



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - FCEyN  
Universidad de Buenos Aires - UBA  
República Argentina

**RADIOBIOLOGÍA DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO  
(BNCT) EN CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS:  
ESTUDIOS BÁSICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO Y ESTUDIOS  
PRECLÍNICOS EN TUMORES ESPONTÁNEOS EN PACIENTES FELINOS**

“Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área de Ciencias Biológicas”

*Autor:*

Lic. Verónica Andrea Trivillin

*Director:*

Dra. Amanda Elena Schwint

*Lugar de trabajo:*

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

Buenos Aires, 2007

**El presente trabajo de tesis dio lugar a la publicación de 6 trabajos en revistas internacionales con referato de pares**

1. Biodistribution of GB-10 ( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ ) compound for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in an experimental model of oral cancer in the hamster cheek pouch. E Heber, VA Trivillin, D Nigg, EL Kreimann, ME Itoiz, R Jiménez Rebagliati, D Batistoni, AE Schwint. Archives of Oral Biology 49: 313-324, 2004.
2. BNCT of 3 Cases of Spontaneous Head and Neck Cancer in Feline Patients. M Rao, VA Trivillin, EM Heber, MA Cantarelli, ME Itoiz, DW Nigg, RJ Rebagliati, D Batistoni, AE Schwint. Applied Radiation and Isotopes 61: 947-952, 2004.
3. Radiobiology of BNCT mediated by GB-10 and GB-10 + BPA in experimental oral cancer. VA Trivillin, EM Heber, ME Itoiz, DW Nigg, O Calzetta, H Blaumann, J Longhino, AE Schwint. Applied Radiation and Isotopes 61: 939-945, 2004.
4. Homogeneous boron targeting of heterogeneous tumors for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT): chemical analyses in the hamster cheek pouch oral cancer model. EM Heber, VA Trivillin, DW Nigg, ME Itoiz, BN González, RJ Rebagliati, D Batistoni, EL Kreimann, AE Schwint. Archives of Oral Biology 51: 922-929 (2006).
5. Therapeutic success of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) mediated by a chemically non-selective boron agent in an experimental model of oral cancer: A new paradigm in BNCT radiobiology. VA Trivillin, EM Heber, DW Nigg, ME Itoiz, O Calzetta, H Blaumann, J Longhino, AE Schwint. Radiation Research 166: 387-396 (2006).
6. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for the treatment of spontaneous nasal planum Squamous Cell Carcinoma in felines. VA Trivillin, EM Heber, M Rao, MA Cantarelli, ME Itoiz, DW Nigg, O Calzetta, H Blaumann, J Longhino, AE Schwint. Radiation and Environmental Biophysics (en prensa).

**RADIOBIOLOGÍA DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS:  
ESTUDIOS BÁSICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO Y ESTUDIOS PRECLÍNICOS  
EN TUMORES ESPONTÁNEOS EN PACIENTES FELINOS**

**RESUMEN**

La Captura Neutrónica en Boro (BNCT) combina la irradiación externa con neutrones y la administración de compuestos borados que se acumulan selectivamente en el tumor. La reacción de captura  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$  que ocurre entre los neutrones térmicos y el átomo de Boro 10 genera partículas pesadas letales y de corto alcance se producirá mayormente en las células tumorales. Esta modalidad terapéutica permitiría dañar los tejidos tumorales sin producir daño significativo al tejido normal.

Se estudió la biología y radiobiología del BNCT en el modelo de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster. Estudiamos la biodistribución de boro en sangre, tumor y tejidos normales empleando nuevos protocolos de administración de compuestos borados estándar y compuestos borados nuevos, administrados solos o en combinación (BPA y/o GB-10 [ $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ ]) y demostramos su potencial terapéutico en el modelo de cáncer oral en hámster. Una vez demostrado el potencial terapéutico de estos protocolos de administración de compuestos borados, hicimos estudios de BNCT *in vivo*, empleando el haz epitérmico termalizado del Reactor Nuclear RA-6, sito en el Centro Atómico Bariloche. Demostramos la eficacia terapéutica, sin radiotoxicidad del tejido normal, de bajas y altas dosis de BNCT mediado por GB-10 y (GB-10 + BPA), y demostramos un nuevo paradigma en BNCT basado en el efecto selectivo sobre tumor de la terapia mediada por un compuesto borado que no se incorpora selectivamente al tumor.

Habiendo demostrado que el BNCT-BPA induce control tumoral en Carcinoma de Células Escamosas (CCE) experimental en la bolsa de la mejilla del hámster sin daño al tejido normal, en un escenario preclínico, demostramos la eficacia terapéutica de BNCT para el tratamiento de CCE espontáneos en felinos domésticos.

**Palabras Clave:** BNCT, cáncer oral, carcinoma de células escamosas, CCE, bolsa de la mejilla del hámster, compuestos borados, BPA, GB-10, CCE espontáneos en felinos, Captura Neutrónica en Boro.

**RADIOBIOLOGY OF BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY (BNCT) IN SQUAMOUS  
CELL CARCINOMA:  
BASIC RESEARCH IN AN IN VIVO EXPERIMENTAL MODEL AND PRECLINICAL STUDIES IN  
SPONTANEOUS TUMORS IN FELINE PATIENTS**

**ABSTRACT**

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) combines external irradiation with neutrons and the administration of boron compounds that accumulate selectively in tumor cells. The capture reaction  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$  that takes place between thermal neutrons and  $^{10}\text{B}$ , giving rise to short range, lethal heavy particles, will occur mainly in tumor cells. This treatment modality would target tumor tissue selectively with no significant damage to normal tissue.

