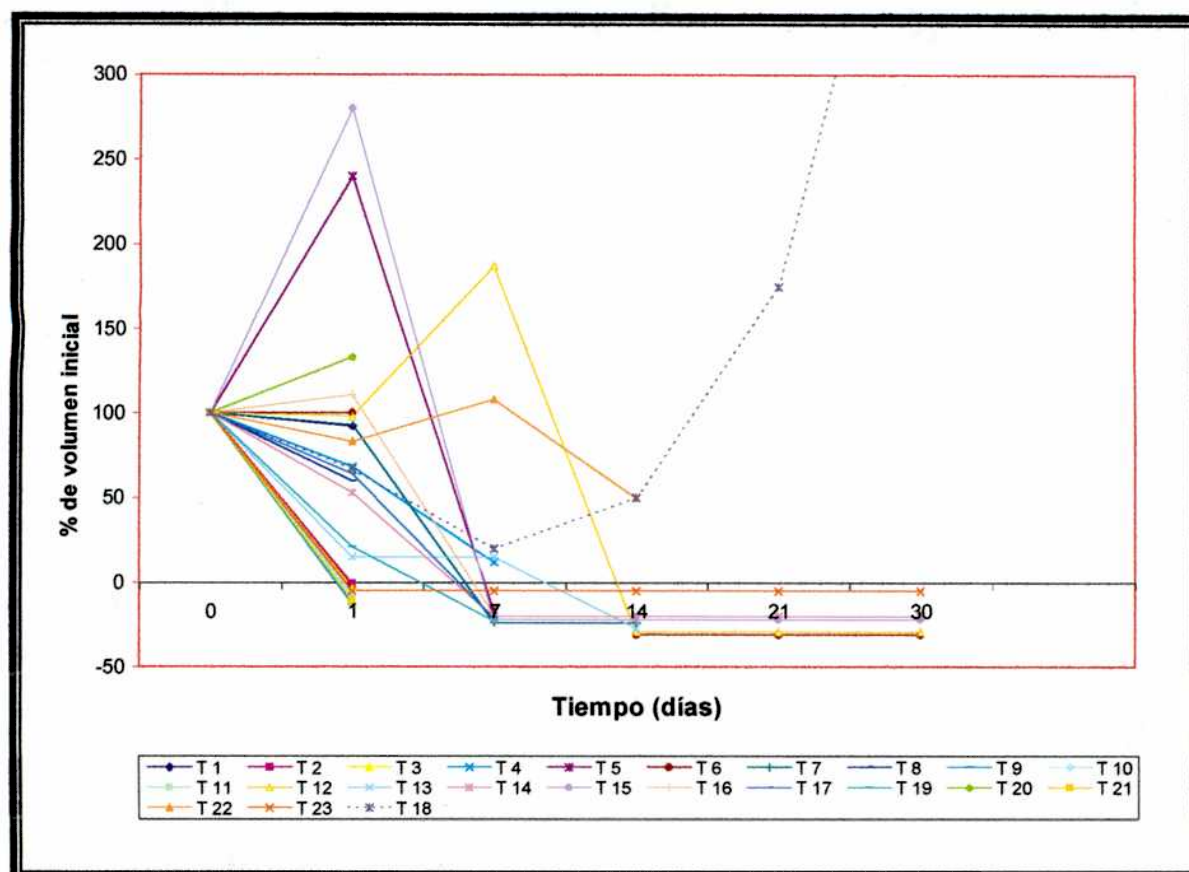


Fig. 46: Respuesta tumoral al BNCT (300mg de BPA/kg de p. c.). Se graficó el volumen tumoral normalizado al 100% en función del tiempo post-tratamiento (días). La escala fue adecuada para optimizar la visualización de la respuesta de 21 tumores que sufrieron una remisión parcial o completa. La línea punteada muestra como el tumor número 18 (el único caso que no pudo ser controlado por el BNCT) se va de la escala. Cada línea corresponde a la evolución del tumor correspondiente según la lista debajo del gráfico. Los valores negativos han sido introducidos artificialmente para mejorar la visualización de la respuesta individual de los tumores para los cuales el valor del volumen se superpone.

Se observó una remisión completa en 18 de 23 tumores tratados (78%) y una remisión parcial en 3 de los 23 tumores (13%) dos semanas post-irradiación. Un tumor no respondió al tratamiento y continuó su crecimiento y uno de los animales con tumor fue sacrificado 24h post-irradiación por lo cual la respuesta del tumor no pudo ser completamente evaluada. En algunos casos se observó un aumento en el volumen tumoral que posteriormente disminuyó con la consiguiente remisión del tumor. Esta respuesta inicial podría ser atribuida a una respuesta inflamatoria y edematosa que luego remite.

El análisis macroscópico mostró que en 7/23 casos el tumor desapareció a las 24 h post-irradiación. Este hallazgo fué confirmado por análisis histológico como se describe más adelante. Se observó ulceración y lesiones en la capa basal del tejido precanceroso circundante al sitio del tumor pero no se evidenciaron restos tumorales. El resto de los tumores (11/23) en los cuales se observó una remisión completa desaparecieron alrededor de las dos semanas post-irradiación (Fig. 46). Estos resultados también fueron confirmados por análisis histológicos que demostraron la presencia de úlceras en proceso de cicatrización sin evidencia de tumor como se describe más adelante. A modo de ejemplo se muestra la secuencia del aspecto del tumor antes del BNCT (Fig. 47), 1 semana post-BNCT (Fig. 48), y 2 semanas post-BNCT (Fig. 49) de uno de los hámsters inyectados con 300 mg de BPA/kg p.c. al cual se le efectuó el BNCT. A las dos semanas post-BNCT el tumor ha desaparecido y en su lugar se observa una cicatriz.



Fig. 47: Aspecto del tumor antes del BNCT: Hámster con la bolsa de la mejilla evertida con un tumor exofítico que ha sido expuesto para permitir la medida del mismo y su observación. El tumor es vital, de color rojo. La imagen corresponde al Hámster número 7 de la Tabla 12, tumor número 12.



Fig. 48: Aspecto del tumor 1 semana post-BNCT: Se observan zonas de necrosis en la superficie tumoral (zonas blancas). El tumor y tejido precanceroso circundante están sumamente inflamados.



Fig. 49: Aspecto de la bolsa de la mejilla que portaba el tumor, 2 semanas post-BNCT. El tumor ha desaparecido. En su lugar se observa una cicatriz. El tejido precanceroso se encuentra menos inflamado.

Los animales tratados con BNCT inyectados con mayores dosis de BPA (600 mg/kg) evidenciaron control tumoral en el 75% de los casos (Tabla 14-15, Fig. 50). Un tumor desapareció 2 días y otro 2 semanas post-irradiación. Un tumor sufrió una remisión parcial (76% reducción en el volumen) a los 2 días y fue sacrificado. El último de los tumores continuó creciendo. Los hámsters portadores de los tumores 2 y 4 fueron sacrificados 14 días después del tratamiento, los hámsters portadores de los tumores 1 y 3 fueron sacrificados 30 días post-tratamiento.

TABLA 14. HÁMSTERS CON TUMOR INYECTADOS CON 600 mg de BPA/kg p.c. TRATADOS CON BNCT (volumen en mm³)

	Pre-Trat.	2 días	7 días	14 días	21 días	30 días
1	6	1.6	1	0	0	0
2	6,3	1.5				
3	2	0	0	0	0	0
4	13.5	6.25	15	140	-	-

TABLA 15. HÁMSTERS CON TUMOR INYECTADOS CON 600 mg de BPA/kg p.c. TRATADOS CON BNCT (porcentaje del volumen inicial)

Tumor	Pre-Trat.	2 días	7 días	14 días	21 días	30 días
1	100	26	17	0	0	0
2	100	24				
3	100	0	0	0	0	0
4	100	46	111	1037	-	-

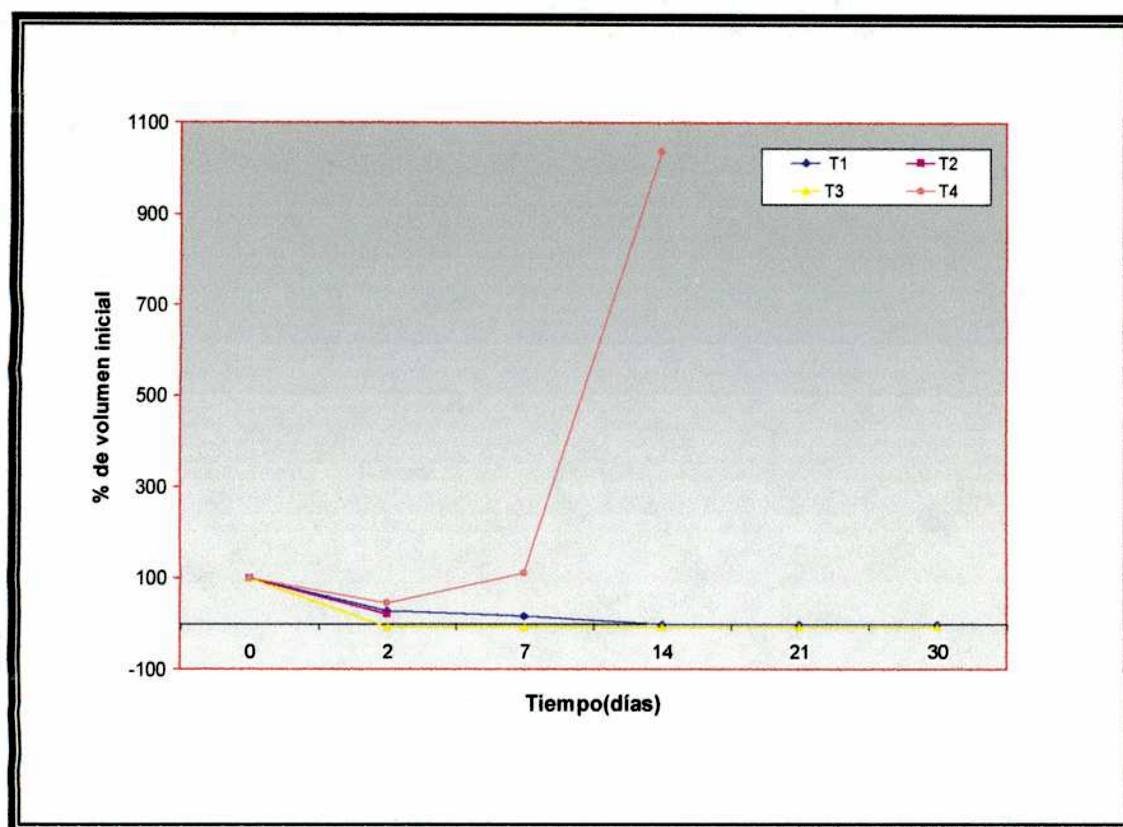


Fig. 50: Respuesta tumoral al BNCT (600 mg de BPA/kg p.c.). Se graficó el volumen tumoral normalizado al 100% en el momento de la irradiación, en función del tiempo post-tratamiento (días) para cada uno de los tumores tratados. Cada línea corresponde a la evolución del tumor correspondiente. Se observa una disminución inicial del volumen de todos los tumores a los dos días post-BNCT. A partir de los 14 días post-BNCT 2 tumores (T1, T3) fueron no detectables y uno de ellos (T4) progresó.

Todos los tumores (3/3) sin inyectar con BPA tratados con el haz de neutrones, continuaron creciendo (Tabla 16). Dichos tumores alcanzaron un volumen final, a 30 días post-tratamiento, que se situó en un rango de 110-2000% del volumen inicial al momento de la irradiación (Tabla 17). Este incremento en el volumen cae dentro del rango normal de crecimiento espontáneo de los tumores de animales sin tratar, estudiados en nuestro laboratorio. El análisis histológico a los 30 días post-tratamiento confirmó los hallazgos macroscópicos como se describe más adelante.

TABLA 16. HÁMSTERS CON TUMOR SIN INYECTAR TRATADOS CON NEUTRONES (volumen en mm³)

Tumor	Pre-Trat.	2 días	7 días	14 días	21 días	30 días
1	21	4	12	26,3	14	20
2	135	135	252	255	120	175
3	25	25	90	380	264	500

TABLA 17. HÁMSTERS CON TUMOR SIN INYECTAR TRATADOS CON NEUTRONES (porcentaje de volumen inicial)

Tumor	Pre-Trat.	2 días	7 días	14 días	21 días	30 días
1	100	19	57	125	67	95
2	100	100	187	189	89	130
3	100	100	360	1520	1056	2000

Las 13 bolsas normales tratadas con BNCT (300 mg de BPA/kg p.c.) fueron indistinguibles de las bolsas no tratadas según un criterio macroscópico, excepto por una congestión moderada encontrada una semana post-tratamiento (Fig. 50). Un grupo de 4 animales tratados con BNCT (300 mg de BPA/kg p.c.) fue estudiado 5 meses luego de la irradiación para evaluar la respuesta más tardía del tejido normal. Las 4 bolsas estudiadas fueron indistinguibles de las bolsas control no tratadas con relación a su aspecto macroscópico.

En las 3 bolsas normales tratadas con el haz de neutrones solamente tampoco se observaron alteraciones macroscópicas dentro del período experimental estudiado respecto de las bolsas normales no tratadas.

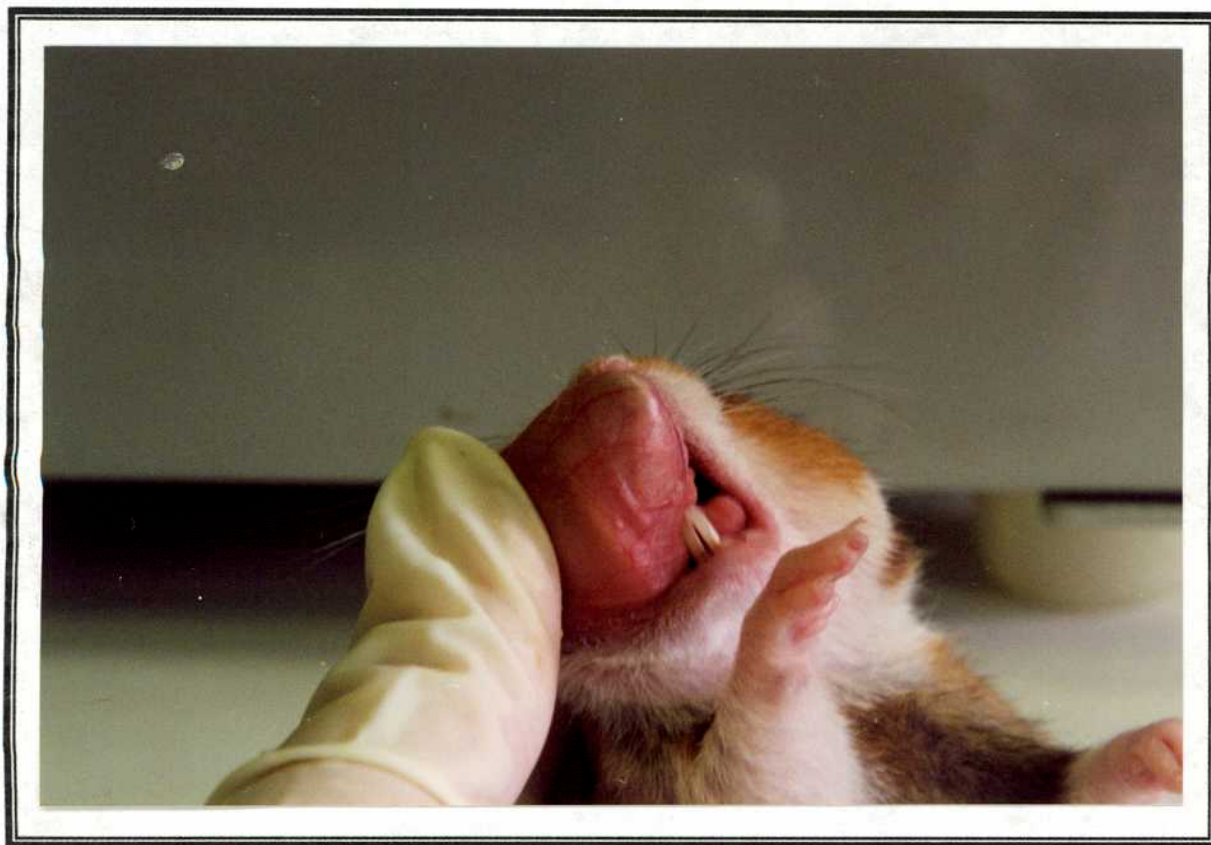


Fig. 50: Bolsa normal de la mejilla evertida 2 semanas post-BNCT. El único cambio observable es una leve congestión que luego remitió.

El tejido precanceroso circundante al tumor presentó inicialmente una respuesta inflamatoria moderada en respuesta al BNCT que desapareció alrededor del día 14 post-tratamiento. Esta respuesta no se observó cuando se irradió con neutrones solamente.

b) Análisis Histológico

El análisis microscópico de las bolsas con tumores evidencian una serie de cambios histológicos secuenciales muy característicos. Sin embargo el tiempo post-irradiación al cual aparecen no es el mismo en todos los casos. Esta secuencia sola pudo ser inferida luego del análisis de los cortes histológicos realizados en animales que fueron sacrificados a diferentes tiempos post-BNCT. Es imposible estudiar la evolución a nivel histológico en el mismo animal ya que implica el sacrificio del mismo. Cabe mencionar que se consideró que la realización de tomas biópsicas podría alterar la respuesta de los tejidos.

En este estudio tres hámsters portando un total de 8 tumores fueron sacrificados 1 día post-tratamiento, 4 hámsters con 6 tumores fueron sacrificados a los 7 días post-tratamiento, 3 hámsters con 3 tumores fueron sacrificados 2 semanas post-tratamiento y 5 hámsters con 6 tumores fueron sacrificados 30 días post-tratamiento.

Hámsters con tumor tratados con BNCT (300 mg/kg de BPA): a las 24 h post-BNCT se observaron las siguientes lesiones: mucositis moderada, congestión, úlceras flanqueadas por zonas de hiperplasia, ampollas subepiteliales, lesiones y necrosis en la capa basal, ampollas intraepiteliales en el sitio del tumor, pequeñas úlceras, inflamación y apoptosis. En la piel de la mejilla se observó disqueratosis, inflamación e hiperplasia. La lesión fue moderada.