We studied the biology and radiobiology of BNCT in the hamster cheek pouch oral cancer model. Biodistribution studies were performed to evaluate absolute and relative boron concentrations in blood, tumor and normal tissues employing new administration protocols of standard and new boron compounds, administered alone or jointly (boronophenylalanine [BPA] and/or GB-10 [ $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ ]). Having demonstrated the therapeutic potential of these boron compound administration protocols in the hamster cheek pouch oral cancer model, we performed in vivo BNCT studies employing the thermalized epithermal beam of the RA-6 Nuclear Reactor (Bariloche Atomic Center). We demonstrated the therapeutic efficacy with no normal tissue radiotoxicity of BNCT mediated by GB-10 and (GB-10 + BPA). Moreover, we demonstrated a new paradigm in BNCT based on the selective effect on tumor of BNCT mediated by a compound that is not selectively incorporated by tumor.

Having shown that BNCT-BPA induces tumor control in experimental Squamous Cell Carcinoma (SCC) in the hamster cheek pouch with no radiotoxicity in normal tissue we demonstrated, in a preclinical scenario, the therapeutic efficacy of BNCT for spontaneous SCC in feline patients.

**Key words:** BNCT, oral cancer, squamous cell carcinoma, SCC, hamster cheek pouch, boron compounds, BPA, GB-10, spontaneous SCC in felines, Boron Neutron Capture Therapy

## **AGRADECIMIENTO**

No es fácil expresar con palabras lo que siento con el corazón. Es mucha la gente a quien quiero agradecer porque cada una de ellas contribuyó a que yo hoy pueda estar concretando esta tesis. Esta lista está seguramente incompleta y quisiera disculparme si por un olvido involuntario no lo mencioné.

A Mandy por todo. Porque como directora me enseñó un montón pero como persona me enseñó mucho más. Porque la siento mi amiga y hasta casi una madre que me escucha y aconseja y me da tanto cariño y comprensión. Porque la quiero tanto que me cuesta agradecerse.

A mi mamá que hizo un gran esfuerzo para que yo hoy pueda estar aquí. Aunque ahora esté lejos siempre siento su cariño y apoyo. Te quiero mucho mami y sé que para vos es un logro y te lo mereces.

A mis hermanos Sandra y Rodrigo, que los quiero un montón y sé que valoran este logro y que están muy cerquita mío a la distancia.

A mi familia política que la quiero como propia, y que valoro muchísimo todo el apoyo y cariño que me dan, a Lula, María, Lolita, Marta, Miguel, Male, Merce, Nico, Euge, Joaquín y hasta el Tano. Pero sobre todo quiero agradecerles a Luchy y Jorge, mis suegros que son como mis papis, porque me cuidan, me ayudan, me valoran, me alientan y están siempre que los necesito ... Ni que decir que como abuelos son unos ídolos.

A todos mis sobrinos, que los quiero tanto.

A Lisien por brindarme todo su apoyo y dedicación para escribir esta tesis y hacerme sentir que para ella era un placer. Porque es un placer trabajar junto a ella y sentir que somos un equipo. Por su calidez y dulzura.

A Mariel por sus consejos, enseñanza y apoyo pero sobre todo por su increíble ternura y cariño.

Al Dr. Cabrini por su cariño y su calidez para conmigo.

A Erica que pensó en mi como su descendencia y me alentó y apoyó para que me presentara al concurso de beca. Porque sin su punta pie inicial nada de esto hubiese ocurrido y siempre le voy a estar agradecida.

A Romi, Andrea y Emiliano por su frescura, porque es lindísimo trabajar junto a ustedes, porque me divierto y aprendo muchísimo. Porque los quiero un montón y somos un grupo genial.

A Mónica, por su cariño, ternura y estar siempre dispuesta a ayudar. Por brindar ese apoyo incondicional. Por las pequeñas cosas que hacen ver lo grande que es.

A Euge por hacerme sentir su cariño, por compartir desayunos, almuerzos y muchas cositas más.

A Coco por mimarme y ocuparse de mí como una hija.

Al Dr. Pisarev por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por su apoyo y calidez.

A la gente que comparte conmigo el día a día, los almuerzos, las anécdotas, las cosas de la vida cotidiana y hacen que cada día uno tenga ganas de seguir. A Betty con sus historias de vida y por siempre brindarme su consejo (hasta pediátrico), a Hebe por todo su apoyo y las interminables charlas sobre nuestros hijos, a Ire con sus consejos médicos, a Mary que hace que las mañanas sean tan cálidas con ese olorcito a café recién hecho, a Giselle y tantas tortas compartidas, a Daniel, a Omar, a Cande, a Ivana, a Lucía ... y seguro esta lista me quedó incompleta.

A Sara Liberman por luchar para que el proyecto de BNCT siga adelante. Por tenerme tanta paciencia y consideración.

A Beatriz González por estar siempre bien dispuesta a brindar su apoyo en el análisis estadístico aunque caigamos al final del experimento.

A David Nigg por su gran colaboración y apoyo y, pese a la distancia, siempre estar a nuestro lado tirando de la misma soga. Porque nunca me hizo sentir mal por mi limitación en el idioma y él cada día habla mejor castellano.

A Ramón porque para mí es un referente a quien quiero y respeto. Y a pesar que lo considero un tipo joven no dejo de tratarlo de usted.

A Daniel por ser muchas veces el clon de Vero en el bioterio y hacer que las cosas sean más fáciles para mí.

A Jorge “Ruperto” porque es un ídolo a quien quiero mucho.

Al grupo de Bioquímica Nuclear: a León (por las peleas pero también por brindarme su ayuda cuando la necesité), a Lisa, a Ale (por sus charlas de pasillo y momentos compartidos), a Guillermo y a Soria.

A todos los profesionales que me brindaron su expertise, su ayuda y su calidez humana para poder llevar adelante esta tesis. A Osvaldo Calzetta, Herman Blaumann, Juan Longhino y todo el personal técnico del Centro Atómico Bariloche (RA-6). Al Dr. Batistoni a quién siempre recordaré con mucho cariño, a Raúl, Susana y el ICP. Al Dr. Andres Kreiner. A Sarita y Gustavo. A la gente del RA-1, Hugo Scolari, Eduardo Porro, Jorge, Carlos, Beto, Fernando y tantos más.

A la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología, donde siempre me sentí tan a gusto y hacen que las cosas parezcan más fáciles...toda mi gratitud y cariño a Mariel, Romi, Victor, Alicia, Maria Luisa, Tammy, Daniel, Sandra, Ana, Betty Gu, Maria Julia...

A mis hijos Cami, Luli y Lauti que los amo con todo mi corazón y son la alegría de mi vida.

A Diego porque sin tu amor y apoyo no hubiese podido lograrlo. Porque valoras lo que hago y te siento a mi lado luchando juntos. Porque Te Amo!!!

A DIEGO Y A NUESTROS TRES HIJOS  
CAMI, LULI Y LAUTI

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. <b>Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT)</b>	<b>1</b>
2. <b>Compuestos de Boro</b>	<b>3</b>
3. <b>BPA, BSH y GB-10</b>	<b>6</b>
4. <b>Nuevos compuestos borados</b>	<b>9</b>
5. <b>Neutrones térmicos</b>	<b>13</b>
6. <b>Radiobiología del BNCT</b>	<b>15</b>
7. <b>Estudios clínicos: breve reseña histórica del BNCT</b>	<b>20</b>
8. <b>Modelo de cáncer oral: Bolsa de la mejilla del hámster</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
1. <b>Inducción de Tumores en la Bolsa de la Mejilla del Hámster</b>	<b>40</b>
2. <b>Preparación de compuestos borados</b>	<b>40</b>
3. <b>Estudios de biodistribución</b>	<b>41</b>
4. <b>Procesamiento de muestras para medición de contenido de boro por Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivo (ICP-OES)</b>	<b>44</b>
5. <b>Valoración de Boro por Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivo (ICP-OES)</b>	<b>45</b>
6. <b>BNCT in vivo</b>	<b>51</b>
7. <b>Seguimiento post – BNCT</b>	<b>58</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>60</b>
1. <b>Estudio de biodistribución</b>	<b>60</b>
2. <b>Protocolo alternativo de administración de GB-10</b>	<b>62</b>
3. <b>Estudio de la incorporación de boro en función de la viabilidad tumoral</b>	<b>62</b>
4. <b>Protocolo de administración combinada de GB-10 + BPA</b>	<b>62</b>
5. <b>Estudio del grado de homogeneidad en la incorporación de boro en tumores heterogéneos</b>	<b>68</b>
6. <b>Estudios de BNCT in vivo con baja dosis de irradiación</b>	<b>68</b>
7. <b>Respuesta del tejido precanceroso y normal</b>	<b>71</b>

<b>8. Análisis histológico</b>	<b>72</b>
<b>9. Estudios de BNCT in vivo con alta dosis de irradiación</b>	<b>73</b>
<b>10. Respuesta del tejido precanceroso y normal</b>	<b>76</b>
<b>11. Análisis histológico</b>	<b>77</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>80</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO: Estudio preliminar de BNCT en cáncer de cabeza y cuello espontáneo en pacientes felinos: un acercamiento preclínico.</b>	<b>96</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>116</b>

# INTRODUCCIÓN

## 1. Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT)

La terapia por Captura Neutrónica en Boro (Boron Neutron Capture Therapy o BNCT) constituye una aplicación de la tecnología nuclear al área biomédica que combina la irradiación externa con neutrones y la administración de compuestos borados que se acumulan selectivamente en el tumor. Es una modalidad de tratamiento binario que se basa en el concepto publicado por primera vez por Gordon Locher (1936). El isótopo estable del boro,  $^{10}\text{B}$ , interactúa con neutrones de baja energía (neutrones térmicos de  $<0.4$  eV) desencadenando una reacción de captura que da lugar a la formación de un átomo de  $^{11}\text{B}$  que se escinde en  $10^{-12}$  seg generando una partícula alfa ( $^4\text{He}$ ) y un núcleo de  $^7\text{Li}$  de alta transferencia lineal de energía (LET) y rango corto (5 a 10 micrómetros) (Coderre y Morris, 1999).

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 (que contendrían menor cantidad de boro que las células tumorales) en las cuales no se produce (o se produce en mucho menor grado) la reacción de captura. El LET es una medida de 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 o gamma usados normalmente en radioterapia (Gabel D y col., 1984).

La estrategia consiste en administrar compuestos borados que sean incorporados selectivamente a las células tumorales y cuyo contenido en las células normales y en la sangre sea significativamente menor. De esta manera, la reacción de captura que ocurre entre los neutrones térmicos y el átomo de  $^{10}\text{B}$  para generar partículas pesadas letales y de corto alcance se producirá mayormente en las células tumorales. Esta modalidad terapéutica permitiría dañar los tejidos tumorales sin producir daño significativo al tejido normal. Para que el BNCT sea exitoso se deben localizar un gran número de átomos de  $^{10}\text{B}$

(aproximadamente  $10^9$  átomos/célula) en las células neoplásicas (alrededor de 30  $\mu\text{g}/\text{gr}$  de tejido ó 30 ppm) y un número suficiente de neutrones térmicos deben ser absorbidos por los átomos de  $^{10}\text{B}$  para desencadenar la reacción letal  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$  (Barth RF y col., 1990).