Luego de 1 semana post-BNCT no se evidenciaron restos de tumor y se observaron grandes úlceras tapizadas por fibrina, fibrosis, inflamación moderada, epitelio atrófico, tejido conectivo necrótico, áreas de hiperplasia, vacuolas y ampollas en la capa basal. En resumen se observa un tejido precanceroso con úlceras y epitelio atrófico que aún no ha sido regenerado. Se observa hiperplasia en la piel.

A las 2 semanas post. BNCT no se evidenciaron restos tumorales. Se observaron úlceras, áreas atróficas y áreas de regeneración. La piel evidenció hiperplasia.

En el último tiempo estudiado (de 4 semanas) tampoco se observaron restos de tumor. Se observó la persistencia de úlceras pero no se observaron características microscópicas inusuales en el tejido que rodeaba al tumor, respecto de una bolsa no tratada. Un tumor que no respondió al BNCT invadió activamente el tejido muscular.

Sobre la base de estos resultados se podría postular una hipótesis acerca de una posible secuencia de efectos luego del BNCT (administración de BPA seguida de la irradiación con neutrones). La respuesta temprana consistiría en la vacuolización de las células epiteliales, mayormente de la capa basal (Figs. 51-52-53).

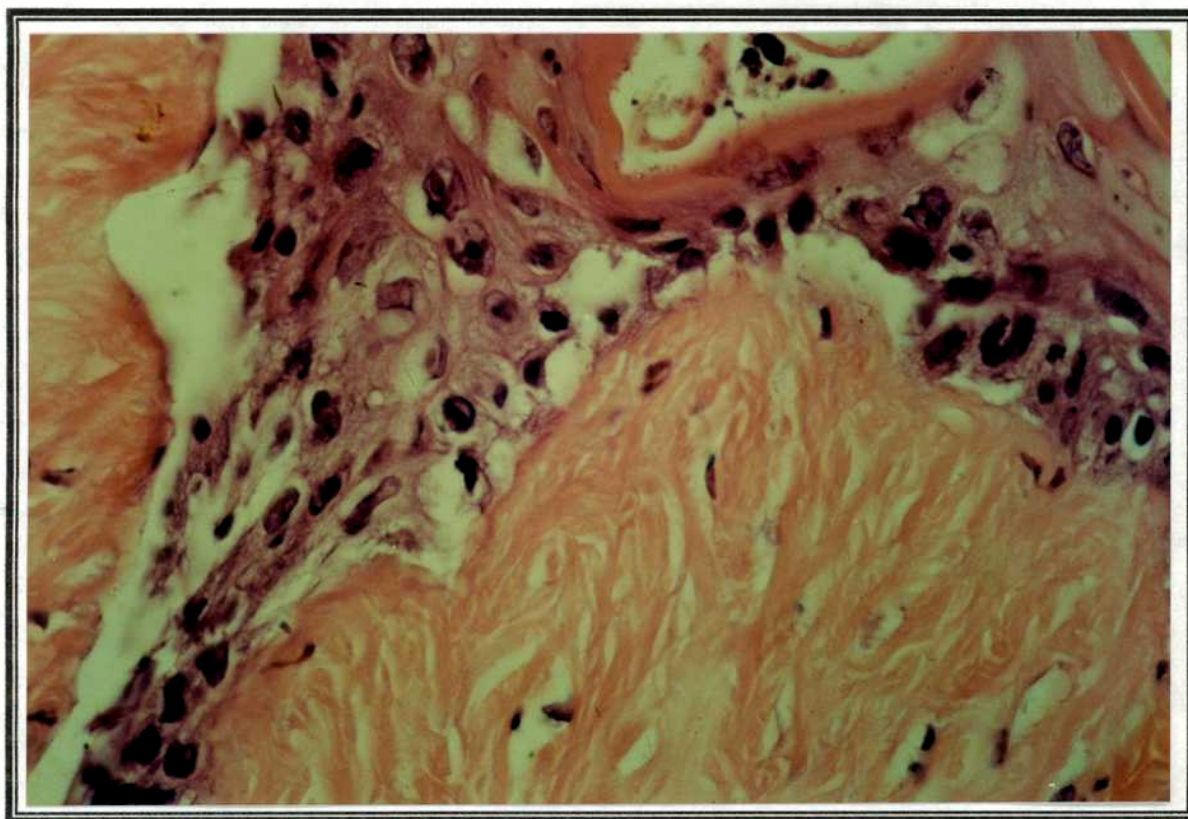


Fig 51: Hámster con tumor tratado con BNCT (BPA 300mg/kg p.c.). Se observa necrosis en la capa basal de células. H&E, 480X.

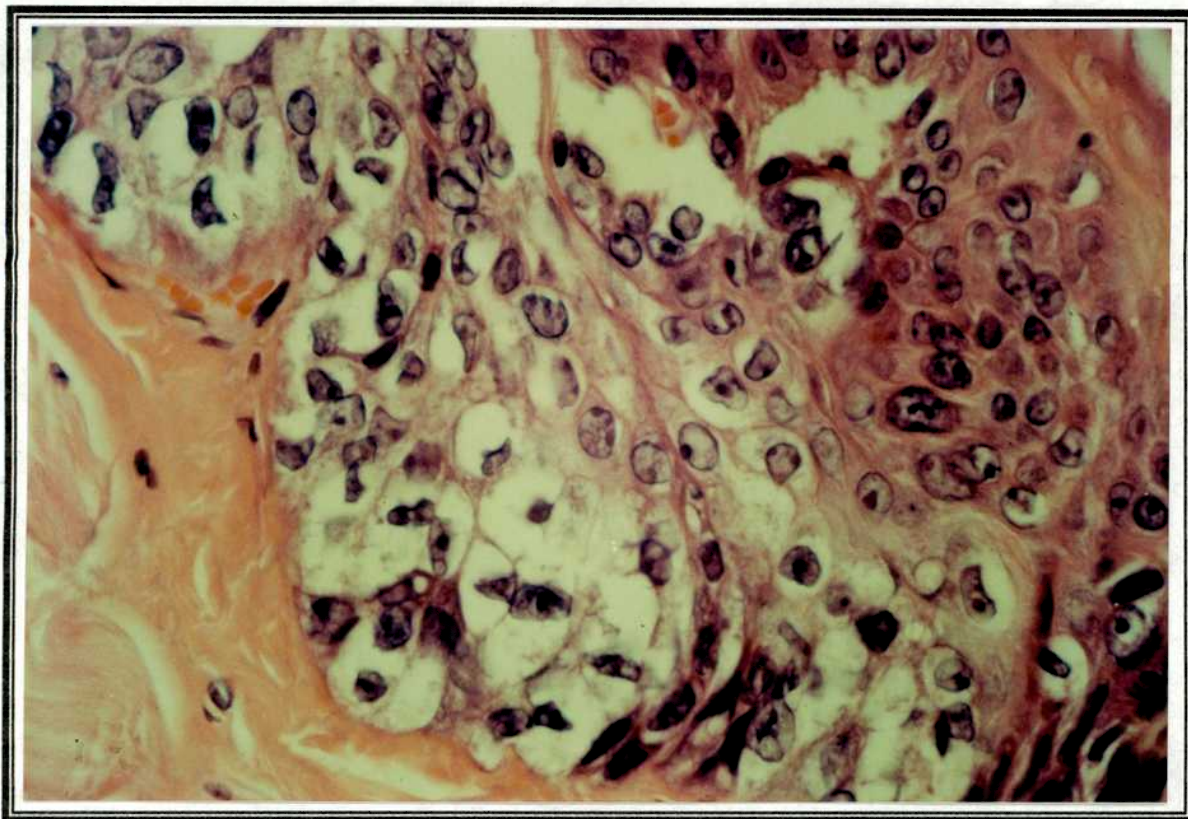


Fig 52: Hámster con tumor tratado con BNCT (BPA 300mg/kg p.c.). Se observan células basales con vacuolas. H&E, 500X.

El tejido conectivo exhibió una ligera respuesta inflamatoria y llamativamente, en muchos de los cortes estudiados, se encontró separación entre el epitelio y el tejido conectivo subyacente probablemente como consecuencia del daño a las células basales tumorales y precancerosas inducidos por el BNCT (Figs. 54-55).

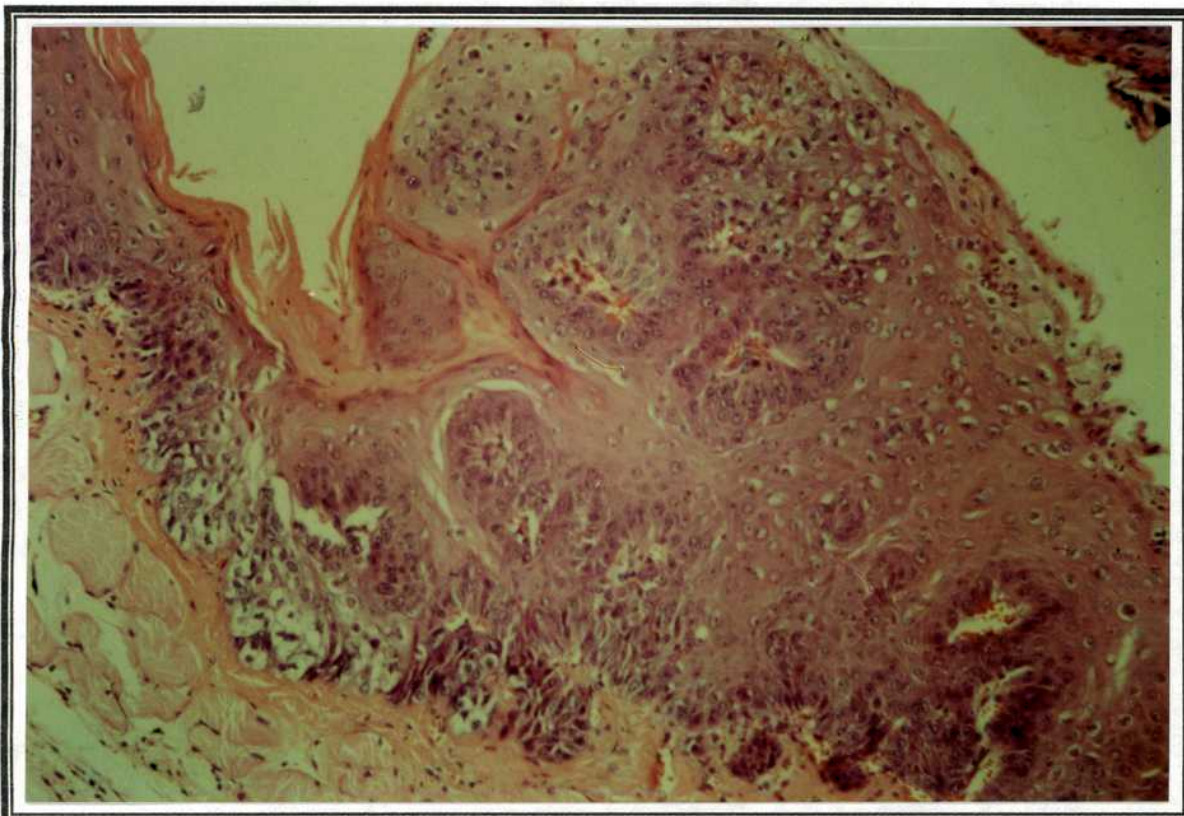


Fig. 53: Hámster con tumor tratado con BNCT (BPA 300mg/ kg p. c.). Se observan células basales con vacuolas. H&E, 135X.

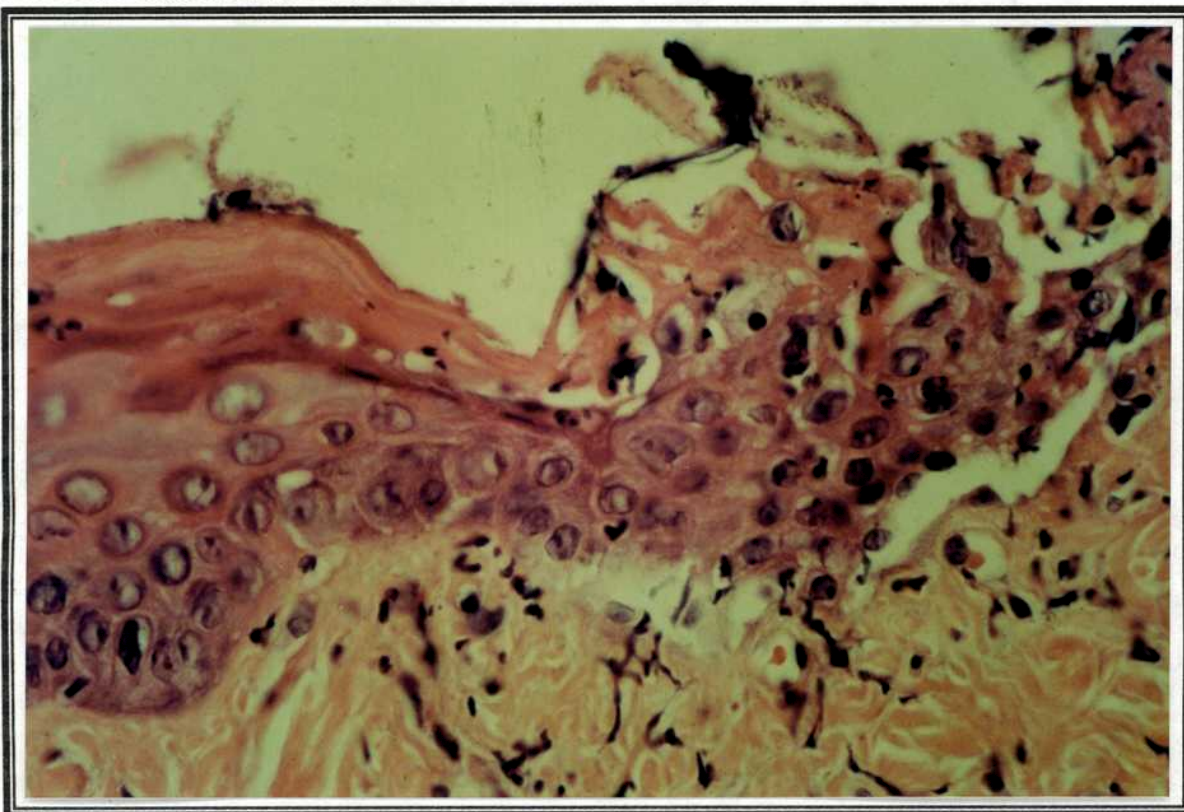


Fig. 54: Hámster con tumor tratado con BNCT (BPA 300mg/ kg p. c.). Separación entre el tejido epitelial y conectivo. H&E, 580X.

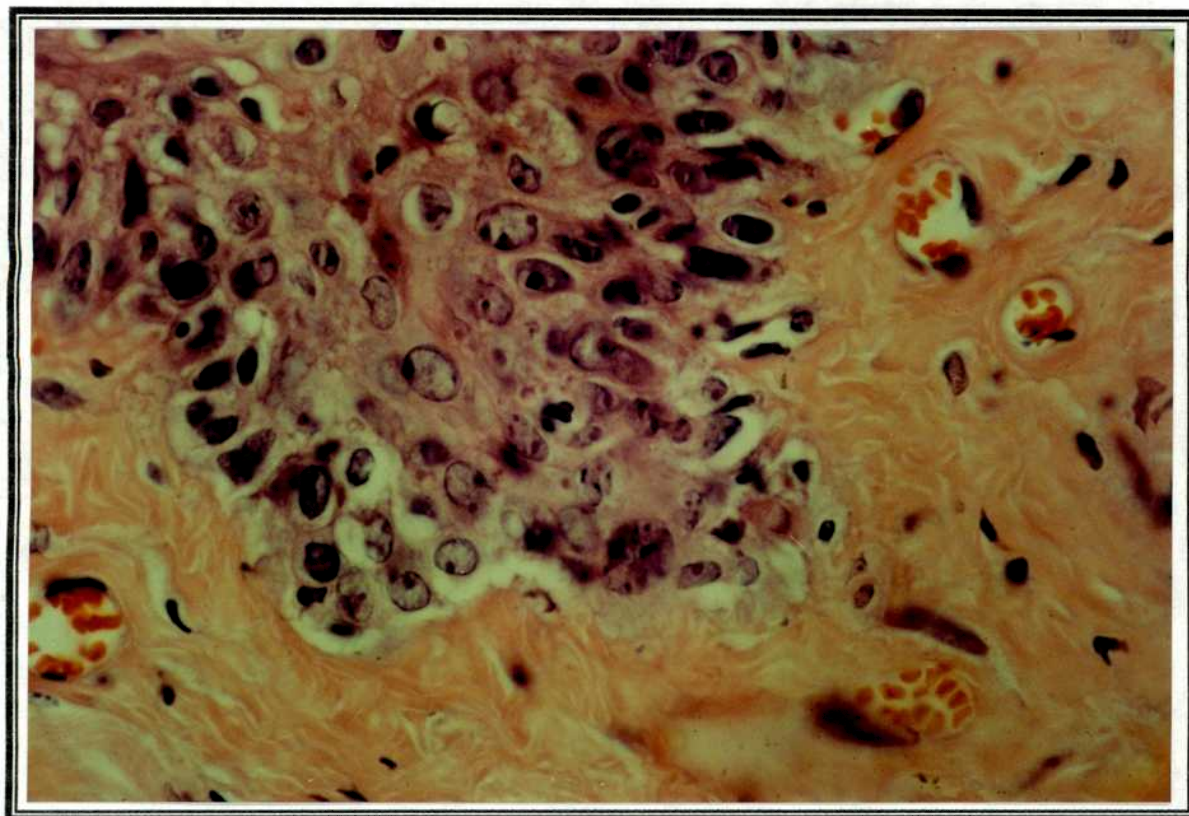


Fig. 55: Hámster con tumor tratado con BNCT (BPA 300mg/ kg p. c.). Separación entre el tejido epitelial y conectivo. Fibrosis. H&E, 580X

El daño y necrosis de las células basales y la separación entre las células epiteliales y el tejido conectivo subyacente resultaría en la pérdida de las células tumorales del estrato superior. Este mecanismo podría explicar el rápido control tumoral observado. En los sitios de remisión tumoral se observó una úlcera asociada a tejido conectivo fibrohialino (Fig 56). La presencia de células vecinas en proliferación evidenciaría un proceso de cicatrización (Fig. 57).