Es muy importante conocer el contenido de boro para realizar los cálculos dosimétricos previos al BNCT. Para ello es conveniente realizar un estudio de biodistribución. Este estudio consiste en administrar el o los compuestos borados por vía intravenosa o intraperitoneal como infusión o en bolo según como se lo/los utilice en la terapia. Desde el inicio del protocolo de administración hasta varias horas después se toman muestras de sangre y, si es posible, muestras de tumor y tejido normal y se analiza la concentración de boro. 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. Estos estudios también permiten determinar el tiempo óptimo post-administración en el cual se logra la mayor concentración de boro en tumor asociada a buenas relaciones respecto a los tejidos normales y la sangre. Previo a y durante la irradiación se pueden verificar algunos valores de concentración en sangre pero la tecnología aún no permite medir en forma no invasiva, “on-line”, los valores de boro en tejidos normales y tumor. Lo que se hace en estos casos es considerar las relaciones tumor/sangre y tumor/tejido normal obtenidas en la biodistribución previa (Gonzalez SJ y col., 2004).

El BNCT constituye un tipo de terapia que ha sido denominada “binaria”, por el hecho que el resultado terapéutico se obtiene al combinar dos componentes, que por separado no serían suficientes para generar el efecto buscado. Cada componente resulta relativamente inocuo para la célula, pero su combinación genera un efecto citotóxico altamente letal. Otros ejemplos de este tipo de terapia son aquellas que combinan radiación con el uso de sensibilizadores (Kennedy KA y col., 1987), terapia de activación por fotones (Amaldi U y col., 1994; Laster BH 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 conseguir la destrucción selectiva y específica de las células tumorales resguardando las células normales. Una de

las ventajas de este sistema binario, es que cada componente puede ser manipulado independiente, y solamente cuando el tiempo es el adecuado para lograr el máximo efecto citotóxico sobre las células malignas, compatible con la radiotolerancia del tejido normal contiguo, los dos componentes son superpuestos.

El BNCT fue pensado primariamente para tumores de cerebro, ya que los gliomas de alto grado y especialmente los glioblastoma multiforme (GBM) son extremadamente resistentes a las formas terapéuticas convencionales como la cirugía, quimioterapia y radioterapia y la tasa de supervivencia a 5 años es prácticamente nula (Berger MS, 1994; Gutin PH y Posner JB, 2000; Parney IF y Chang SM, 2005). Sin embargo, actualmente esta terapia se encuentra en ensayo clínico en el mundo para tumores de cerebro y melanoma y, más recientemente, para tumores de cabeza y cuello y metástasis de hígado (Barth RF y col., 2005).

## **2. 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 GL, 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  ${}^6\text{Li}$ ,  ${}^{10}\text{B}$ ,  ${}^{157}\text{Gd}$ ,  ${}^{235}\text{U}$  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  ${}^{235}\text{U}$  radioactivo como un posible nucleído (Frigerio NA y col., 1958). Los productos de fisión eran

adecuados pero en general los compuestos del uranio son tóxicos y además poco estables en medios biológicos (Ej.: uranyl-protoporfirina).

El gadolinio ( $^{157}\text{Gd}$ ) presenta la más alta sección de captura de los neutrones térmicos de todos los nucleídos estables. La reacción de captura del  $^{157}\text{Gd}$  produce electrones de conversión interna (IC) y electrones Auger y Coster-Kronig (ACK) de alta transferencia lineal de energía y relevancia biológica. La idea de usar  $^{157}\text{Gd}$  como agente de captura del NCT fue formulada en los 80s como una alternativa similar a la terapia con  $^{10}\text{B}$ . Sin embargo no tuvo mucho éxito ya que no se logró que los compuestos con Gd llegaran al núcleo celular, requisito indispensable ya que para que los electrones ACK induzcan muerte celular en el momento de la captura neutrónica, el Gd debe estar en las proximidades del DNA, es decir, en el núcleo de la célula (Martin RF y col., 1988; Laster BH y col., 1996).

Otro nucleído considerado fue el  $^6\text{Li}$  no radioactivo (Zahl PA y col., 1940). 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  $^6\text{Li}$  en condiciones biológicas se escinde inmediatamente en cationes de Litio.

El  $^{10}\text{B}$  no radioactivo utilizado en BNCT es similar al  $^6\text{Li}$  en cuanto a los productos de fisión (Kruger PG y col., 1940; Sweet WH y col., 1951). Una clara ventaja del  $^{10}\text{B}$  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 estas razones, el  $^{10}\text{B}$  fue seleccionado para desarrollar numerosos compuestos portadores de  $^{10}\text{B}$  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  $30 \mu\text{g}^{10}\text{B/g}$  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 AH y col., 1967).
- La microlocalización del compuesto borado debe favorecer el daño a los blancos subcelulares tumorales más radiosensibles.

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 LE y col., 1954b; Farr LE y col., 1954c; Locksley HB 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 tres compuestos desarrollados posteriormente han sido aprobados hasta la fecha para su uso en pacientes: borofenilalanina (BPA), mercaptoundecahydrododecarborato (BSH) y GB-10 ( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ ). 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 ensayos clínicos 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; Busse P y col., 2003),

Finlandia, Suecia y Japón (Joensuu H y col., 2003; Capala J y col., 2003; Mishima Y y col., 1989) y desde 2003 en la Argentina (Gonzalez SJ y col., 2004). En el caso del GB-10 se probó su ausencia de toxicidad en perros (Stelzer KJ y col., 2001) y en 15 voluntarios con glioblastoma multiforme o con un tipo de cáncer de pulmón en quienes se llevó a cabo un estudio de farmacocinética en la universidad de Washington (Diaz A y col., 2002).

### **3. BPA, BSH y GB-10**

El BPA es un derivado del aminoácido fenilalanina y es capaz de llevar cantidades absolutas significativas de  $^{10}\text{B}$  al tumor con una buena relación tumor/tejido normal y tumor/sangre. Fue sintetizado a fines de 1950 (Snyder HR 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 (Ej. Coderre J y col., 1990). 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 JA y col., 1987; Taniyama K y col., 1989).

Este compuesto se propuso inicialmente 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 JA y col., 1999a). El transporte trans-membrana del

BPA ocurriría via el sistema de transporte de L-aminoácidos y ocurriría más activamente en células con un índice metabólico más elevado (Wittig A y col., 2000). Se ha comparado la distribución de BPA y de tirosina tritiada (el verdadero precursor de la melanina) en ratones portadores de melanoma (Coderre JA 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  $^{10}\text{B}$  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 (melanoma y glioblastoma multiforme) 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 JA 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 (Coderre JA 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 predominantemente necróticas de los tumores. .

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 DD y col., 1999). Sería importante considerar estos hallazgos dado que la mayoría de 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 DR y col., 2001).

El BSH ha sido utilizado para el tratamiento de tumores cerebrales en Japón. 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 AH 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). 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 JP y col., 1998; Neumann M y col., 2000). El GB-10 al igual que el BSH no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo tanto no se esperaría que se acumule selectivamente en un tumor de un órgano que no esté protegido por ella. El GB-10 ha sido propuesto como agente borado para BNCT de tumores de tejidos protegidos por la barrera hematoencefálica y para Terapia por Neutrones Rápidos potenciada por BNCT (FNT/BNCT). El GB-10, al ser un agente difusivo que en solución acuosa forma el anión  $(B^{10}H^{10})^{-2}$ , se distribuye homogéneamente en todas las poblaciones tumorales (Laramore GE y col., 2001).

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 BD y col., 1992; Bennet BD y col., 1994; Chandra S y col., 1997) e in vivo, en tejidos de ratas inyectadas con BPA (Smith DR. y col., 1996; Smith DR. 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. (1992) encontraron menor contenido de boro en el núcleo que en el citoplasma, mientras que en otro estudio realizado por Chandra y col. (1997) se encontró una distribución uniforme del mismo. En tejido de glioblastoma humano Otersen y col. (1997) describieron la presencia de boro en el núcleo y también en el citoplasma unido fuertemente a estructuras celulares. Según Haselsberger y col. (1994) el boro del BSH en dicho tejido se localizaría solamente en el núcleo.

#### **4. 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 BF, 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 prácticamente 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 FG y Soloway A, 1994), aminoácidos que pueden ser incorporados a proteínas tumorales (Wyzlic IM 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 pueden mencionar las lipoproteínas de baja densidad (LDLs) (Smith MD 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 portadores de compuestos borados (Hawthorne MF, Shelly K, 1997).

**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 Tiourea.
- d. Aminas.

**8. Depresores del sistema nervioso.**

- a. Promazinas.
- b. Barbitúricos, Hidantoína.

---

**Tabla 1:** Compuestos de boro de tercera generación. Fuente: Chemical Reviews, June 1998, volume 98, number 4. Published by the American Chemical Society

Otras estrategias llevaron al desarrollo de porfirinas boradas (Kahl SB y Koo MS, 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 (Dougherty TJ, 2002; 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; Kahl SB y col., 1990; Hill JS y col., 1992) e in vitro (Fairchild RG 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. (1999), utilizando una protoporfirina borada (BOPP). En nuestro laboratorio se realizaron estudios de biodistribución con una porfirina borada (CuTCPh) en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster, logrando excelentes relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre, sin aparente toxicidad (Kreimann EL y col., 2003).

Entre las moléculas de unión al ADN se han desarrollado intercaladores de ADN (Sjoberg S y col., 1997), radiosensibilizadores (Scobie M y Threadgill MD, 1992) y ciertos análogos de poliaminas boradas. Su incorporación preferencial a las células tumorales (Holley JL y col., 1992) se debería a una sobre-expresión del sistema de transporte de poliaminas (Yuan ZM 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  $^{10}\text{B}$  ( $n, \alpha$ )<sup>7</sup> Li. Además, dichos compuestos serían capaces de entregar boro a las células en proliferación y también a células quiescentes del tumor (Marton LJ 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 RF 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 RF 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 RH 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; Barth RF., 2004). 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 (por ejemplo con distinto grado de actividad metabólica) y mejorar las relaciones y valores absolutos de boro obtenidos hasta la fecha.