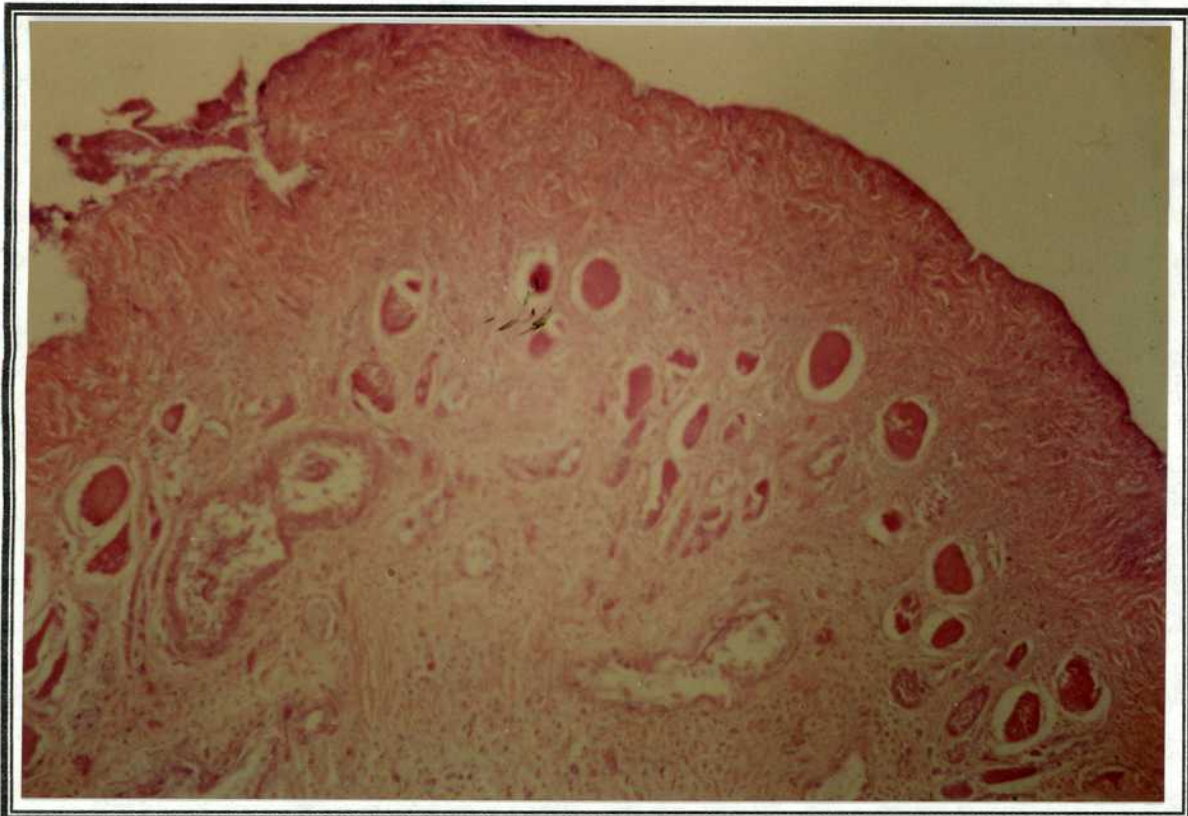


Fig. 56: Hámster con tumor tratado con BNCT (BPA 300mg/kg p.c.). En los sitios de remisión tumoral se observa una úlcera asociada a tejido conectivo fibrohialino. H&E, 30X

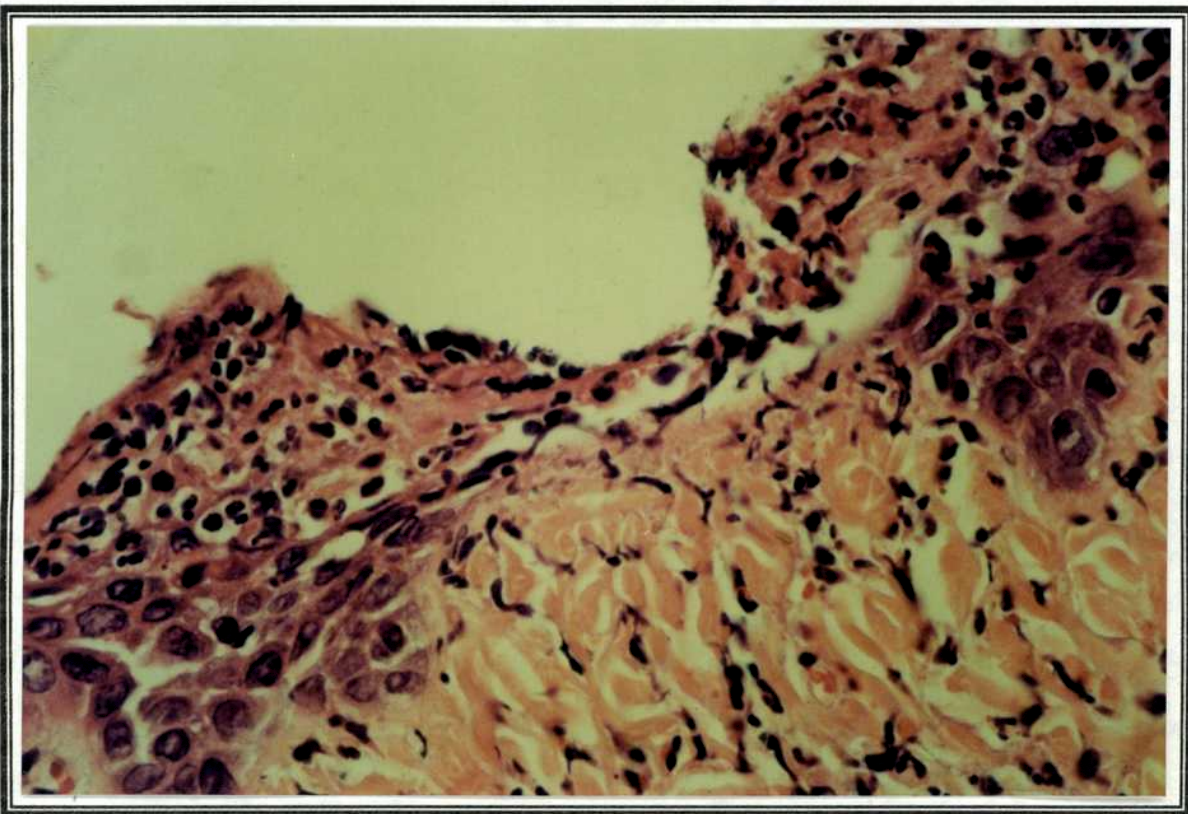


Fig. 57: Hámster con tumor tratado con BNCT (BPA 300mg/kg p.c.). En los sitios de remisión tumoral se observa una úlcera e inflamación. La presencia de células vecinas en proliferación evidenciaría un proceso de cicatrización. H&E, 190X

Hámsters normales tratados con BNCT (300 mg/kg de BPA): en todos los tiempos analizados (1, 7 y 14 días), no se observaron características microscópicas inusuales respecto de la bolsa normal no tratada (Fig. 58, comparar con Fig. 7). A los 7 días se observó una congestión moderada que a los 14 días había disminuido.

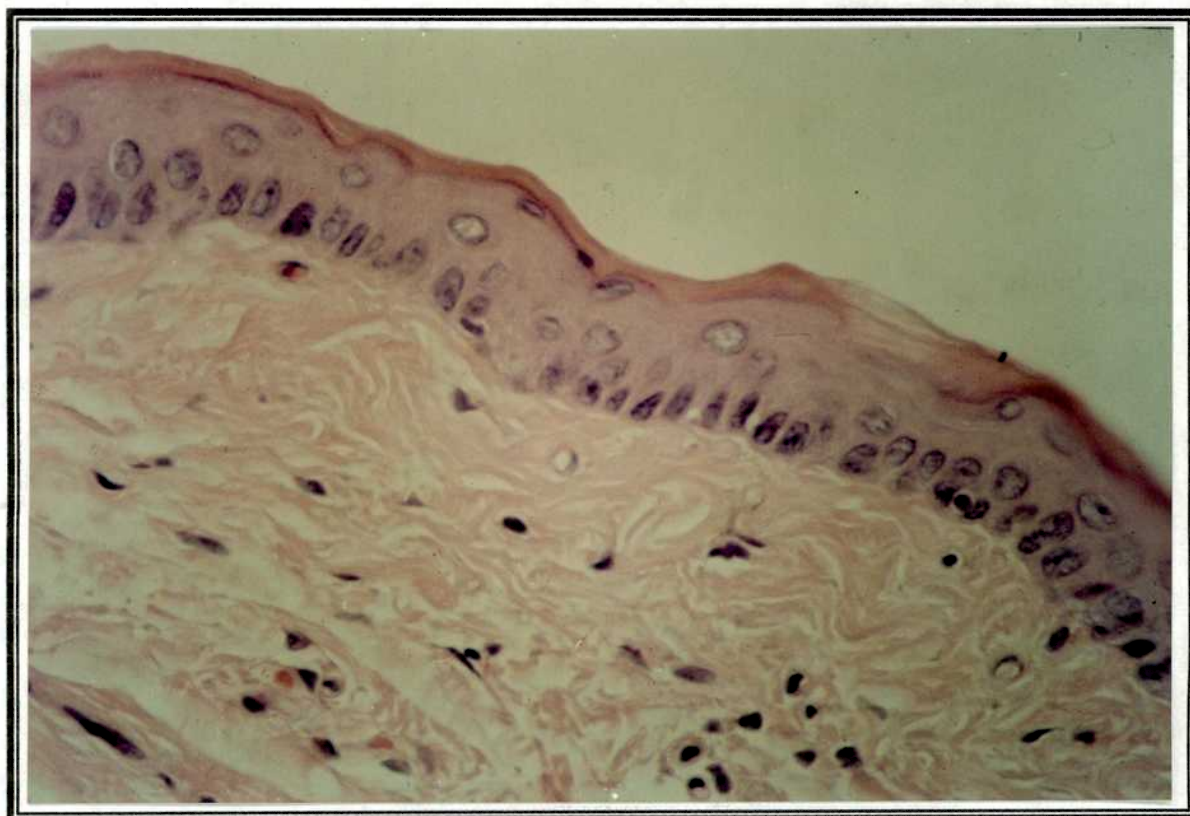


Fig 58: Hámster normal tratado con BNCT (BPA 300mg/kg p.c.). No se observan características microscópicas inusuales respecto de una bolsa normal sin tratar. H&E, 250X.

Hámsters con tumor sin inyectar tratados con neutrones: El primer tumor estudiado corresponde a un hámster que murió inmediatamente luego de la irradiación (0 h). En dicho tumor no se observan características microscópicas inusuales con respecto al tumor no tratado, salvo una congestión. El siguiente tiempo estudiado fue de 3 h. Tampoco se observaron características microscópicas inusuales, excepto por un área de congestión. A las 2 semanas post-BNCT la apariencia del tejido fue indistinguible de un tumor sin tratar (Fig. 59, comparar con Fig. 11).

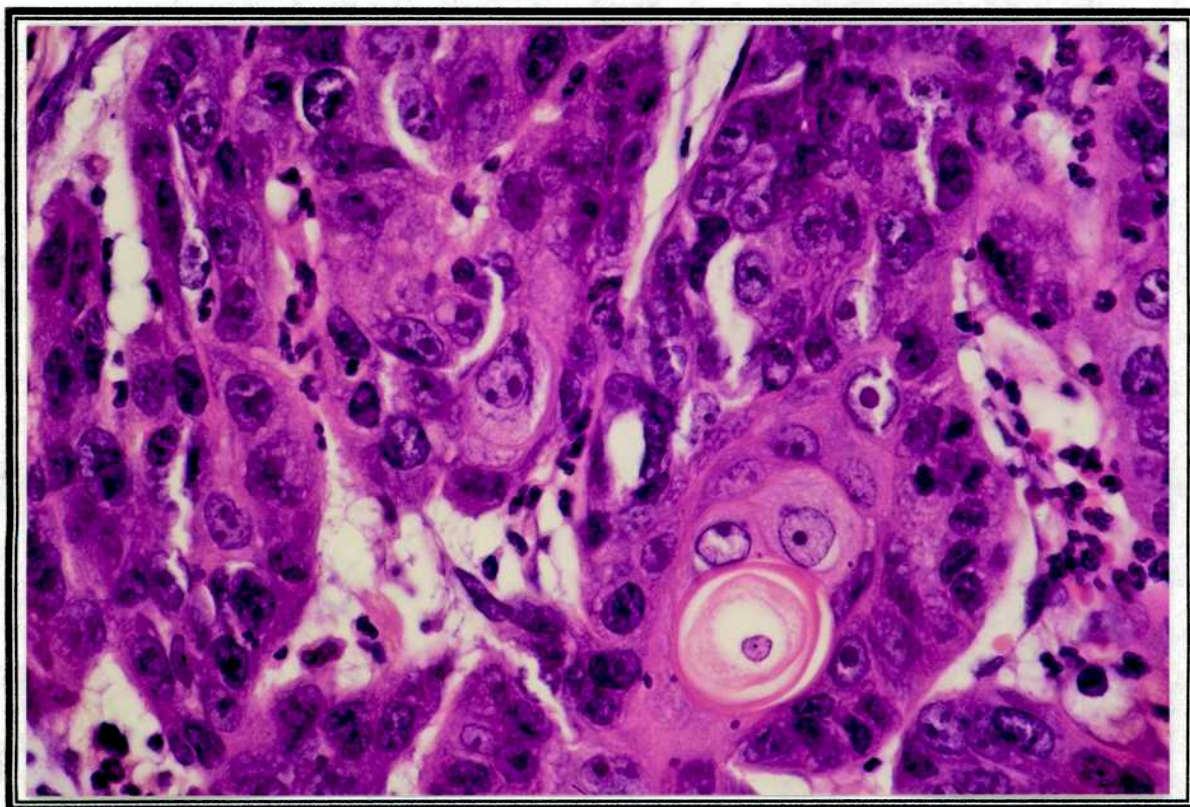


Fig. 59: Hámster con tumor irradiado sin inyectar. Se observa persistencia del tumor, sin daño a las células basales. H&E, 600X.

c) Seguimiento del peso corporal de los animales tratados con BNCT

El peso corporal mostró un leve descenso, estadísticamente no significativo, a una semana post-tratamiento en animales con tumor tratados con BNCT (300 mgde BPA/kg p.c.) (Tabla 18, Fig. 60). Los animales normales tratados con BNCT (Tabla 19, Fig. 61) y los animales normales sin inyectar irradiados con neutrones, no mostraron cambios en el peso corporal (Tabla 20, Fig. 62). Sin embargo, los animales con tumor tratados con neutrones sin la inyección del compuesto borado mostraron una reducción en el peso corporal a las 4 semanas post-irradiación, compatible con un crecimiento continuo del tejido tumoral (Tabla 21, Fig. 63).

TABLA 18. PESO CORPORAL EXPRESADO EN GRAMOS DE HÁMSTERS CON TUMOR TRATADOS CON BNCT (300 mg de BPA/kg p.c.)

Hámster (Nº)	Pre. Trat.	7 días	14 días	30 días
1	143,1	119,2		
2	117,3			
3	122,8	107,1	108,4	111,7
4	120,5	95,2	104,7	108,2
5	121,9	96,9	92,5	
6	125,8			
7	140,2		126,4	131,8
8	113,0	96,9	97,8	
9	137,1	103,5	113,9	119,6
10	97,2	87,4		
11	120,0	110,0	106,2	110,2
12	125,0	101,2		
13	112,8			
14	127,1	106,7	104,5	

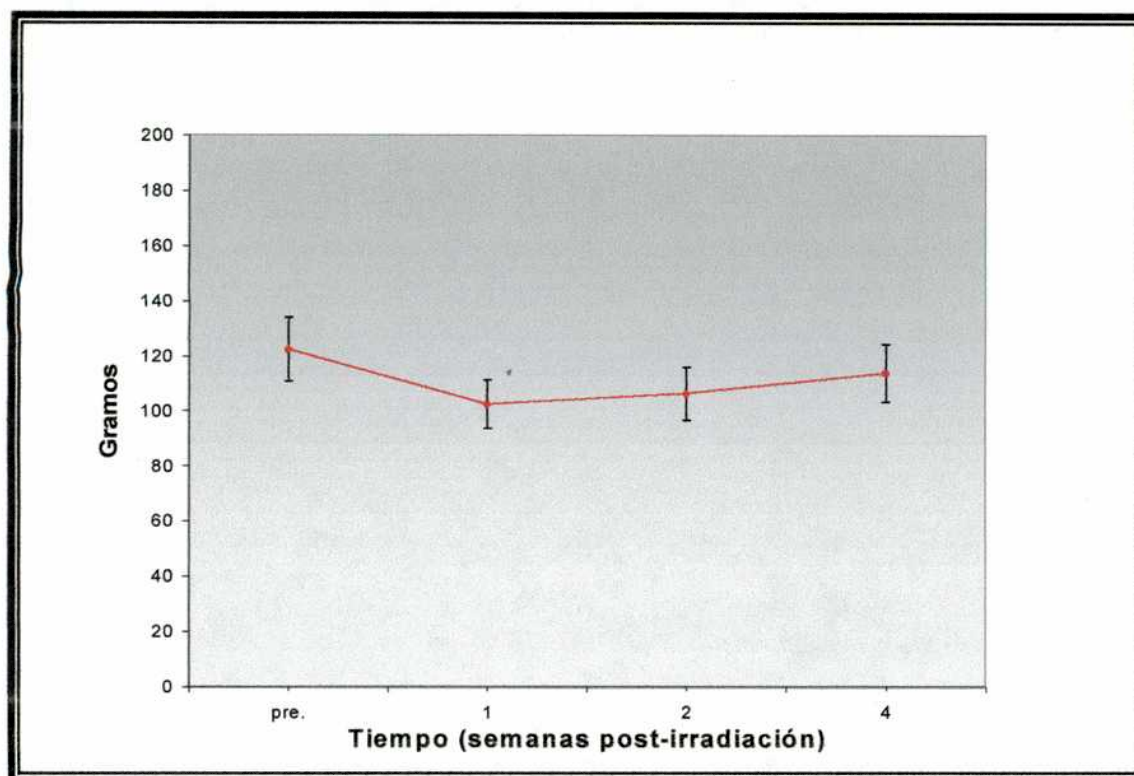


Fig. 60: Peso corporal en gramos. Hámsters con tumor/ BNCT/ 300 mg de BPA/kg p.c.. Se observa una leve disminución del peso corporal 7 días post-BNCT, que luego se recupera.