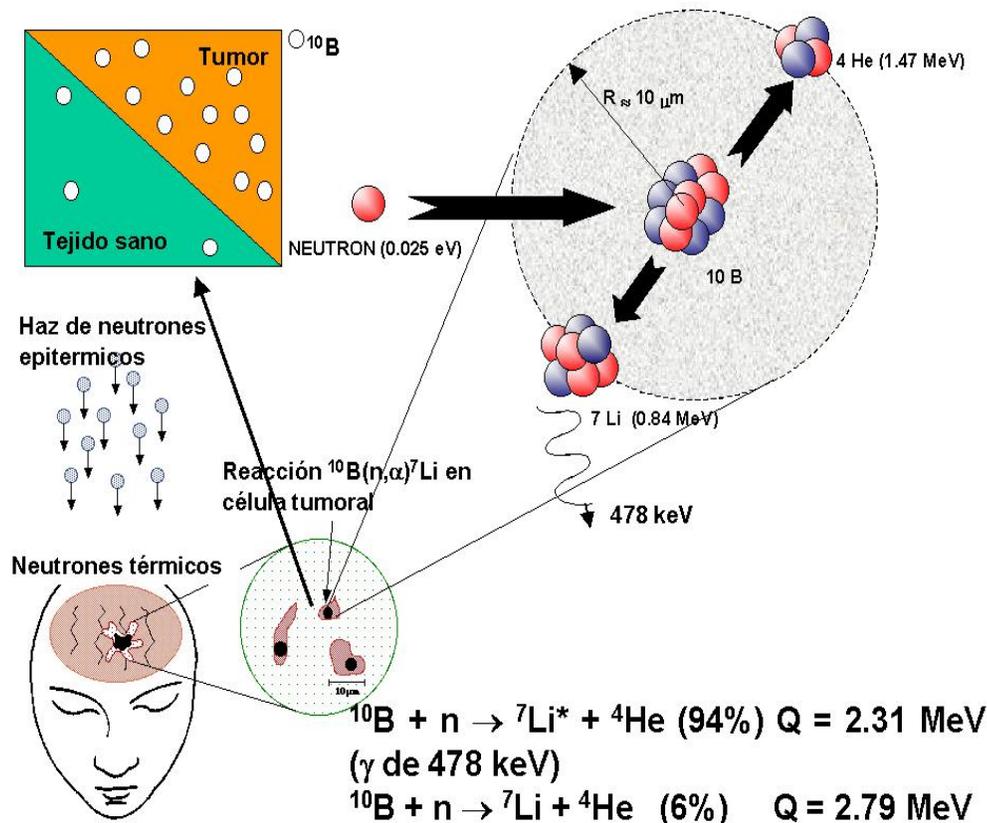
## 5. Neutrones térmicos

Los neutrones térmicos por sí mismos no producen daño significativo 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., 1995). Solo cuando los neutrones térmicos se combinan con el  $^{10}\text{B}$  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 WH 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 provienen de reactores nucleares, 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). La irradiación se realiza a calota abierta y la masa cerebral se expone directamente al haz incidente (irradiación intraoperatoria). En una primera etapa se realiza una cirugía para extirpar la masa tumoral mayor. En un segundo paso, se trata el tumor remanente por BNCT a calota abierta. 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 RL y col., 1997). Cabe recordar que la reacción de captura siempre se produce con neutrones térmicos, no con neutrones epitérmicos (Esquema 1).



**Esquema 1:** 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. Varios reactores con muy buena calidad de haces de neutrones han sido desarrollados y son utilizados para aplicaciones clínicas. 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); República Checa (LVR-15) y Argentina (RA - 6).

La fluencia de neutrones necesaria para la terapia de BNCT es del orden de  $10^{12}$  -  $10^{13}$  n/cm<sup>2</sup>. Hasta la fecha esta fluencia sólo ha sido generada a partir de reactores nucleares por un proceso de fisión. En la actualidad se encuentran en desarrollo aceleradores de

partículas de baja energía capaces de generar neutrones para BNCT, que podrían ser instalados en hospitales.

La tecnología de aceleradores para BNCT ya ha llegado a un nivel de desarrollo que permitiría su implementación (Allen DA y col., 1995; Wang CK. y col., 1989; Burlon AA y col., 2001; Burlon AA y col., 2004). Sin embargo, hasta la fecha, no se encuentra en operación un acelerador con la calidad de haz comparable al MITR, que pueda ser ubicado en un hospital y que tenga una corriente de suficiente magnitud para tratar pacientes en menos de 30 minutos.

Tanto los aceleradores como los reactores necesitan un moderador para reducir la energía de los neutrones a un rango epitérmico. Los haces de neutrones tienen un espectro de energía, y están “contaminados” por radiación gamma no deseada. Un requerimiento básico del BNCT es que la dosis entregada no exceda la tolerancia del tejido normal. Esto se aplica al diseño de los haces de neutrones, la selección de compuestos borados, la elaboración de los protocolos de tratamiento, así como a la planificación del tratamiento (Barth RF y col., 2005).

## **6. Radiobiología del BNCT**

La terapia por captura neutrónica (BNCT) produce un conjunto 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  $\mu\text{m}$ , LET: 196 keV/ $\mu\text{m}$  generadas por la reacción de captura del neutrón térmico en el  $^{10}\text{B}$ .

3. Partículas de Litio de 0,84 MeV, rango 5  $\mu\text{m}$ , LET: 162 keV/ $\mu\text{m}$  generadas por la reacción de captura del neutrón térmico en el  $^{10}\text{B}$ .
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, a igual relación tumor/tejido normal y tumor/sangre, será más ventajoso tener mayores cantidades absolutas de boro. Esto se debe a que un mayor contenido de boro en tumor permite disminuir el tiempo de exposición al haz de neutrones, reduciendo así la dosis inespecífica a los tejidos normales (Coderre JA 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 GM 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 RBE y 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 borado en particular (Coderre JA 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.

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 GM 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 “Radiobiology of Neutron Capture Therapy” en Oxford, Reino Unido, 29-31

Marzo, 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).

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

**Tabla 2:** Valores de RBE y CBE para diferentes tejidos. <sup>a</sup> Determinado por ensayo clonogénico in vivo/ in vitro del gliosarcoma 9 L de rata (Coderre JA y col., 1993), <sup>b</sup> 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 GM y col., 1994; Coderre JA y col., 1995), <sup>c</sup> determinado por BNCT con neutrones térmicos de melanoma cutáneo de pacientes (Fukuda H y col., 1996), <sup>d</sup> 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 PR y col., 1992; Huiskamp R y col., 1996), <sup>e</sup> determinado en piel de perros utilizando el haz epitérmico de neutrones de BMRR (Gavin PR. y col., 1992).

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

**Tabla 3:** Dosis para el control del glioblastoma en humanos y dosis a cerebro normal con terapias convencionales. \* (Masciopinto JE y col., 1995). \*\* (Buchholz TA 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-Eq y la dosis mínima fue de 20-30 Gy-Eq (Coderre JA 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 volumen de tratamiento (“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.

## **7. Estudios clínicos: breve reseña histórica del BNCT**

Los ensayos clínicos de la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) se iniciaron en el año 1951 en el Brookhaven National Laboratory (BNL) (EE.UU.) por Sweet y col. (1951), Javid y col. (1952) y Farr y col. (1954a, 1954b, 1954c) para el tratamiento de tumores malignos de cerebro usando borax y pentaborato de sodio como transportadores 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 WH y col., 1963; Asbury AK y col., 1972). La falta de eficacia terapéutica fue atribuida a la pobre penetración de los neutrones térmicos en los tejidos y a la falta de selectividad de los compuestos borados (Sweet WH, 1997; Slatkin DN y col., 1991; Slatkin DN y col., 1986).

Los trabajos fueron reanudados posteriormente en el año 1968 en Teikyo University (Japón) por el Dr H. Hatanaka , discípulo de Sweet, con modificaciones del

protocolo empleado por Sweet en los años 1960-1961. Utilizando el compuesto borado BSH (mercaptoundecahydrododecaborato o borocaptato de sodio) que mejora la relación tumor a sangre, inició un ensayo clínico de BNCT para el tratamiento de tumores cerebrales, tratando más de 150 pacientes con una combinación de cirugía y BNCT. Los resultados fueron 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). El uso de un haz de neutrones térmicos limita la profundidad de penetración. Por tal motivo, para el tratamiento de tumores de cerebro se removió la piel y la calota exponiendo directamente el cerebro a la irradiación. Esto elimina el daño por radiación en los tejidos sanos superficiales, pero implica un mayor riesgo para el paciente durante la irradiación. Esta es la mayor diferencia entre el procedimiento llevado a cabo por Hatanaka y Nakagawa en esa época y los protocolos de BNCT que han sido empleados en EE.UU. y Europa, donde usan haces de neutrones epitérmicos, que tienen mayor penetración, y no requieren la resección de la calota en el momento de la irradiación. Esto ha hecho difícil comparar directamente los resultados clínicos de los grupos japoneses con los obtenidos en los otros casos. Recientemente los grupos japoneses comenzaron a usar haces de neutrones epitérmicos y haces mixtos (Miyatake SI y col., 2004). Otro problema de los estudios realizados en Japón radica en que no se encuadraron dentro de protocolos estrictamente diseñados y comparables. Los ensayos clínicos en Japón se orientaron a brindar la mejor opción terapéutica a cada paciente, independientemente de un protocolo científico pre-establecido. Por lo tanto no fue posible sacar conclusiones definitivas respecto de la eficacia del tratamiento en estos pacientes.

Ensayos clínicos en pacientes con tumores de cerebro fueron iniciados en varios lugares, incluyendo (a) el BMRR (Brookhaven Medical Research Reactor) en BNL desde 1994 a 1999 para glioblastoma multiforme (GBM) usando BPA con una o dos irradiaciones de neutrones, suministrada en días consecutivos (Bergland R y col., 1996; Chanana AD y col., 1999); (b) el MiTR desde 1996 a 1999 para GBM y melanoma intracraneal (Busse P y col., 2001; Busse P y col., 2003; Palmer MR y col., 2002); (c) el High Flux Reactor, Petten, Holanda, en colaboración con la Universidad de Essen en Alemania en 1997, usando BSH (Wittig A y col., 2002), (d) el FiR1 en el Hospital Central de la

Universidad de Helsinki (Joensuu H y col.,2003) en 1999 al presente, (e) el Studsvik Reactor facility en Suecia desde el 2001 con interrupciones, implementado por el grupo nacional de Suecia de Neuro-Oncología (Capala J y col., 2003), y (f) el Nuclear Research Institute Reactor en Rez, República Checa, usando BSH (Burian J y col., 2002). El número de pacientes tratados en este último estudio es pequeño y el seguimiento es todavía bastante corto.

El volumen de tejido irradiado es un factor determinante en el desarrollo de efectos colaterales (Flickinger JC y col., 2000). A medida que progresaban los ensayos de BNL y Harvard/MIT, la dosis promedio en el cerebro y la incidencia de somnolencia aumentaron significativamente. Dosis promedio a cerebro total de  $>5.5$  Gy-Eq. estuvieron asociadas a somnolencia en el ensayo realizado por BNL pero no en todos los pacientes de Harvard/MIT (Coderre JA y col., 2003; Diaz AZ, 2003; Busse P y col., 2001; Busse P y col., 2003). Los ensayos de BNL y Harvard/MIT se completaron en 1999. Ambos estudios resultaron en tiempos de supervivencia promedio e índices de supervivencia a 1 año comparables con la terapia convencional con fotones externos (Curran WJ y col., 1993). Si bien ambos fueron ensayos de fase I para evaluar la seguridad de la escalada de dosis como “end point” primario para radiotoxicidad, los “end points” secundarios fueron calidad de vida, tiempo hasta que progresa la enfermedad y supervivencia en general. Los tiempos de supervivencia media para los 53 pacientes del ensayo de BNL y 18 pacientes con GBM del ensayo de Harvard/MIT fueron 13 y 12 meses respectivamente. Después de la recurrencia la mayoría de los pacientes recibió alguna terapia paliativa que eventualmente prolongó la supervivencia. La calidad de vida para la mayoría de los pacientes de BNL fue muy buena, en especial considerando que el tratamiento se dio en 1 o 2 fracciones en días consecutivos.