TABLA 19. PESO CORPORAL EXPRESADO EN GRAMOS DE HÁMSTERS NORMALES (SIN TUMOR) TRATADOS CON BNCT (300 mg de BPA/kg p.c.)

Hámster (N°)	Pre. Trat.	7 días	14 días	21 días	4 meses
25	115,6	115,6	113,2		
26	104,6	106,1	105,1	111,2	
27	106,9	109,3			
28	110,8	112,5			
29		113,0	110,7	111,3	
30	112,4	113,2			
31	117,7				
32	159,1	137,2	141,4	138,3	139,1
33	113,0	111,8	110,4		
34	93,1				
35	91,6	95,0	95,2		
36	127,1	124,0	123,8	124,5	147,7
37	117,2	118,9	117,0	121,9	133,0

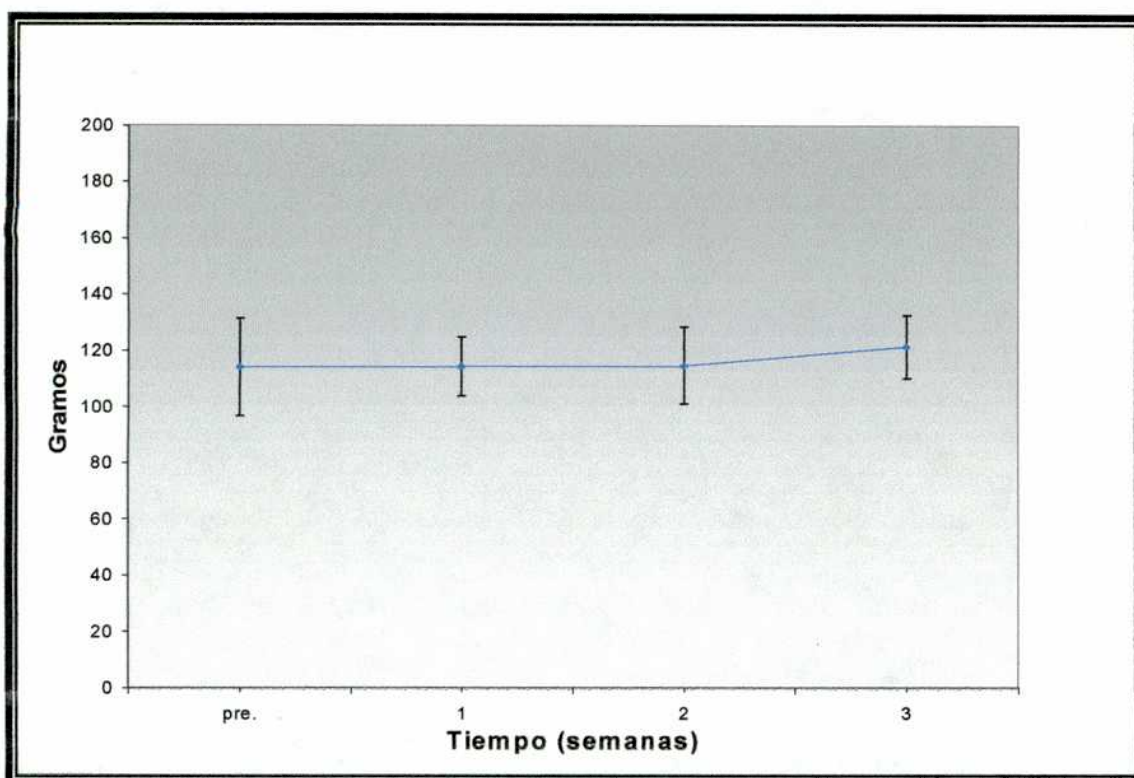


Fig. 61: Peso corporal en gramos. Hámsters Normales/ BNCT/ 300 mg de BPA/kg p.c.. El peso corporal evoluciona normalmente.

TABLA 20. PESO CORPORAL EXPRESADO EN GRAMOS DE HÁMSTERS NORMALES SIN INYECTAR IRRADIADOS CON NEUTRONES

Hámster (Nº)	Pre.Trat.	7 días	14 días	30 días
38	83,6	91,4	96,5	
39	111,7	114,6	121,0	112,5
40		127,5	127,0	120,5

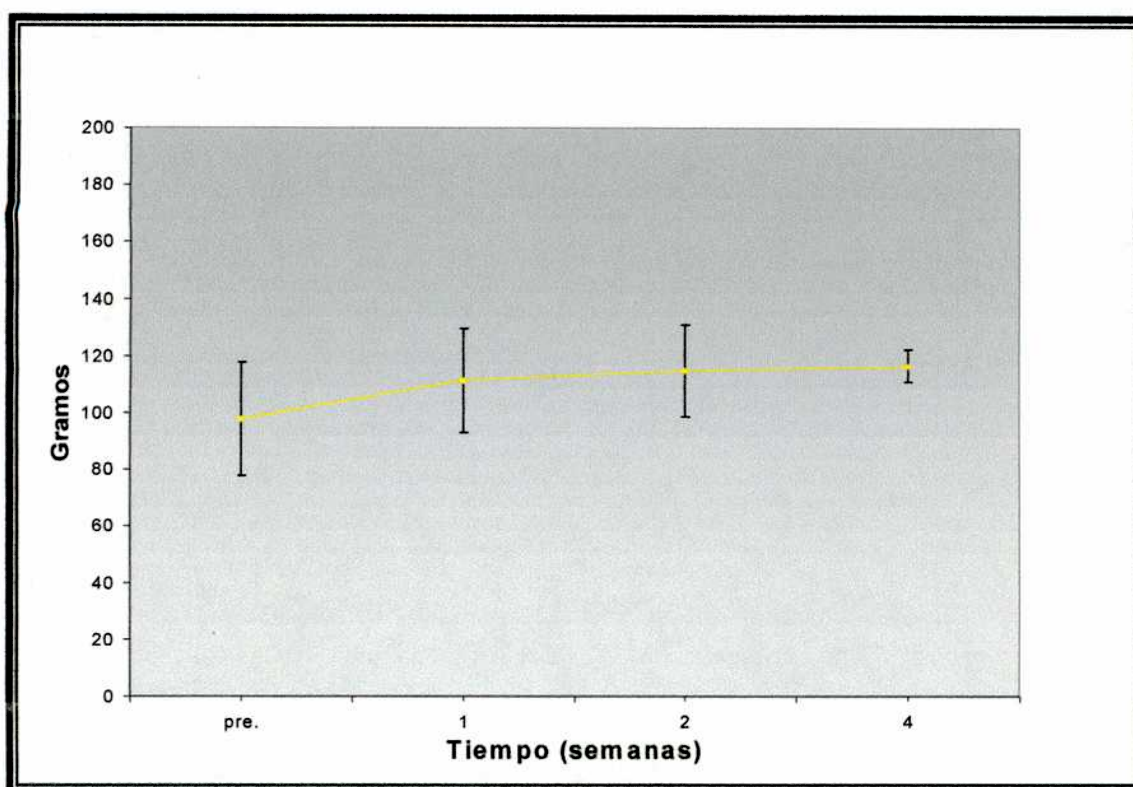


Fig. 62: Peso corporal en gramos. Hámsters Normales sin inyectar irradiados con Neutrones. El peso corporal evoluciona normalmente.

TABLA 21. PESO CORPORAL EXPRESADO EN GRAMOS DE HÁMSTERS CON TUMOR SIN INYECTAR-TRATADOS CON NEUTRONES

Hámster (Nº)	Pre. Trat.	7 días	14 días	30 días
16	116,3			
17	130,5	119,5	115,0	87,3
18	132,6	121,5	119,9	107,1
19	115,4	100,9	113,5	

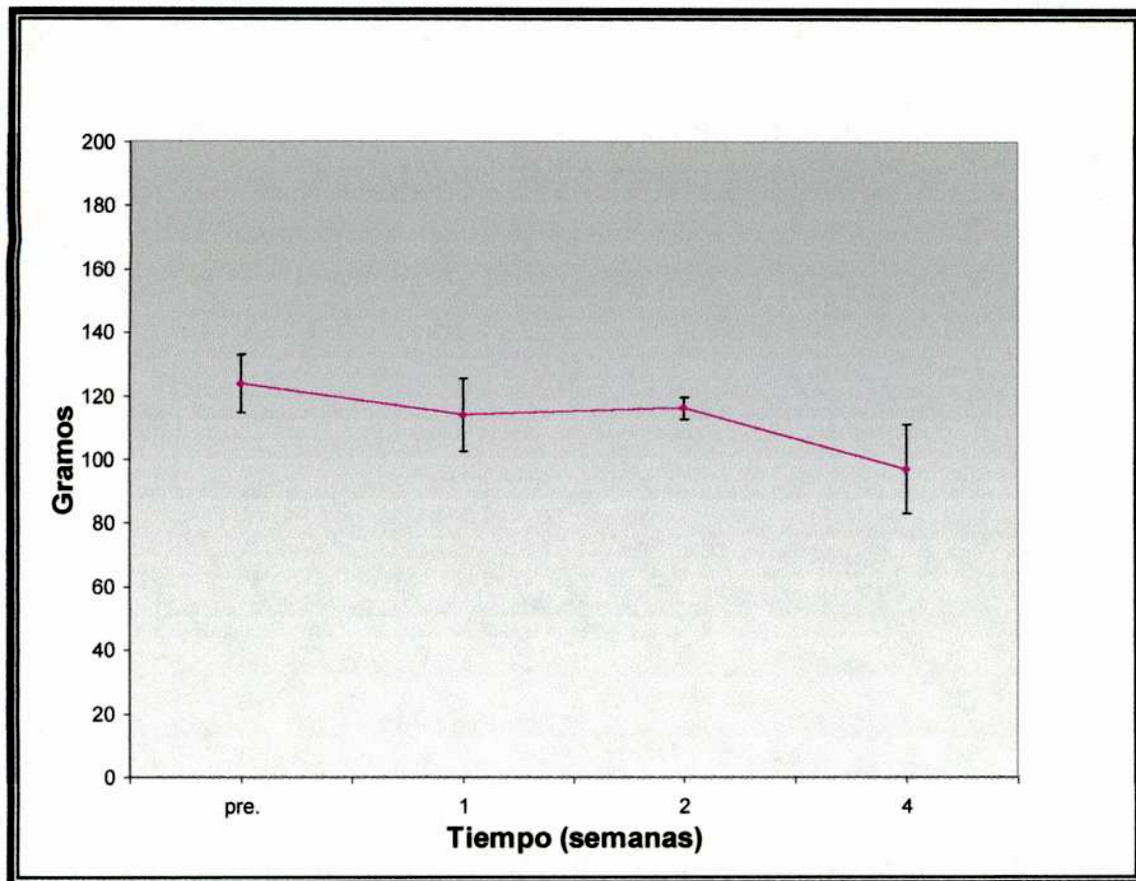


Fig. 63: Peso corporal en gramos. Hámsters con tumor/ sin inyectar/ irradiados con neutrones. El peso corporal disminuye a medida que los tumores progresan.

7- DISCUSIÓN

El presente trabajo propone, valida y evalúa por primera vez el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster para estudios de BNCT. La elección del modelo se basa en su potencial de contribuir a la búsqueda de nuevas aplicaciones de BNCT en un área de la salud que, como el cáncer de cabeza y cuello, podría beneficiarse de terapias alternativas. Asimismo, las características biológicas de este modelo de cáncer oral hacen que sea de gran valor para el estudio de la biología y radiobiología del BNCT en general, aportando datos de potencial transferencia a la clínica en el caso de otras patologías.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible entregar el boro en forma selectiva y en cantidades potencialmente terapéuticas al tumor de la mejilla del hámster mediante la administración intraperitoneal de BPA-F. Se pueden alcanzar relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre que serían compatibles con un tratamiento exitoso. Los datos de biodistribución en el presente estudio indican que el boro puede ser concentrado en las células tumorales en cantidades terapéuticas en forma absoluta y relativa dentro del período comprendido entre 1,5 - 3,5 h luego de la administración de BPA. Se podrían ensayar estrategias alternativas de administración del BPA que podrían brindar una ventaja terapéutica aún mayor. Esta alternativa será explorada en futuros estudios. La inyección en bolo intravenosa de BPA no aumenta significativamente la oferta de la sangre a los tejidos ni induce variaciones en la eliminación de boro, comparado con la administración i. p. en este modelo. Se sabe que la administración de dos dosis intragástricas secuenciales de BPA en un modelo de gliosarcoma intracerebral de rata tienen un efecto aditivo con respecto a la incorporación de boro en el tumor, si bien esto no aumenta la relación de concentración tumor/tejido normal y tumor/sangre en el mismo modelo (Coderre J. A. y col. , 1991; Coderre J. A. y col. , 1992). Se ha descripto en la literatura que en otros modelos experimentales las infusiones intravenosas largas de BPA resultan más efectivas en proporcionar mayor cantidad de boro al tumor en forma selectiva (Joel D. y col. , 1999). En nuestro modelo este modo de administración podría tener ventajas con respecto a la inyección intravenosa en bolo.

En general la incorporación de boro mediada por el BPA y las relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre en nuestro modelo se encuentran dentro del rango encontrado en animales de experimentación y en humanos. Estudios previos han demostrado que la concentración de boro en cerebro normal es similar a la concentración en sangre y que en promedio la concentración de boro en glioma y melanoma es entre dos y cuatro veces mayor que en la sangre y cerebro (Coderre J. A. y col. , 1999a; Coderre J. A. y col. , 1998). Los valores de boro encontrados en los tumores, tejido normal y sangre de hámster son coincidentes con estos rangos. Las relaciones tejido/sangre encontrados en la piel de la mejilla de hámster y en los tejidos orales se asemejan estrechamente a las relaciones encontradas en pacientes para cuero cabelludo/sangre (Elowitz E. H. y col. , 1998) y piel/sangre (Fukuda H. y col. , 1994) respectivamente. La concentración de boro en la sangre y en los tejidos normales del hámster cae dentro del rango de valores encontrado en perros inyectados con BPA (Huiskamp R. y col. , 1996).

El modelo del hámster permitió estudiar la piel y los tejidos orales además del tejido de la bolsa de la mejilla. Los tejidos orales y la piel concentran boro en forma similar a la bolsa facial. Esto confiere una ventaja adicional al estudio de dicho tejido como modelo de los tejidos orales en términos de la captación de boro. En algunos casos la concentración de boro en alguno de los tejidos orales - como la mucosa de carrillo - alcanzó valores superiores a los encontrados en la sangre. Por lo tanto, es muy importante evaluar o al menos estimar el valor de boro en la mucosa oral durante los tratamientos clínicos en vez de extrapolar el mismo a partir del valor de la sangre como ocurrió en algunos casos ya que los cálculos dosimétricos dependen fuertemente de la concentración de boro. En particular, las estimaciones de dosis que se hacen para los tejidos normales que limitan la dosis que se puede administrar al tumor son críticas.

Los protocolos clínicos de BNCT en Europa se encuentran en fase de escalamiento de dosis y hasta el presente no se han producido daños agudos por radiación en los tejidos orales. En tratamientos futuros en los cuales se ampliaría el campo de irradiación ó se utilizarían campos múltiples, dichos tejidos podrían ser potencialmente limitantes de la dosis (Coderre J. A. y col. , 1999b). Más aún, en la eventualidad de un tratamiento de cáncer de cabeza y cuello por BNCT los tejidos orales normales tendrían gran relevancia clínica como limitantes de la dosis.

El estudio del comportamiento de dichos tejidos en un modelo experimental adecuado como el de la bolsa de la mejilla del hámster contribuiría notablemente a elucidar efectos secundarios y a prevenir dichos efectos en el futuro.

El fundamento bioquímico de la incorporación preferencial de BPA a la célula tumoral estaría relacionado con una elevada tasa de transporte de aminoácidos en la membrana de la célula tumoral (Coderre J. A. y col. , 1999a). Dentro de este contexto, el estado metabólico de la célula puede condicionar la captación del mismo y generar una gran dispersión en los valores. Se encontró una incorporación muy heterogénea del BPA en los tumores de la bolsa de la mejilla del hámster lo cual debería ser tenido en cuenta en el momento de llevar acabo la terapia del BNCT utilizando BPA. En concordancia con otros estudios (Coderre J. A. y col. , 1998) hemos observado una alta incorporación de boro en las regiones con mayor proporción de tejido viable de la masa tumoral y una baja incorporación en las zonas de tejido con mayor proporción de necrosis. Los datos de Patel y Sedgwick (2000) demuestran que el BPA se acumula preferencialmente en las células tumorales viables, contrariamente a lo que ocurre con el BSH que se acumula mayormente en las áreas necróticas del tumor. El mecanismo de incorporación del BSH no ha sido esclarecido aún, pero se piensa que entraría al tumor por difusión desde los vasos sanguíneos (Patel H. y Sedgwick E. M. 2000).

A partir de los datos de incorporación de BPA en tumores de hámster compuestos por un 100% de tejido viable podemos asumir que dichos valores constituyen los máximos valores que se pueden alcanzar en dicho modelo con el modo de administración empleado. En este sentido, las relaciones de tumor/tejido normal y tumor/sangre para las células viables deberían ser mayores que el rango de las medias. Por lo tanto, se podría especular que la ventaja terapéutica del BNCT podría incrementarse con un aumento de la viabilidad del tumor.

La viabilidad, como ya se mencionó antes, constituye un tema central tal como fue propuesto en un estudio realizado con muestras de pacientes portadores de glioblastoma multiforme (Coderre J. A. y col. , 1998). Esta variable resultó muy importante en el presente estudio. Sería muy valioso evaluar la influencia sobre la incorporación de boro por las células viables de otras variables que aún no han sido examinadas tales como el grado de diferenciación y la vascularización del tumor.

De esta manera, la captación heterogénea de boro por el tejido tumoral (Ono K. y col. , 1996; Haritz D. y col. ,1994) impide una exacta planificación del tratamiento. La correlación entre la dosis prescrita y la dosis real depende enormemente de la coincidencia entre la concentración de boro estimada y la real obtenida durante la irradiación. La gran dispersión en las concentraciones de boro trae aparejado un problema adicional en el momento de analizar la respuesta biológica (Raaijmakers P. J. y col. , 1995). Una vez más, podemos decir que la posibilidad de abordar este problema desde un punto de vista experimental en un modelo como el del hámster permitiría contribuir a un aumento de la ventaja terapéutica del BNCT. Estamos realizando estudios que permitan dilucidar con más detalle la correlación entre la captación de boro y la histología del tumor.

La captación de boro en el tejido precanceroso circundante al tumor evidenciaría una tendencia del tejido premaligno a incorporar mayor cantidad de boro que el tejido normal. Esta tendencia se observó de igual manera para los dos compuestos utilizados - BPA-F y CuTCPH - en los estudios de biodistribución.

Es posible que el tejido precanceroso tenga alteraciones en moléculas responsables del transporte de aminoácidos a través de la membrana, lo cual podría explicar el mayor grado de incorporación de BPA en dichas células. Se han descrito numerosas alteraciones del tejido precanceroso sometido a la acción del DMBA tales como: alteraciones en el nivel de proliferación celular, factores de crecimiento y cambios en la expresión de enzimas (Smith C. J. y col. , 1972; Solt D. B. y col. , 1987; Schwint A. E. y col. , 1993; Shin D. M. y col. , 1990; Wang D. T. W. y col. , 1988). Para entender el comportamiento del tejido precanceroso ha sido de mucha utilidad el análisis de diferentes marcadores de transformación maligna y/o proliferación como las regiones organizadoras del nucleolo (AgNORs), Ki67 y PCNA (Hall P. A. y col. , 1988; Pich A. y col. , 1992; Treré D. y col. , 1991). Numerosos estudios han probado que un aumento en la actividad celular en respuesta a estímulos normales y patológicos se correlaciona con cambios en los AgNOR. Dicho parámetro podría reflejar el estado de activación y/o transformación de ciertos tejidos (Crocker J. y Nar P., 1987; Croker J. y Skilbeck N., 1987) como lesiones de la mucosa oral (Cabrini R.L. y col. , 1992), la médula ósea de pacientes leucémicos (Arden y col. , 1989) y el melanoma uveal (McLean y col. , 1997). Todos estos marcadores solo constituyen ejemplos de alteraciones asociadas al tejido preneoplásico que en muchos casos aparecen muy temprano en la inducción tumoral (Schwint A. E. y col. , 1993) y en zonas del epitelio que no exhiben signos morfológicos de atipia (Schwint A. E. y col. , 1994).

El epitelio adyacente al carcinoma epidermoide de mucosa oral en humanos sufre alteraciones morfológicas e histoquímicas que podrían representar etapas tempranas del proceso de carcinogénesis. Estas anomalías pueden ser el resultado de la producción de factores de crecimiento por el tumor durante su expansión lateral (Coffey R. J. y col. , 1986), ó la expresión del proceso de "cancerización de campo" (Chang W. W. L., 1978; Colacchio T. A. y col. , 1984; Slaughter D. P. y col. , 1953; Silverman S. y col. , 1972; Cahan W. G. 1977; Wynder E. L. y col. , 1977; Choy A. T. K. y col. , 1992) según el cual los tumores se originarían a partir de zonas multifocales precancerosas. La aplicación de la terapia del BNCT en el tejido precanceroso podría eventualmente reducir el riesgo de desarrollo de nuevos tumores y/ó recidiva en el área tratada. Sin embargo, sería necesario explorar el límite de dosis en el tejido precanceroso, pues dicho tejido capta mayor cantidad de boro que el tejido normal y existiría el riesgo de generar efectos agudos luego de la irradiación. El modelo del hámster posee la ventaja de permitir el estudio del tejido precanceroso circundante al tumor. Esto no es así en el caso de los modelos experimentales tradicionales para estudios de BNCT que se basan en la implantación de células tumorales en un lecho de tejido sano.

El BNCT genera una rápida y dramática remisión tumoral con virtualmente ningún daño al tejido normal en el modelo de cáncer oral en hámster. El presente trabajo constituye la primera demostración in vivo del éxito del BNCT en un modelo tumoral que imita el proceso de transformación maligna espontánea. Estos datos son la primera evidencia de la utilidad del BNCT para el tratamiento del cáncer oral en un modelo experimental.

Existe un solo artículo publicado en la literatura internacional sobre el efecto terapéutico de irradiación X (una fracción de 20 Gy) en los tumores que se desarrollan en la bolsa facial del hámster una vez concluido el proceso de cancerización experimental. Este estudio mostró una repuesta terapéutica inicial (14 días post-irradiación) seguido por un desarrollo tumoral a los 14 y 39 días post-tratamiento. En ese trabajo todas las bolsas irradiadas mostraron grandes áreas de necrosis e inflamación y se observaron efectos sistémicos en los animales (Horn Y. y col. , 1971).

En el presente estudio se evidencia un efecto terapéutico del BNCT sobre el tumor sin toxicidad detectable en el tejido normal luego de 5,2 Gy de dosis física (14,9 Gy-Eq) (asumiendo un CBE de 3,8 para el componente de boro en el tumor) comparado con una fracción de 20 Gy de rayos X, que fue ineficaz en el control del tumor y dañino para el tejido normal. La selectividad de la reacción de captura de BNCT y por lo tanto la deposición de una gran parte de la dosis total en el tejido tumoral se contrapone a lo que ocurre en radioterapia convencional. Esto hizo posible entregar una dosis de 14,9 Gy-Eq al tumor y de 7,5 Gy-Eq al tejido normal en nuestro estudio, logrando control tumoral sin dañar el tejido normal. Coderre y col. (Coderre J. A. y col. , 1999b) han reportado un factor de efectividad biológica relativa (CBE) de 4,9 para el BPA en la lengua normal de rata. El factor CBE para la bolsa de hámster queda aún por determinar.

Con respecto al estado general de los animales puede decirse que en el grupo tratado con BNCT, se notó una leve reducción del peso corporal una semana post-irradiación y una posterior recuperación. Probablemente esto se debió a la inflamación en el tejido precanceroso encontrada en ese mismo momento, la cual podría haber interferido con la ingesta normal del alimento. Los hámsters con tumor tratados con neutrones solos (sin el compuesto borado) muestran una reducción en el peso corporal a las 4 semanas post-irradiación compatible con la progresión de los tumores.

Las observaciones histológicas sugieren que la rápida remisión del tumor en los animales tratados con BNCT se debería al daño en la capa basal inducida por la reacción de captura, seguida de la pérdida de los estratos superiores de células tumorales. Este efecto podría ser explicado, en parte, por la acumulación preferencial de BPA en la capa basal. Esta hipótesis deberá ser explorada en estudios futuros. Existe un estudio realizado en la Ohio State University por el grupo del Dr. Barth (trabajo en curso) con el objetivo de determinar si el fenómeno de apoptosis podría mediar la reacción letal producida por la reacción de captura en el BNCT. Estos estudios demuestran inequívocamente que el BNCT produce un aumento en el número de células apoptóticas comparado con los controles irradiados con neutrones, sin inyectar con el compuesto borado. La apoptosis ó muerte celular programada (Kerr J. F. R. y col. ,

1972) es un proceso que puede ser iniciado en la célula por una serie de estímulos externos tales como drogas (Au J. L. S. y col. , 1997) y radiaciones ionizantes (Blank K. R. y col. ,1997). Una vez iniciada, se produce la condensación del citoplasma y del núcleo y la consiguiente formación de los característicos cuerpos apoptóticos. Este proceso puede ser completado en un intervalo de 4 horas. Si se detectan células apoptóticas en un tejido, es muy probable que exista una gran fracción de la población de células apoptóticas que ya hayan sido removidas (Bosman F. T. y col. ,1996). Sobre la base de la existencia del proceso de apoptosis luego de la reacción de BNCT, sería muy interesante estudiar si dicho fenómeno pudiese resultar en un mecanismo alternativo ó sinérgico que explicaría la rápida e inequívoca remisión en los tumores de la bolsa de la mejilla del hámster mediada por el BNCT. Para determinar si esto es así se haría necesario estudiar el tejido irradiado a intervalos más cortos de tiempo luego de la irradiación, dado que en el estudio realizado el primer tiempo evaluado fue de 24 h post-BNCT.

Como resultado de la constante búsqueda por maximizar el beneficio de la terapia por BNCT se ha llegado a conclusiones muy importantes en términos de la ganancia terapéutica que poseería la técnica. En cualquier terapia radiante, la dosis entregada al tumor está limitada por la tolerancia del tejido normal circundante dentro del volumen tratado. El corto rango de los productos de la reacción de BNCT generados durante la reacción de captura presenta una oportunidad para aumentar la relación terapéutica (dosis al tumor/dosis al tejido normal) ó “therapeutic ratio” a niveles sin precedentes en la radioterapia con fotones. La determinación del “therapeutic ratio” requiere, para cada compuesto, el conocimiento de la concentración de boro en el tumor, sangre y tejido normal así como el RBE de cada uno de los componentes de dosis de la reacción de BNCT para el tumor y tejido normal, incluyendo el CBE. El RBE de los componentes del haz de neutrones y los CBEs para el BNCT mediado por el BPA y BSH han sido descriptos en el tumor de ratas portadoras de gliosarcoma (Coderre J. A. y col. , 1993), médula espinal de rata (Morris G. M. y col. , 1994b) y piel de rata (Morris G. M. y col. , 1994c). Los RBEs y CBEs correspondientes a los modelos citados combinados con una relación de ^{10}B tumor/sangre mayor ó igual a 3:1 produce una ganancia terapéutica para el BNCT mediado por BPA que excede el valor de 5:1 (dosis al tumor/dosis al cerebro

normal). Para el BSH la ganancia terapéutica es menor (1,1:1) debido a la relación desfavorable de 0,5:1 entre el tumor y la sangre con respecto a la captación de boro. Debido a las diferencias en la ganancia terapéutica entre el BPA y el BSH, a dosis similares en el endotelio vascular, se observan diferencias muy marcadas favorables al BPA en la proporción de sobrevivientes a largo plazo entre los animales tratados (Coderre J. A. y col. , 1996).

Otro factor a tener en cuenta cuando se considera la ganancia en la relación terapéutica ó "therapeutic ratio" es la cantidad absoluta de boro acumulada en el tejido tumoral. A iguales relaciones tumor/sangre en las concentraciones de boro, la ganancia terapéutica aumenta a medida que se le administran mayores cantidades de absolutas de boro al tumor y al tejido normal. Es más importante tener altos niveles de ^{10}B en el tumor, a una relación fija tumor/tejido normal, que menos cantidades de ^{10}B en el tumor con altas relaciones de boro/tejido normal (Coderre J. A. y col. , 1999). Esto se debe principalmente al menor tiempo de irradiación requerido para entregar la misma dosis al tumor con la consiguiente disminución en la dosis entregada al tejido normal. Los componentes de dosis no relacionados con la reacción de captura en boro (neutrones rápidos del reactor, rayos gamma producidos por la reacción de captura en hidrógeno, y protones producidos por la reacción de captura en nitrógeno) se reducen al reducirse el tiempo de irradiación. El aporte de dosis proporcional de la componente de boro será mayor cuanto mayor sea la concentración absoluta de boro.

Los resultados obtenidos en el presente estudio de BNCT utilizando BPA como molécula transportadora de boro sugieren que el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster podría contribuir a la evaluación de nuevos compuestos de boro in vivo. Más aún, permite evaluar diferentes protocolos de BNCT y examinar los efectos sobre el tumor y el tejido normal y estudiar los mecanismos involucrados en la remisión tumoral producida por la terapia.

La administración de dosis múltiples de CuTCPH (Miura M. y col. , 2001) entrega a los tumores de la bolsa de la mejilla cantidades de boro absolutas y relativas que exceden marcadamente los valores terapéuticos. Las relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre obtenidos son mucho mayores que los esperados con los otros compuestos de boro tradicionales como el BPA y BSH. Adicionalmente el CuTCPH tiene una permanencia en el tumor del orden de días mientras que el BPA sólo tiene una permanencia de horas. Esta característica ampliaría la ventana temporal para realizar la irradiación con neutrones haciendo más flexible el protocolo de la terapia. Esto además favorecería la administración de combinaciones de compuestos de boro en distintos momentos luego de la administración de CuTCPH dependiendo de las fases de incorporación y eliminación de los mismos. Así, en nuestro modelo el mejor tiempo post-inyección para el CuTCPH fue de 3 días mientras que para el BPA-F fue de 3,5 h lo cual haría muy fácil su combinación.

El uso de porfirinas como compuestos transportadores de boro se inicia con un esfuerzo independiente pero con el mismo objetivo del Dr. Khal, la Dra. Miura y el Dr. Gabel y colaboradores con el fin de desarrollar porfirinas solubles en agua para su uso en BNCT (Kahl S. B. y col. , 1993; Miura M y col. , 1990; Gabel D. y col. , 1994). Entre las consideraciones respecto de este tipo de compuestos debe mencionarse su toxicidad en las concentraciones necesarias para llevar a cabo la terapia del BNCT. El compuesto que ha sido más estudiado a nivel biológico es un derivado de la deuterioporfirina IX llamado BOPP (Kahl S. B. y col. , 1990). Ha sido empleado no solo para estudios de BNCT sino para su aplicación como sensibilizador en la terapia fotodinámica ó PDT (Munday A. D. y col. , 1996; Spizzini P. G. y col. , 1996; Mark A. y col. , 2001). Los estudios de biodistribución en ratones portadores de tumores han sido muy promisorios. Se ha reportado una localización subcelular del compuesto específica en la mitocondria (Munday A. D. y col. , 1996; Spizzini P. G. y col. , 1996). Sin embargo, los estudios en ratas con tumores intracerebrales han mostrado sin lugar a dudas que el BOPP es altamente tóxico al nivel requerido para obtener cantidades suficientes de boro en el tumor (Ozawa T. y col. ,1998).

Dentro de este contexto, los compuestos lipofílicos sintetizados por la Dra. Miura (NiTCPH, CuTCP y CuTCPH) muestran una ventaja significativa en términos de su baja toxicidad (Miura M. y col. , 1996a; Miura M. y col. , 1996b; Miura M. y col. , 1997). Se ha estudiado el comportamiento, y se ha efectuado el estudio enzimático, químico y hematológico de la sangre de ratones inyectados con dichos compuestos. Estos estudios no mostraron diferencias con los animales inyectados con el vehículo solo. Por ejemplo el compuesto NiTCPH no causa ningún tipo de toxicidad ni muerte a una dosis total de 272 mg/kg de p.c. en un total de 100 ratones (Miura M. y col. , 1998). Es de notar que la dosis máxima de CuTCPH utilizada en este trabajo fue de 128 mg/Kg administrada en 4 inyecciones. Con dicha dosis no se registraron signos de toxicidad en ninguno de los hámsters inyectados. Los análisis enzimáticos y hematológicos constituyen algunas de los parámetros a analizar en próximos estudios.

Los estudios histopatológicos realizados por la Dra. Miura en secciones de hígados de ratones (teñidos con Hematoxilina-Eosina) muestran que, mientras las porfirinas solubles en agua son severamente hepatotóxicas, el CuTCP y el NiTCPH (ambas lipofílicas) exhiben poca o ninguna toxicidad. En este sentido estos compuestos serían comparables al BPA (Miura M. y col. , 1998).

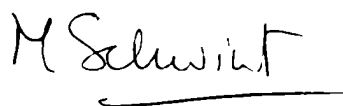
8- Conclusiones

Es posible entregar el boro en forma selectiva y en cantidades potencialmente terapéuticas en el tumor de la mejilla del hámster. Se pueden alcanzar relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre que serían compatibles con un tratamiento exitoso. El BNCT genera una rápida y dramática remisión tumoral y virtualmente ningún daño al tejido normal en este modelo. Se ha demostrado así, por primera vez, el tratamiento exitoso del cáncer oral con BNCT en un modelo experimental. Las observaciones histológicas sugieren que la rápida remisión del tumor en los animales tratados con BNCT se debería al daño en la capa basal inducida por la reacción de captura, seguida de la pérdida de los estratos superiores de células tumorales.

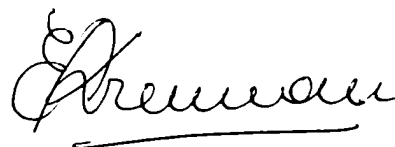
El modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster sería particularmente útil para evaluar la respuesta de los tejidos orales limitantes de la dosis en respuesta a la terapia de BNCT entregada en una dosis simple y/o en protocolos de irradiación fraccionada. El modelo nos permitiría estudiar el efecto inducido por el BNCT en el lecho vascular del tumor y del tejido normal.

El modelo es sumamente interesante para realizar la evaluación de nuevos compuestos de boro in vivo que no han sido implementados aún en el ámbito clínico. Los compuestos aprobados para el uso en humanos como el BPA y BSH arrojaron resultados alentadores con respecto a la eficacia de esta terapia pero hasta la fecha no concluyentes. En este sentido, se ha planteado a nivel mundial, la búsqueda de nuevos compuestos borados. Dentro de los nuevos compuestos desarrollados, el compuesto sintetizado por la Dra. Miura posee características excepcionales en términos de su selectividad, incorporación y permanencia en el tumor de la bolsa de la mejilla, además de su baja toxicidad en los animales tratados.

Numerosos grupos en todo el mundo se encuentran muy interesados en explorar nuevas aplicaciones de BNCT y en profundizar en el conocimiento de la biología y radiobiología de dicha terapia. Esto permitiría aumentar la ventaja terapéutica del tratamiento. El modelo de carcinogénesis en la bolsa de la mejilla del hámster constituye un modelo de cáncer oral humano de gran valor como un novedoso abordaje experimental a los estudios de BNCT, en particular como una nueva estrategia potencial para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Schwint', with a horizontal line underneath.

Firma del Director de Tesis

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Preussner', with a horizontal line underneath.

Firma del Doctorando

9. REFERENCIAS

Alam F., Soloway A. H., Barth R. F. Boronation of antibodies with mercaptoundecahydro-closo-dodecarborate (2-) anion for potential use in boron neutron capture therapy. *Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part A.* 38: 503-506, 1987.

Allen D. A., Beynon T. D. A design study for an accelerator-based epithermal neutron beam for BNCT. *Phys. Med. Biol.* 40(5): 807-821, 1995.

Amaldi U., Larsson B. *Handrontherapy in Oncology.* Eds. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1994.

Ang K. K., Xu F. X., Van Uytsel L., Van der Schueren E. Repopulation kinetics in irradiated mouse lip mucosa: The relative importance of treatment protraction and time distribution of irradiations. *Radiat. Res.* 101: 162-169, 1985.

Arden K. C., Bucana C. D., Johnston D. A., Pathak S. Computer assisted image analysis of silver staining in normal and leukemic bone marrow. *Int. J. Cancer* 43: 395-398, 1989.

Asbury A. K., Ojeman R. G., Nielsen S. L., Sweet W. H. Neuropathological study of fourteen cases of malignant brain tumor treated by boron-10 slow neutron capture radiation. *J. Neuropath. Expt. Neurol.* 31: 278-303, 1972.

Au J. L.-S., Panchal N., Li D., Gan Y. Apoptosis: A new pharmacodynamic endpoint. *Pharm. Res.* 14: 1659-1671, 1997.

Azzam E. I., Toledo S. M., Gooding T., Little J. B. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat. Res.* 150: 497-504, 1998.

Azzam E. I., Toledo S. M., Walker A. J., Little J. B. High and low fluences of alpha particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblast. *Cancer Res.* 60: 2623-2631, 2000.

Barth R. F., Alam F., Soloway A. H., Adams D. M., Steplewski Z. Boronated monoclonal antibody 17-1A for potential neutron capture therapy of colonorectal cancer. *Hybridoma* 5: s43-s50, 1986.

Barth R. F., Soloway A. H., and Fairchild R. G. Boron Neutron Capture Therapy for Cancer. *Scientific American* pp 68-73, October 1990.

Barth R. F., Matalka K. Z., Bailey M. Q., Staubus A. E., Soloway A. H., Moeschberger M. L., Coderre J. A., and Rofstad E. K. A nude rat model for neutron capture therapy of human intracerebral melanoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 28: 1079-1088, 1994.

Barth R. F., Yang W., Rotaru J. H., Moeschberger M. L., Joel D. D., Nawrocky M. M., Goodman J. H., and Soloway A. H. Boron Neutron Capture Therapy of Brain Tumors: Enhanced Survival following Intracarotid Injection of either Sodium Borocaptate or Boronophenylalanine with or without Blood-Brain Barrier Disruption. *Cancer Res.* 57: 1129-1136, 1997.

Barth R. F. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 Gliomas. *Journal of Neuro-Oncology* 36: 91-102, 1998.

Bennett B. D., Zha X. H., Gay I., and Morrison G. M. Intracellular boron localization and uptake in the cell cultures using imaging secondary ion mass spectrometry (ion microscopy) for neutron capture therapy for cancer. *Biol. Cell.* 74: 105-108, 1992.

Bennett B. D., Mumford-Zisk J., Coderre J. A., and Morrison G. M. Subcellular localization of p-boronophenylalanine-delivered boron-10 in the rat 9L gliosarcoma, Cryogenic preparation in vitro and in vivo. *Radiat. Res.* 140: 72-78, 1994.

Blank K. R., Rudoltz M. S., Kao G. D., Muschel R. J., McKenna W. G. The molecular regulation of apoptosis and implications for radiation oncology. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71: 455-466, 1997.

- Bosman F. T., Visser B. C., Van Oeveren J. Apoptosis: Pathophysiology of programmed cell death. *Path. Res. Pract.* 192: 676-683, 1996.
- Boss C. B. y Fredeen K. J. Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Second ed. Perkin Elmer, 1999.
- Burlón A. A., Kreiner A. J., White S, Blackburn B, Gierga D. P., and Yanch. J. C. In-phantom dosimetry using the $^{13}\text{C}(\text{d},\text{n})^{14}\text{N}$ reaction as a source for accelerator-based BNCT. *Medical Physics* 28: 796, 2001.
- Burlon A. A., Tesis Doctoral, Instituto de Tecnología, CNEA-UNSAM, 12-2001
- Busse P. M., Harling O. K., Palmer M. R., Kaplan I., Newton T. H. Jr., Kaplan J., Chuang C. F., Kiger III W. S., Riley K. J., Goorley J. T., Zamenhof R. G. A Phase I clinical trial for cranial BNCT at Harvard-MIT. In Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer, Abstracts, pp 27-28, Osaka, 2000.
- Busse P. M., Zamenhof R. G. Harling O. K., Kaplan I., Kaplan J., Chuang C. F., Goorley J. T., Kiger III W. S., Riley K. J., Palmer M. R. The Harvard-MIT BNCT program: Overview of the clinical trials and translational research. In *frontiers in Neutron Capture Therapy*. Plenum Press, New York, in press.
- Cabrini R. L., Itoiz M. E., Mayo J. J., Smolko E. E., Klein-Szanto A. J. P. Microspectrophotometric study of histoenzymic reactions in rat epidermis subjected to 0,5 Mrad of deuteron irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 18: 415-421, 1970.
- Cabrini R. L., Schwint A. E., Mendez A., Femopase H., Lanfranchi H., Itoiz M. E. A morphometric study of nucleolar organizae regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 21: 275-279, 1992.
- Cahan W. G. Multiple primary cancers of the lung, esophagus and other sites. *Cancer* 40: 1954-1960, 1977.

Callahan D. E., Forte T. M., Afzal S. M., Deen D. F., Bauer W. F., Blakely E. A. Boronated protoporphyrin (BOPP): localization in lysosomes of the human glioma cell line SF-767 with uptake modulated by lipoprotein levels. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 45 (3): 761-771, 1999.

Calvo W., Hopewell, J. W., Reinhold, H. S., and Yeung, T. K. Time and dose-related changes in the white matter of the brain after single doses of X-rays. *Br. J. Radiol.*, 61: 1043-1052, 1988.

Caruso, M. Gene therapy against cancer and HIV infection using the gene encoding herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Med. Today* May 5: 212-217, 1996. Review.

Chanana A. D., Capala J., Chadha M., Coderre J. A., Diaz A. Z., Elowitz E. H., Iwai J., Joel D. D., Liu H. B., and Wielopolski L. Boron Neutron Capture Therapy for Glioblastoma Multiforme: Interim Results for the Phase I/II Dose-Escalation Studies. *Neurosurgery*, 44: 1182-1193, 1999.

Chandra S., Lorey D.R., Lessig S.L., Smith D.R. Morrison G.H. Quantitative imaging of boron from BPA and BSH in glioblastoma cells with ion microscopy. In *advances in Neutron Capture Therapy. Volume II, Chemistry and Biology* (B. Larson, J. Cranford and R. Weinreich, Eds.) pp. 315-320. Elsevier, Lausanne, 1997.

Chang W. W. L. Histogenesis of symmetrical 1,2-dimethylhydrazine-induced neoplasms of the colon in mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 60: 1405-1418, 1978.

Choy A. T. K., van Hasselt C. A., Chisholm E. M., Rhys Williams S., King W. W. K., Li A. R. C., y col. Multiple primary cancers in Hong Kong Chinese patients with squamous cell cancer of the head or neck. *Cancer* 70: 815-820, 1992.

Clendenon N. R., Barth R. F., Gordon W. A., Goodman J. H., Alam F., Staubus A. E., Boesel C. P., Yates A. J., Moeschberger M. L., Fairchild R. G., and Kalef- Ezra J. A: Boron Neutron Capture Therapy of a rat glioma. *Neurosurgery* 26: 47-55, 1990.

Coderre J. A., Glass J. D., Fairchild R. G., Roy U., Cohen S., Fand I. Selective targeting of boronophenylalanine to melanoma in BALB/c mice for boron neutron capture therapy. *Cancer Res.* 47(23): 6377-83, 1987.

Coderre J., Glass J. D., Fairchild R. G., Micca P. L., Fand I. and Joel D. D. Selective Delivery of Boron by the Melanin Precursor Analogue p-Boronophenylalanine to Tumors Other Than Melanoma. *Cancer Res.* 50: 138-141, 1990.

Coderre J. A., Slatkin D. N., Micca P. L., and Ciallella J. R. Boron neutron capture therapy of a murine melanoma with p-boronophenylalanine: Dose-response analysis using a morbidity index. *Radiat. Res.* 128: 177-185, 1991.

Coderre J. A., Joel D. D., Micca P. L., Nawrocky M. M., and Slatkin D. N. Control of intracerebral gliosarcomas in rats by boron neutron capture therapy with p-boronophenylalanine. *Radiat. Res.* 129: 290-296, 1992.

Coderre J. A., Joel D. D., Micca P. L., Nawrocky M. M., and Slatkin D. N. Control of Intracerebral Gliosarcoma in Rats by Boron Neutron Capture Therapy with p-Boronophenylalanine. *Radiat. Res.* 129: 290-296, 1992.

Coderre J. A., Makar M. S., Micca P. L., Nawrocky M. M., Liu H. B., Joel D. D. Slatkin D. N., and Amols H. I. Derivations of relative biological effectiveness for the high-LET radiations produced during boron neutron capture irradiations of the 9L rat gliosarcoma in vivo and in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 27: 1121-1129, 1993.

Coderre J. A., Button T. M., Micca P. L., Fisher C. D., Nawrocky M. M., and Liu H. B. Neutron capture therapy of the 9L rat gliosarcoma using the p-boronophenylalanine-fructose complex. *Int. J. Radiat. Oncol. Phys.*, 30: 643-652, 1994.

Coderre J. A., Morris G. M., Micca P. L., Fisher C. D., Ross G. A. Comparative assessment of single-dose and fractionated boron neutron capture therapy. *Radiat. Res.* 144: 310-317, 1995.

Coderre J. A., Morris G. M., Micca P. L., Nawrocky M. M., Fisher C. D., Bywaters A., and Hopewell J. W. Cancer Neutron Capture Therapy; Mishima Y., Eds.; Plenum Press: New York : 757-762, 1996.

Coderre J. A., Elowitz E. H. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme using p-boronophenylalanine and epithermal neutrons: Trial design and early clinical results. *J Neuro-oncol*, 33: 141-152, 1997.

Coderre J. A., Chanana A. D., Joel D. D., Elowitz E. H., Micca P. L., Nawrocky M. M., Chadha M., Gebbers J. O., Shady M., Peress N. S., and Slatkin D. N. Biodistribution of Boronophenylalanine in Patients with Glioblastoma Multiforme: Boron Concentration Correlates with Tumor Cellularity. *Radiat. Res.* 149: 163-170, 1998.

Coderre J. A. and Morris G. M. The Radiation Biology of Boron Neutron Capture Therapy. *Radiat. Res.* 151: 1-18, 1999a.

Coderre J. A., Morris G. M., Kalef-Ezra J., Micca P. L., Ma R., Youngs K., and Gordon C. R. The Effects of Boron Neutron Capture Therapy Irradiation on Oral Mucosa: Evaluation Using a Rat Tongue Model. *Radiat. Res.* 152: 113-118, 1999b.

Coffey R. J., Shipley G. D., Moses H. L. Production of transforming growth factors by human colon cancer lines. *Cancer Res.* 46: 1164-1169, 1986.

Cohen L. Radiation response and recovery: Radiobiological principles and their relation to clinical practice. In the *Biological Bases of Radiation Therapy* (E. E. Schwartz, Ed.), p 248. J. B. Lippino, Philadelphia, 1996.

Colacchio T. A., Chabot J. A., Zimmerman B. W. Differential mucin staining in colorectal neoplasms. *Am. J. Surg.* 147: 666-669, 1984.

Collet A. M., Mendez A. E., Schwint A. E., Itoiz M. E. Activity of vascular ATPase and desmoplastic induction in the early stages of experimental carcinogenesis (Abstract). *J. Dent. Res.* 74 (3): 741, 1995.

Crocker J., Nar P. Nucleolar organiser regions in lymphomas. *J. Pathol.* 40: 885-889, 1987.

Crocker J., Skilbeck N. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *J. Clin. Pathol.* 151: 111-118, 1987.

Crocker J., Boldy D. A., Egan M. J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J. Pathol.* 158: 185-188, 1989

Deshpande A., Goodwin E. H., Bailey S. M., Marrone B. L. and Lehnert. B. E., Alpha-particle induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: Evidence for an extranuclear target. *Radiat. Res.* 145: 260-267, 1996.

Dhooge J., De-Vos M., and Van-Cauwenberge P. B. Multiple primary malignant tumors in patients with head and neck cancer: results of a prospective study and future perspectives. *Laryngoscope* 108(2): 250-256, 1998.

Diamond I., Granelli S., McDonagh A.F., Nielsen S., Wilson C.B., Jaenicke R. Photodynamic Therapy of Malignant Tumours. *Lancet* pp 1175-1177, 1972.

Dörr W., Hniler E., Honig M. Response of mouse tongue epithelium to single doses of bleomycin and radiation. *Radiother. Oncol.* 27: 237-244, 1993.

Dougherty T. J. An update on photodynamic therapy applications. *J. Clin. Laser. Med. Surg.* 20(1): 3-7, 2002.

Douglas B. G. Implication of the quadratic cell survival curve human skin radiation "tolerance dose" on fractionation and subfractionation dose selection. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* pp 1135-1142, 1982.

Dutriex J., Tubiana M. Wambersie A., Malaise E. The influence of cell proliferation in tumors and normal tissues during fractionated radiotherapy. *Eur. J. Cancer* 7: 205-213, 1971.

Elowitz E. H., Bergland R. M., Coderre J. A., Joel D., Chadha M., Chanana A. D. Biodistribution of p-borophenylalanine in patients with glioblastoma multiforme for use in boron neutron capture therapy. *Neurosurgery* 42: 463-468, 1998.

EU-Workshop on BNCT, Green College, Oxford, 2001.

Fairchild R. G., Kahl S. B., Laster B. H., Kalef-Ezra J., Popenoe E. A. In vitro determination of uptake, retention, distribution, biological efficacy and toxicity of boronated compounds for neutron capture therapy: A comparison of porphyrins and sulfhydryl boron hydrides. *Cancer Res.* 50: 4860-4865, 1990.

Farr L. E., Robertson J. S., Stickley E. E: Physics and physiology of neutron capture therapy. *Pro. Nat. Acad. Sci. US* 40: 1087-1093, 1954a.

Farr L. E., Sweet W. H., Locksley H. B., Robertson J. S: Neutron capture therapy of gliomas using boron-10. *Transact. Amer. Neurol. Ass.* 79: 110-113, 1954b.

Farr L. E., Sweet W. H., Robertson J. S., Foster C. G., Sutherland D L., Mendelshon M. L. Neutron capture therapy with boron in the treatment of glioblastoma multiforme. *Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med.* 71: 279-293, 1954c.

Farr L. E., Calvo W. G., Haymaker W. E., Lippincott S. W., Yamamoto Y. L., Stickley E. E. Effect of thermal neutrons on the central nervous system (apparent tolerance of central nervous system structures in man). *Arch. Neurol.* 4: 246-257, 1961.

Farr L. E. and Konikowski. Transplantable mouse neoplasma control by neutron capture therapy. *Nature* 215: 550-552, 1967.

Friedlander G., Kennedy J. W., Macias E. S., Miller J. M. In *Nuclear and Radiochemistry*, 3: John Wiley & Sons: New York, p 610, 1981

Frigerio N. A., Gruen D. M. Abstracts of papers; San Francisco; April, 1958; 133rd National Meeting of the American Chemical Society, Inorganic Chemistry Paper No. 82.

Fukuda H., Hiratsuka J., Honda C., Kobayashi T., Yoshino K., Karashima H., Takahashi J., Abe Y., Kanda K., Ichihashi M., and Mishima Y. Boron neutron capture therapy of malignant melanoma using ^{10}B -paraboronophenylalanine with special reference to evaluation of radiation dose and damage to the skin. *Radiat. Res.* 138: 435-442, 1994.

Fukuda H., Mishima Y., Hiratsuka J., Honda C., Wadabayashi N., Kobayashi T., Yoshino K., Karashima H., Takahashi J., Abe Y., Kanda K., Ichihashi M. BNCT of malignant melanoma: Radiobiological analysis and data comparison with conventional radiotherapy. In *Cancer Neutron Capture Therapy* (Y. Mishima, Ed.), pp 663-671. Plenum Press, New York, 1996.

Fukuda H., Mishima Y., Hiratsuka J., Kobayashi T., Karashima H., Yoshino K., Tsuru K., Araki K., Ichihashi M. Four cases of facial melanoma by BNCT with BPA. In *Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer, Abstracts*, p 163 Osaka, 2000.

Fu K. K., Cooper J. S., Marcial V. A., Laramore G. E., Pajak T. F., Jacobs J., Al-Sarraf M., Forastiere A., and Cox J. D. Evolution of the Radiation Therapy Oncology Group Clinical Trials for Head and Neck Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 35(3): 425-438, 1996.

Gabel D., Fairchild R. G., and Larsson B. The relative biological effectiveness in V79 Chinese hamster cells of the neutron capture reaction in boron and nitrogen. *Radiat. Res.* 98: 307-316, 1984.

Gabel, D., Foster, S., Fairchild, R G. The Monte Carlo simulation of the biological effect of the $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ reaction in cells and tissue and its implication for boron neutron capture therapy. *Radiat. Res.*, 111: 14-25, 1987.

Gabel D., Harfst S., Moller D., Ketz H., Peymann T., Rösler J. Current Topics in the Chemistry of Boron ; Kabalka G. W., Ed.; The royal society of Chemistry: Cambridge, UK, p 161, 1994.

Gabel D., Preusse D., Haritz D., Grochulla F., Hselsberger K., Frankhauser H., Ceberg C., Peters H-P., and Klotz U. Pharmacokinetics of Na²B¹²H¹¹SH (BSH) in patients with malignant brain tumors as prerequisite for a Phase I clinical trial of boron neutron capture therapy. *Acta Neurochir.* 139: 606-612, 1997.

Gavin P. G., Kraft S. L., Huiskamp R., and Coderre J. A., A review: CNS effects and normal tissue tolerance in dogs. *J. Neuro-Oncol.* 33: 71-80, 1997.

Gavin P. G., Wheeler F. J., Huiskamp R., Siefert A., Kraft S., DeHaan C. E. Large animal studies of normal tissue tolerance using an epithermal neutron beam and borocaptate sodium. In *Towards Clinical Trials of Glioma* (D. Gabel and R. Moss, Eds), pp 197-209. Plenum Press, New York, 1992.

Gimenez-Conti B., Shin D. M., Bianchi A. B., Roop D. R., Hong W. K., Conti C. J., and Slaga T. J. Changes in keratin expression during 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Cancer Res.* 50: 4441-4445, 1990.

Gregoire V., Sindic C., Gahbauer R. A., Wambersie A. Alteration of the blood-brain barrier after irradiation: implication in boron neutron capture therapy. *Strahlenther. Onkol.* 169(9): 534-542, 1993.

Hall P. A., Crocker J., Watts A., Stansfeld A. G. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immuno-staining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 12: 373-381, 1988.

Haritz, D., Gabel, D., and Huiskamp, R. Clinical phase-I study of Na²B¹²H¹¹SH (BSH) in patients with malignant glioma as a precondition for boron neutron capture therapy (BNCT). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 28: 1175-1181, 1994.

Hartman T., Carlsson J. J. Radiation dose heterogeneity in receptor and antigen mediated boron neutron capture therapy. *Radiother. Oncol.* 31(1): 61-75, 1994.

Haselsberger K., Radner H., Gossler W., Schlagenhafen C. and Pendl G. Subcellular boron-10 localization in glioblastoma for boron neutron capture therapy with $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$. J. Neurosurgery. 8: 741-744, 1994

Hatanaka H. Boron neutron capture therapy- Introduction. In: Hatanaka, H. (ed): Boron neutron capture therapy. Nishimura, Niigata pp 1-28, 1986.

Hatanaka H. Clinical results of boron neutron capture therapy. In: Harling O. K., Bernard J. A., Zamenhof R. G. (ed.): Neutron beam design, development and performance for neutron capture therapy. Plenum Press, New York-London, 1990.

Hatanaka H. Boron neutron capture for brain tumors. In Glioma. Springer verlog, Berlin, pp 233-249, 1991.

Hatanaka H., and Nakagawa Y. Clinical results of long-surviving brain tumor patients who underwent boron neutron capture therapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 28: 1061-1066, 1994.

Hill J. S., Khal S. B., Kaye A. H., y col. Selective tumor uptake of a boronated porphyrin in an animal model of cerebral glioma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1785-1789, 1992.

Holley J. L., Mather A., Wheelhouse R. T., y col. Targeting of tumor cells and DNA by a chlorambucil-spermidine conjugate. Cancer Res. 52: 4190-4195, 1992.

Hopewell J. W. Early and late changes in the functional vascularity of the hamster cheek pouch after local x-irradiation. Radiation Res. 63(1): 157-164, 1975.

Horn Y., Levij Y. S., and Polliack A. Short-and Long-Term Response of DMBA-Induced Hamster Cheek Pouch Carcinoma to a High Dose of Radiation. J. Dent. Res. Vol 50, No. 5, 1971.

Huiskamp R., Gavin P. R., Coderre J. A., Phillip K. H. I., and Wheeler F. J., Brain tolerance in dogs to boron neutron capture therapy with borocaptate sodium (BSH) or boronophenylalanine (BPA). In Cancer Neutron Capture Therapy (Y. Mishima), pp 591-596. Plenum Press, New York, 1996.

IAEA-TECDOC-1233. Current Status of Neutron Capture Therapy. International Atomic Energy Agency, May 2000.

Ichihashi M. BNCT for malignant melanoma-retrospective and perspective of clinical trials. In Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer, Abstracts, p 3, Osaka, 2000.

Itoiz M. E., Frasch A. C. C. Variations in the enzymatic behaviour of irradiated epidermis as a function of age and lesion localization. *Int. J. Radiat. Biol.* 31: 499-502, 1977.

Itoiz M. E., Lanfranchi H. E., Gimenez-Conti I. B., Conti C. J. Immunohistochemical demonstration of keratins in oral mucosa lesions. *Acta Odont. Latinoam.* 1: 47-49, 1985.

Itoiz M. E., Conti C. J., Gimenez-Conti I. B., Lanfranchi H. E., Fernandez-Alonso G., Klein-Szanto A. J. P. Immunodetection of involucrin in lesions of the oral mucosa. *J. Oral Pathol.* 15: 205-208, 1986.

Javid M., Brownell G. L., Sweet W. H. The possible use of neutron-capturing isotopes such as boron-10 in the treatment of neoplasmas. II. Computation of radiation energies and estimates of effects in normal and preneoplastic brain. *J. Clin. Invest.* 31: 604-610, 1952.

Jin Y. T., and Lin L. M. Lectin binding patterns in squamous epithelium in experimentally induced hamster buccal pouch carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 18: 446-450, 1989.

Joel D. D., Fairchild R. G., Laissue J. A., Saraf S. K., Kalef-Ezra and Slatkin D. N. Boron neutron capture therapy of intracerebral rat gliosarcomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9808-9812, 1990.

Joel D. D., Coderre J. A., Micca P. L., and Nawrocky M. M. Effect of dose and infusion time on the delivery of p-boronophenylalanine for neutron capture therapy. *Journal of Neuro-Oncology* 41: 213-221, 1999.

Kahl S. B., Joel D. D., Nawrocky M. M., Micca P. L., Tran K. P., Finkel G. C., Slatkin D. N. Uptake of a certain nidocarbonyl porphyrins by human glioma xenografts in athymic nude mice and by syngeneic ovarian carcinomas in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7265-7269, 1990.

Kahl S. B., Koo M. S. *Progress in Neutron Capture Therapy for Cancer*; Allen B.J., Moore D. E., Harrington B V., Eds.; Plenum Press: New York, 1992.

Kahl S. B., Koo M. S., Straubinger R. M., Huang L. R., Fiel R. J., Mazurchuck R., Alleto J. J. *Advances in Neutron Capture Therapy*; Soloway A. H., Barth R. F., Carpenter D. E., Eds. Plenum Press: New York, p 301, 1993.

Kamata S. Recent advances in head and neck surgery. *Gan-To-Kagaku-Ryoho*, 23(3): 265-270, 1996.

Kankaanranta L., Seppälä T., Kallio M., Karila J., Aschan C., Serén T., Kortensniemi M., Kotiluoto P., Järviluoma E., Kulvik M., Laakso J., Brander A., Jääskeläinen J., Vähätalo J., Auriten I., Savolainen s., Färkkilä M., and Joensuu H. First Clinical Results on The Finnish Study on BPA Mediated BNCT In Glioblastoma. In Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer, Abstracts, pp 31-32, Osaka, 2000.

Kastenbauer E., and Wollenberg B. In search of new treatment methods for head-neck carcinoma. *Laryngorhinootologie* 78(1): 31-35, 1999.

Kennedy K. A. Hypoxic cells as specific drugs targets for chemotherapy. *Anti-cancer Drugs Des.* 2: 181-194, 1987.

Kerr J. F. K., Wyllie A. H., Currie A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257, 1972.

Khuri F. R., Lippman S. M., Spitz M. R., Lotan R., and Hong W. K. Molecular epidemiology and retinoid chemoprevention of head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 89(3): 199-211, 1997.

Klein-Szanto A. J. P., Cabrini R. L. Microspectrophotometric study of oxidative enzymes in irradiated epidermis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 18: 235-241, 1970.

Klein-Szanto A. J. P., Cabrini R. L. Acute response of oxidative enzymes systems in epidermis subjected to beta irradiation. *Arch. Derm. Forsch.* 243: 226-231, 1972.

Klein-Szanto A. J. P., Cabrini R. L., Itoiz M. E., Volco H. E. Enzyme variations produced in epidermis by soft X-rays collimated beam. *Int. J. Radiat. Biol.* 26: 265-288, 1974.

Kiger III W.S., Palmer M. R., Riley K. J., Zamenhof R. G., and Busse P. M. A Pharmacokinetic Model for the Concentration of ^{10}B in Blood after Boronophenylalanine-Fructose Administration in Humans. *Radiat. Res.* 155: 611-618, 2001.

Kinashi Y., Sakurai Y., Masunaga S., Suzuki M., Takagaki M., Akaboshi M., and Ono Koji. Molecular Structural Analysis of HPRT Mutations Induced by Thermal and Epithermal Neutrons in Chinese Hamster Ovary Cells. *Radiat. Res.* 154: 313-318, 2000.

Kobayashi T., Kanda K. Analytical calculation of boron-10 dosage in cells nucleus for boron neutron capture therapy. *Radiat. Res.* 91: 77-94, 1982.

Ko L., Koestner A. and Wechsler W. Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones. *Acta Neuropathol.* 51: 23-31, 1980.

- Kohno N., Nakazawa E., Kusunoki M., and Nishiya M. Chemotherapy of head and neck cancer. *Gan-To-Kagaku-Ryoho* 23(3): 277-282, 1996.
- Kornblith P. L., Walker M. J. Chemotherapy for malignant glioma. *J. Neurosurgery* 66: 1-17, 1988.
- Krüger P. G. Some biological effects of nuclear disintegration products on neoplastic tissue. *Proc.Natl. Acad. Sci. US* 26: 181-192, 1940.
- LaHann T. R., Lu D. R., Daniell G., Kraft S. L., Gavin P. R., and Bauer W. F. Bioavailability of intravenous formulations of p-boronophenylalanine in dog and rat. In: A. Soloway, R. Barth, and D. Carpenter (eds.), *Advances in Neutron Capture Therapy*, pp. 585-589. New York: Plenum Press, 1993.
- Laramore G. E. y col. A tumor control curve for malignant gliomas derived from fast neutron radiotherapy data: implications for treatment delivery and compound selection. *Advances in Neutron Capture Therapy, Volume II, Chemistry and Biology* (Larsson B, Crawford J, Weinreich R, Eds.) Elsevier, Amsterdam 8: 580-587, 1997.
- Laster B. H., Thomlinson W. C., Fairchild R. G. Photon activation of iododeoxyuridine: biological efficacy of Auger electrons. *Radiat. Res.* 133(2): 219-224, 1993.
- Lemmen P., Werner B., Streiches B. Ether lipids as potential boron carriers for boron neutron capture therapy: Synthesis of rac-1-(9-0-carboranyl) nonyl-2-methyl-glicero-3-phosphocholine (B-Et-11-Ome). In: *Advances in Neutron Capture Therapy*, edited by A. H. Soloway, R. F. Barth, D. E. Carpenter. New York, Plenum Press, pp. 197-300, 1993.
- Lin L. M., and Chen Y. K. Creatine kinase iso-enzymes activity in serum and buccal pouch tissue of hamsters during DMBA-induced squamous cell carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 20: 479-485, 1991.
- Liu L., Barth R. F., Adams D. M., Soloway A. H., Reisfeld R. A.: Bispecific antibodies as targeting agents for boron neutron capture therapy of brain tumors. *J. Hematother.* 4: 477-483, 1995.

Locher G. L. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons. *Am. J. Roentgenol.*, 36: 1-13, 1936.

Locksley H. B., Farr L. E., Sweet W. H., Robertson J. S. The tolerance of large doses of sodium borate intravenously by patients receiving neutron capture therapy. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 114: 484-489, 1955.

Lloyd F., Van Pelt D. V. M. Ketamine and Xylazine for Surgical Anesthesia in Rats. *JAVMA* 171(9): 842-844, 1977.

Lurie A. G., Tatematsu M., Nakatsuka T., Rippey R. M., and Ito N. Anatomical and Functional Vascular Changes in Hamster Cheek Pouch during Carcinogenesis Induced by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. *Cancer Res.* 43: 5986-5994, 1983.

Lurie A. G., and Rippey R. M. Low Level X-Radiation Effects on Carcinogenesis by 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in Syrian Hamster Cheek Pouch Epithelium: Acute vs Fractionated Radiation Dose Studies. *Radiation Res.* 109: 227-237, 1987.

Lyng F., Seymour C. B., and Mothersill C. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of apoptosis. *Br. J. Cancer*, in press.

Marton L. J., Pegg A. E. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 55-91, 1995.

Mascopinto J. E., Levin A. B., Metha M. P., Rhode B. S. Stereotactic radiosurgery for glioblastoma: a final report of 31 patients, *J. Neurosurg.* 82: 530-535, 1995.

Matalka K. Z., Bailey M. Q., Barth R. F., Staubus A. E., Soloway A. H., Moeschberger M. L., Coderre J. A., and Rofstad E. K. Boron neutron capture therapy of intracerebral melanoma using boronophenylalanine as a capture agent. *Cancer Res.* 53: 3308-3313, 1993.

Matsumura A., Shibata Y., Yamamoto T., Yamada T., Fujimori H., Nakai K., Nakagawa Y., Hayakawa M., Isshiki M., Nose T. The University of Tsukuba BNCT research group: first clinical experience at JAERI. *Advances in Neutron Capture Therapy*. Vol. I, Larsson B, Crawford J., Weinrich R., eds, Elsevier, Amsterdam, pp 46-50, 1997.

McLean I. W., Sibug M. E., Becker R. L., McCurdy J. B. Uveal melanoma: the importance of large nucleoli in predicting patient outcome-an automated image analysis study. *Cancer* 79: 982-988, 1997

Mendez A. E., Schwint A. E., Cabrini R. L., Itoiz M. E. Interaction between connective tissue and epithelium during experimental carcinogenesis (Abstract). *J Dent. Res.* 72 (4): 655, 1993.

Mendez A. E., Schwint A. E., Itoiz M. E., Cabrini R. L. Modifications induced by low doses of irradiation in experimental oral chemical carcinogenesis (Abstract). *J Dent. Res.* 73 (4): 734, 1994.

Mishima Y., Honda C., Ichihashi M., et al. Selective melanoma thermal neutron capture therapy for lymph node metastases. In: *Advances in Neutron Capture Therapy*, edited by A. H. Soloway, R. F. Barth, D. E. Carpenter. New York, Plenum Press, pp 705-710, 1993.

Mishima Y., Honda C., Ichihashi M., Obara H., Hiratsuka J., Fukuda H., Karashima H., Kand K. T. K., Yoshino K. Treatment of malignant melanoma by single thermal neutron capture therapy with melanoma-seeking ^{10}B -compound. *Lancet* II pp 388-389, 1989.

Mitchel R. E., Trivedi A. Chronic exposure to ionizing radiations as a tumor promoter in mouse skin. *Radiat. Res.* 129: 192-201, 1992.

Miura M., Gabel D., Oenbrink G., y Fairchild R. G. Syntheses of boronated porphyrins for boron neutron capture therapy. *Tetrahedron Lett.* 31: 2247-2250, 1990.

Miura M., Micca P. L., Heinrichs J. C., Gabel D., Fairchild R. G., and Slatkin D. N. Biodistribution and toxicity of 2,4-divinyl-nido-o-carboranyldeuteroporphyrin IX in mice. *Biochem. Pharmacol.* 43: 467-476, 1992.

Miura M., Micca P. L., Donalson J. A., Heinrichs J. C., Shelnut J. A., Finkel G. C., Slatkin D. N. *Cancer Neutron Capture Therapy*; Mishima Y., Eds.; Plenum Press: New York p.137, 1996a.

Miura M., Micca P. L., Fisher C. R., Heinrichs J. C., Donalson J. A., Finkel G. C., Slatkin D. N. Synthesis of a nickel tetraboranylphenylporphyrin for boron neutron capture therapy: Biodistribution and toxicity in tumor-bearing mice. *Int. J. Cancer*, 68: 114-119, 1996b.

Miura M., Joel D. D., Nawrocky M. M., Micca P. L., Fisher C. R., Heinrichs J. C., Rising C. E., Walker W., Slatkin D. N. *Advances in Neutron Capture Therapy* ; Larson B., Crawford J., Weinreich R., Eds. Elsevier: Amsterdam , The Netherlands, vol II, Chemistry and Biology, 1997.

Miura M., Micca P. L., Fisher C. R., Gordon J. C., Heinrichs J. C., and Slatkin D. N. Evaluation of carborane-containing porphyrins as tumor targeting agents for boron neutron capture therapy . *Br. J. Radiol.* 71: 773-781, 1998.

Miura M., Morris G. M., Micca P. L., Lombardo D. T., Youngs K. M., Kalef-Ezra J. A., Hoch D.A., Slatkin D.N., Ruimei M., and Coderre J. A. Boron Neutron Capture Therapy of a murine Mammary Carcinoma using a Lipophilic Carboranyl-tetraphenylporphyrin. *Radiat. Res.* 155: 603-610, 2001.

Morris G. M., Landuyt W., Whitehouse L., Van Uytsel L., Hopewell J. W. Radiation response of mouse lip mucosal epithelium: A cell kinetic study. *Int. J. Radiat. Biol.* 63: 509-517, 1993.

Morris G. M., Coderre J. A., Whitehouse E. M., Micca P. L., and Hopewell J. W. Boron neutron capture therapy: a guide to the understanding of the pathogenesis of late radiation damage to the rat spinal cord. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 28: 1107-1112, 1994a.

Morris G. M., Coderre J. A., Hopewell J. W., Micca P. L., Nawrocky M. M., Liu H. B., and Bywaters A. Response of the central nervous system to boron neutron capture irradiation: Evaluation using rat spinal cord model. *Radiother. Oncol.* 32: 249-255, 1994b.

Morris G. M., Coderre J. A., Hopewell J. W., Micca P. L., and Rezvani M. Response of rat skin to boron neutron capture therapy with p-boronophenylalanine or borocaptate sodium. *Radiother. Oncol.* 32: 144-153, 1994c.

Morris G. M., Coderre J. A., Bywaters A., Whitehouse E., and Hopewell J. W. Boron neutron capture irradiation of the rat spinal cord: histopathological evidence of a vascular mediated pathogenesis. *Radiat. Res.*, 146: 313-320, 1996.

Morris G. M., Coderre J. A., Micca P. L., Fisher C. D., Capala J., and Hopewell J. W. Central nervous system tolerance to boron neutron capture therapy with p-boronophenylalanine, *Brit. J. Cancer* 76: 1623-1629, 1997.

Morris L. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J. Dent. Res.*, 40: 3-15, 1961.

Mothersill C., Wright E. G., Rea D. M., Murphy D., Lorimore S., Seymour C. B. and O'Malley K. Individual variation in the production of a bystander effect by radiation in normal human uroepithelium. *Carcinogenesis*, in press.

Mothersill C., Stamato T. D., Perez M. L., Mooney R., Cummins R., Seymour C. B. A role for mitochondria in the induction of radiation –induced bystander effects? *Br. J. Cancer* 82: 1740-1746, 2000.

Moss R. L., Aizawa O., Beynon D., Brugger R., Constantine G., Harling O., Liu H B., Watkins P. The requirements and development of neutron beams for neutron capture therapy of brain cancer. *Journal of Neuro-Oncology* 33: 27-40, 1997.

Moses R., Kummermehr J. Radiation response of the mouse tongue epithelium. *Br. J. Cancer Suppl.*, 7: 12-5, 1986.

Nagasawa H., and Little J. B. Induction of sister-chromatid exchanges by extremely low doses of alpha particles. *Cancer Res.* 52: 6394-6396, 1992.

Nakagawa Y., and Hatanaka H. Boron neutron capture therapy: Clinical brain tumor studies. *J. Neuro-Oncol.* 33: 105-115, 1977.

Neumann M., and Gabel D. Cellular and subcellular distribution of BSH in human glioblastoma multiforme. In Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer, Abstracts, pp 71-72, Osaka, 2000.

Ono, K., Masunaga, S., Kinashi, Y., Takagaki, M., Akaboshi, M., Kobayashi, T., Eng, E., and Akuta, K. Radiobiological evidence suggesting heterogenous microdistribution of boron compounds in tumors: its relation to quiescent cell population and tumor cure in neutron capture therapy. *Int. J. Radiation Oncology-Biol. Phys.* 34(5): 1081-1086, 1996.

Ono K., Ueda S., Oda Y., Nakagawa Y., Miyatake S., Takagaki M., Osawa M., and Kobayashi T., Boron neutron capture therapy for malignant glioma at Kyoto University Reactor. In *Advances in Neutron Capture Therapy, Vol. I, Medicine and Physics* (Larsson B., Crawford J., and Weinreich R., Eds.), pp 39-45. Elsevier Science, Amsterdam, 1997.

Ono K., Masunaga S-I., Suzuki M., Kinashi Y., Takagaki M., Akaboshi M. The combined effect of Boronophenylalanine and Borocaptate in Boron Neutron Capture Therapy for SCCVII tumors in mice. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, vol. 43 No. 2, pp 431-436, 1999.

Ootsuyama A., Tanooka H. One hundred percent tumor induction in mouse skin after repeated α -irradiation in a limited dose range. *Radiat. Res.* 115: 488-494, 1988.

Otersen B., Hantz D., Grochulla F., Bergmann M., Sierralta and Gabel D. Binding and distribution of Na²B¹²H¹¹SH on cellular and subcellular level in tumor tissue of glioma patients in boron neutron capture therapy. *J. Neuro-Oncol.* 33: 131-139 (1997).

Ozawa T., Afzal J., Wyrick B. J., Hu L. J., Lamborn K. R., Bollen A. W., Bauer W. F., Fike J. R., Phillips T. L., Blakely E. A. et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research; New Orleans, L. A., vol 39, no 3988, p 586, 1998.

Packer S., Coderre J. A., Saraf S., Fairchild J., Hansrote J., Perry H. Boron neutron capture therapy of anterior chamber melanoma with p-boronophenylalanine. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 33: 9808-9812, 1990.

Pak R. H., Primus F. J., Rickard-Dickson K. J. et al. Preparation and properties of nido-carborane-specific monoclonal antibodies for potential use in boron neutron capture therapy for cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6986-6990, 1995.

Parkins C., Fowler J. F., and Shen Y. A murine model of lip epidermal/mucosal reactions to x-irradiation. Radiother. Oncol. 1: 159-165, 1983.

Patel H., and Sedgwick E. M. BPA & BSH accumulation in experimental tumors. In Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer, Abstracts, pp 59-60, Osaka, 2000.

Pich A, Marmot F., Chiusa L., Cappello N., Resegotti, Navone R. Argyrophylic nucleolar organizer region counts and prognosis in multiple myeloma. Br. J. Haematol 82(4): 681-688, 1992.

Pignol J-P., Oudart H., Chauvel P., Sauerwein W., Gabel D., and Prevot G. Selective delivery of ^{10}B -L-borophenylalanine for boron neutron capture therapy. The British Journal of Radiology 71: 320- 323, 1998.

Poller F., Bauch T., Sauerwein W., Bocker W., Witting A., Streffer C. Comet assay study of DNA damage and repair of tumour cells following boron neutron capture irradiation with fast d(14) + Be neutrons. Int. J. Radiat. Biol., 70(5): 593-602, 1996.

Raaijmakers P. J., Konijnenberg M. W., Dewit L., Haritz D., Huiskamp R., Philipp K., Siefert A., Stecher-Rasmussen F., and Mihnheer B. J., Monitoring of blood- ^{10}B concentration for boron neutron capture therapy using prompt gamma-ray analysis. Acta Oncologica 34(4): 517-523, 1995.

- Robertson J. S. and Mahoney F. J. The United States BNCT program. *Strahlenther. Onkol.* 165: 249-251 (Nr. 2/3), 1989.
- Rong F.G. and Soloway A.H. Synthesis of 5 tethered carborane-containing pyrimidine nucleosides as potential agents for DNA incorporation. *Nucleosides Nucleotides* 13: 2021-2034, 1994.
- Rosenthal M. A., Kavar B., Hill J. S., Morgan D. J., Nation R. L., Styli S. S., Basser R. L., Uren S., Geldard H., Green M. D., Kahl S. B., Kaye A. H. Phase I and Pharmacokinetic Study of Photodynamic Therapy for High-Grade Gliomas Using a Novel Boronated Porphyrin. *J. of Clinical Oncology* 19(2): 519-524, 2001.
- Salley J. J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J. Dent. Res.* 33: 253-262, 1954.
- Sano K. The future role of neurosurgery in the care of cerebral tumors *Neurosurgery. Rev.* 9: 13,1986.
- Santis H., Shklar G., and Chauncey C. Histochemistry of experimentally induced leukoplakia and carcinoma of the hamster buccal pouch. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 17: 207-218, 1964.
- Saris S. C., Solares G. R., Wazer D. E., Cano G., Kerley S. E., Joyce M. A., Adelman L. S. Harling O. K., Madoc-Jones H., and Zamenhof R. G. Boron neutron capture therapy for murine malignant gliomas. *Cancer Res.* 52: 4672-4677, 1992.
- Sauerwein W., Moss R., Hideghety K., Stecher-Rasmussen F., De Vries M., Reulen H. I., Goetz C., Paquis P., Grochulla F., Gabel D. Status report on the European clinical trial of BNCT at Petten. In *Frontiers in Neutron Capture Therapy*. Plenum . Press, New York, in press.
- Sauerwein W., Zurlo A. The EORTC Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) Group. Achievements and future projects. *Eur. J. Cancer*, 38 (4): 31-34, 2002.

- Schulte-Hermann R., Grasl-Kraupp B., Bursch W. Tumor development and apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105: 363-367, 1994.
- Schwint A. E., Itoiz M. E., and Cabrini R. L. A quantitative histochemical technique for the study of vascularization in tissue sections using horseradish peroxidase. *Histochemical Journal*, 16: 907-911, 1984.
- Schwint A. E., Gomez E., Itoiz M. E., and Cabrini R. L. Nucleolar organizer regions as markers of incipient cellular alterations in squamous epithelium. *J. Dent. Res.* 72(8): 1233-1236, 1993.
- Schwint A. E., Savino T. M., Lanfranchi H. E., Marschoff E., Cabrini, R. L., and Itoiz, M. E. Nucleolar Organizer Regions in Lining Epithelium Adjacent to Squamous Cell Carcinoma of Human Oral Mucosa. *Cancer* 73: 2674-2679, 1994.
- Schwint A. E., Folco A., Morales A., Cabrini R. L., and Itoiz M. E. AgNOR mark epithelial foci in malignant transformation in hamster cheek pouch carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.*, 25: 20-24, 1995.
- Scobie M., Threadgill M. D. Synthesis of carborane-containing nitroimidazole compounds via mild 1,3-dipolar cycloaddition. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 13: 939-941, 1992.
- Seymour C. B., and Mothersill C. Relative contribution of bystander and targeted cell killing to the low-dose region of the radiation dose-response curve. *Radiat. Res.* 153: 508-511, 2000.
- Shelly K, Feakes D. A., Hawthorne M. F., et al. Model studies directed toward the boron neutron capture therapy of cancer: boron delivery to murine tumors with liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9039-9043, 1992.
- Sherman M. L., Datta R., Hallahan D. E., Weichselbaum R. R., Kufe D. W. Ionizing radiation regulated expression of the c-jun protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 5663-5666, 1990.

Shklar G., Meyer I., Stevens W., and Turbiner S. A variance in hamster pouch carcinogenesis in tissue irradiated with 200 KVP x-rays and cobalt-60 x-rays. *Oral Surgery* 30(3): 431-437, 1970.

Shklar G., Eisenberg E., and Flynn E. Immunoenhancing agents and experimental leukoplakia and carcinoma of the buccal pouch. *Prog. Exp. Tumor Res.* 24: 269-282, 1979.

Shin D. M., Gimenez I. B., Lee J. S., Nishioka K., Wargovich M. J., Thacher S., Lotan R., Slaga T. S., Hong W. K. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor, Polyamine Levels, Ornithine Decarboxylase Activity, Micronuclei, and Transglutaminase I in a 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis Model. *Cancer Res.* 50: 2505-2510, 1990.

Silverman S., and Griffith M. Smoking characteristics of patients with oral carcinoma and the risk for second oral primary carcinoma. *J. Am. Dent. Assoc.* 85(3): 637-640, 1972.

Slaga T. J., Gimenez-Conti I. B. An animal model for oral cancer. *J. N. C. I.* 13: 55-60, 1992.

Slatkin D. N., McChesny D. D., Wallace D. W. A retrospective study of 457 neurosurgical patients with cerebral malignant glioma at the Massachusetts General Hospital 1952-1981: implications for sequential trials of postoperative therapy. Nishimura, Tokyo pp 434-446, 1986.

Slatkin D. N. A history of boron neutron capture therapy of brain tumors. *Brain* 114: 1609-1629, 1992.

Slaughter D. P., Southwick H. W., and Smejtal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6: 963-968, 1953.

Smith C. J. Variations in histochemical properties of hydrolytic enzymes in oral precancerous conditions. *J. Dental Res.* 51: 308-318, 1972.

Smith M. D., Setiawan Y., Moore D. E. Optimisation of drug anchor for ortho-carborane in reconstitution of low density lipoproteins for neutron capture therapy. In: Cancer Neutron Capture Therapy, edited by Y. Mishima. New York, Plenum Press, pp 143-150, 1996.

Smith D. R., Chandra S., Coderre J. A., Morrison G. H. Ion microscopy imaging of ^{10}B from p-boronophenylalanine in a brain tumor model for boron neutron capture therapy. Cancer Res. 56: 4302-4306, 1996.

Smith D. R., Chandra S., Coderre J. A. Barth R. F., Yang W., Liu L., Wilson J. L., Micca P. L., Nawrocky M. M., Rotaru J. H., Morrison G. H. Quantitative ion microscopy imaging of Boron-10 in rat brain tumors models for BNCT. In advances in Neutron Capture Therapy. Volume II, Chemistry and Biology (B. Larsson, J. Cranford and R. Weinreich, Eds.) pp. 308-314. Elsevier, Lausanne, 1997.

Smith B. D., and Haffty B. G. Molecular markers as prognostic factors for local recurrence and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. Radiat. Oncol. Invest., 7(3): 125-144, 1999.

Smith D. R., Chandra S., Barth R. F., Yang W., Joel D. D., Coderre J. A. Quantitative imaging and microlocalization of boron-10 in brain tumors and infiltrating tumor cells by SIMS ion microscopy: relevance to neutron capture therapy. Cancer Res. 61 (22): 8179-87. Nov 15, 2001.

Snyder H. R., Reedy A. J., Lennarz W. J. Synthesis of aromatic boronic acids. Aldehyde boronic acids and boronic acid analog of tyrosine. J. Am. Chem. Soc. 80: 835-838, 1958.

Soloway A. H., Hatanaka H., Davis M. A. Penetration of brain and brain tumor. VII. Tumor-binding sulfhydryl boron compounds. J. Med. Chem. 10: 714-717, 1967.

Solt D. B., Polverini P. J., Calderon L. Carcinogenic response of hamster buccal pouch epithelium to 4 polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Oral Pathol. 16: 294-302, 1987.

Spielvogel B. F. Choose a new path: boron biologicals. In: *Biotechnology in the Feed Industry*, edited by T D Lyons, K A Jacques. Nottingham, U K, Nottingham University Press, pp 303-321, 1994.

Sweet W. H., Javid M. The possible use of slow neutrons plus boron-10 in the therapy of intracranial tumors. *Trans. Amer. Neurol. Ass.* 76: 60-63, 1951.

Sweet, W. H., Soloway A. H., Brownell G. L. *Acta Union Int. Contre Cancer* 16: 1216, 1960.

Sweet W. H., Soloway A. H., Brownell G. L. Boron slow neutron capture therapy of gliomas. *Acta Radiol. (Stockh.)* 1: 114-121, 1963.

Taniyama K., Fujiwara H., Kuno T., Saito N., Shuntoh H., Sakane M., Tanaka C. Acute and subacute toxicity of ^{10}B -paraboronophenylalanine. *Pigment. Cell. Res.* 2 (4): 291-6, 1989.

Taylor H. J., and Goldhaber M. Detection of nuclear disintegration in a photographic emulsion. *Nature* 135: 341, 1935.

Tjarks W., Malmquist J., Gedda L., Sjoberg S., Carlsson J. Synthesis and initial biological evaluation of carborane-containing phenanthriferin derivatives. In:

Mishima Y. (ed) *Cancer Neutron Therapy. Proceedings of 6th international symposium on neutron capture therapy for cancer.* Plenum Press, New York, p. 121, 1994.

Treré D., Farabegoli F., Cancellieri A., Ceccarelli C., Eusebi V., Derenzini M. AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labelling and Ki-67 immunostaining. *J. Pathol.* 165(1):53-9,1991.

Tzeng J-J., Barth R. F., Clendenon N. R., and Kartha M: Treatment schedule of combination using radiation and ACNU in the experimental brain tumors. *Neurol. Med. Chir.* 23: 849-855, 1983.

Tzeng J-J., Barth R. F., Orosz C. G., James S. M. Phenotype and functional activity of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from immunogenic and nonimmunogenic rat brain tumors. *Cancer Res.* 51: 2373-2378, 1991.

Van der Schueren E., Van den Bogaert and Ang K. Radiotherapy with multiple fractions per day. In the *Biological Basis of Radiotherapy*. (G. G. Steel, G. Adams, Peckham, Eds.), pp 195-210. Elsevier Science, Amsterdam, 1983.

Wang C. K., Blue T. E., Gahbauer R. A. A neutronic study of an accelerator-based neutron irradiation facility for boron neutron capture therapy. *Nucl. Technol.* 84: 93-107, 1989.

Weinstein I. B., Horowitz A. D., Fisher P. B., Ivanovic V., Gattoni-Celli S., Kirschmeier P. Mechanisms of multistage carcinogenesis and their relevance to tumor cell heterogeneity. En: *Tumor cell heterogeneity: Origins and implications*. Owens A. H., ed. Academic Press, New York. P. 261, 1982.

Wittig A., Sauerwein W., Poller W., Fuhmann C., Hideghety K., Streffer C. Evaluation of boron neutron capture effects in cell culture using sulforhodamine-B assay and a colony assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 73(6): 679-90, 1998.

Woloschak G. E., Chang-Liu, Shearing-Jones P. Regulation of protein kinase C by ionizing radiation. *Cancer Res.* 50: 3963-3967, 1990.

Wong D. T., Gallagher G. T., Gertz R., Chang A. L. C., Shklar G. Transforming Growth Factor (in Chemically Transformed Hamster Oral Keratinocytes. *Cancer Res.* 48: 3130-3134, 1988.

Wynder L., Muschinski M. H., and Spivak J. C. Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. *Cancer* 40: 1872-1878, 1977.

Wyzlic I. M., Tjarks W., Soloway A. H., Anisuzzaman A. K., Rong F. G., Barth R. F. Strategies for the design and synthesis of boronated nuclei acid and protein components as potential delivery agents for neutron capture therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 28 (5): 1203-1213, 1994.

Yanch J. C., Shefer R. E., Hughey B. J., Klinkowstein R. E. *Advances in Neutron Capture Therapy*: Soloway A. H., Barth R. F., Carpenter D. E., Eds.; Plenum Press: New York, p 95, 1993.

Yang W., Barth R., Carpenter D. E., Moeschberger M. L., Goodman J. H. Enhanced delivery of boronophenylalanine for boron neutron capture therapy by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery* 38: 985-992, 1996.

Yang W., Barth R., Rotaru J. H., Moeschberger M. L., Joel D. D., Nawrocky M. M., Goodman J. H. Enhanced survival of glioma bearing rats following boron neutron capture therapy with blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of boronophenylalanine. *Journal of Neuro-Oncology* 33: 59-70, 1997.

Yoshino K., Suzuki A., Mori Y., Kanahana H., Honda C., Mishima Y., Kobayashi T., and Kanda K. Improvement of solubility of p-boronophenylalanine by complex formation with monosaccharides. *Strahlenther. Oncol.*, 165: 127-129, 1989.

Yuan Z. M., Egorin M. J., Rosen D. M., et al. Cellular pharmacology of N1 and N8-aziridinyI analogues of spermidine. *Cancer Res.* 54: 742-748, 1994.

Zahl P. A., Cooper F. S., Dunning J. R. Some in vivo effects of localized nuclear disintegration products on transplantable mouse sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 26: 589-598, 1940.

Zahl P. A., Cooper F. S. Physical and biological considerations in the use of slow neutrons for cancer therapy. *Radiology*, 37: 673-682, 1941.

Zaider M., Wu C. S. In Topics in Dosimetry and Treatment Planning for Neutron Capture Therapy; Zamenhof R. G., Solares G. R., Harling O. K., Eds.; Advanced Medical Publishing: Madison, p 55, 1994.

Zha X., Ausser W.A. and Morrison G.H. Quantitative imaging of radiotherapeutic drug, $\text{Na}_2^{125}\text{I}$ at subcellular resolution in tissue culture using ion microscopy. Cancer Res. 52: 5219-5222, 1992.