El equipo clínico del Hospital Central de la Universidad de Helsinki y el VTT (Technical Research Center of Finland) ha reportado 18 pacientes usando BPA como agente de captura (290 mg/kg infundidos en 2 hs.) con dos campos de irradiación y una dosis promedio al cerebro total en el rango de 3 a 6 Gy-Eq. (Joensuu H y col.,2003). La supervivencia estimada de un año fue 61%, muy similar a los resultados de BNL. Estos ensayos han continuado y la dosis de BPA ha sido escalada a 450 mg/kg y 500 mg/kg infundidos en 2 hs. Como el BNCT puede entregar una dosis significativa a tumor con una

relativamente baja dosis promedio a cerebro, este grupo también ha iniciado un ensayo clínico en pacientes que tienen GBM recurrente, después de haber recibido terapia de fotones completa. En este protocolo, por lo menos tienen que haber transcurrido 6 meses de finalizada la terapia con fotones para realizar el BNCT y el pico de dosis a cerebro debería ser  $<8$  Gy-Eq. y la dosis promedio a cerebro total  $<6$  Gy-Eq. Investigadores en Suecia, han llevado a cabo un estudio usando BPA y un haz de neutrones epitérmicos en Studsvik Medical AB Reactor (Capala J y col., 2003). Este estudio se diferenció significativamente de todos los ensayos clínicos previos ya que la cantidad de BPA total administrada fue incrementada a 900 mg/kg, infundida i.v. en 6 hs. Este estudio se basó en datos experimentales realizados *in vitro*, donde se observó que se requerían varias horas para que la célula se cargara totalmente de BPA (Wittig A y col., 2000), y en un modelo de gliosarcoma en ratas donde se incrementaba la concentración absoluta de boro al tumor con infusiones i.v. de largo tiempo de BPA, mientras que la relación tumor/sangre permanecía constante (Joel DD y col., 1999; Morris GM y col., 2002). Sin embargo, lo más importante de las infusiones largas de BPA sería la captación de boro de células infiltrantes tumorales que se encuentran a distancia del tumor principal (Smith DR y col., 1996; Smith D y col., 2001). Los tiempos largos de infusión con BPA han sido bien tolerados (Capala J y col., 2003), y el tiempo de sobrevida medio preliminar para 17 pacientes de este ensayo fue de 18 meses, que es significativamente mayor que el obtenido en los ensayos de BNL y Harvard/MIT. Todos los pacientes fueron tratados con dos campos y las dosis promedio a tumor fueron 3 a 6 Gy-Eq., que fue menor que la mayor de las dosis finales usadas en el ensayo de Brookhaven National Laboratory. Sin embargo el pico de dosis fue  $<15$  Gy-Eq., que fue similar al que se usó en BNL. Como los pacientes suecos con GBM que tuvieron recurrencia no fueron sujetos a otras terapias paliativas, los datos de sobrevida no fueron influenciados por tratamientos subsecuentes como en el caso de los pacientes de BNL y MIT, y por lo tanto ellos representan más precisamente los efectos verdaderos de la terapia de BNCT en el tumor. Si se comprueba una mejora en el tiempo de sobrevida medio, podría representar un avance significativo porque un tratamiento de BNCT no solo brindaría una mayor sobrevida sino también una mejor calidad de vida, fundamentalmente porque implica una única aplicación, a diferencia de los tratamientos convencionales.

En el año 1987 el Dr. Mishima y colaboradores en Japón, comenzaron su experiencia de BNCT en el tratamiento de melanomas (Mishima Y y col., 1994), con un haz de neutrones térmico del reactor de Kyoto. El compuesto portador de boro utilizado para estos tratamientos fue el BPA (borofenilalanina). El uso del BPA se basó en la premisa que las células neoplásicas, que activamente sintetizan melanina, captarían y acumularían selectivamente este compuesto (Tsuji M y col., 1983). Sin embargo posteriormente se mostró que una variedad de células malignas captan preferentemente grandes cantidades de BPA comparado con células normales (Coderre JA y col., 1990). Los estudios de Mishima claramente estimularon el interés clínico en el BPA como agente portador de boro. De un total de 20 pacientes tratados se obtuvo la curación completa en 15 (75%), respuesta parcial en 4 casos 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 4 pacientes con melanoma de extremidades, logrando una respuesta completa en 2 y una parcial en otros 2 (Busse PM y col., 1997).

En nuestro país se ha desarrollado una facilidad de BNCT en el reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Se trata de un haz de neutrones hipotérmicos (mezcla de neutrones térmicos y epitérmicos), el cual es potencialmente apto para el tratamiento de melanomas en extremidades con cierta profundidad (Blaumann HR y col., 2004). Desde 2003 hasta la fecha, siete pacientes con melanoma cutáneo de las extremidades fueron tratadas en 10 campos como parte de un ensayo clínico de BNCT fase I/II conducido por la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) y el Centro Médico del Instituto A. Roffo, Argentina. Este protocolo fue diseñado para evaluar la eficacia y potencial toxicidad del BNCT para melanoma cutáneo en extremidades (Gonzalez SJ y col., 2004; comunicación personal). Los pacientes incluidos en este tratamiento no podían ser tratados quirúrgicamente ya sea por la cantidad de nódulos o por la ubicación de los mismos. En el momento de la terapia por BNCT los pacientes no estaban recibiendo un tratamiento sistémico así como tampoco un tratamiento local en la zona a tratar. En todos los pacientes se observó una disminución en el volumen de los nódulos tratados o desaparición de los mismos, con alteraciones radiotóxicas leves a moderadas reversibles en el tejido normal. Asimismo el ANMAT autorizó el estudio de

biodistribución con BPA para el cáncer indiferenciado de tiroides y metástasis hepáticas de cáncer de colon.

Otros dos tipos de cáncer han sido tratados más recientemente con BNCT. Los primeros son tumores recurrentes de cabeza y cuello. Kato y colaboradores en Osaka, Japón, reportaron una serie de seis pacientes, 3 con carcinoma de células escamosas, 2 con sarcoma y uno con un tumor de parótida (Kato I y col., 2004). Todos ellos recibieron una terapia estándar y desarrollaron tumores recurrentes sin opción a otro tratamiento. Todos los pacientes recibieron una combinación de BSH (5g) y BPA (250 mg/kg p.c.), como compuestos borados, administrados por vía intravenosa. En todos menos uno de los pacientes, el BNCT se llevó a cabo en el Kyoto University Research Reactor Institute usando un haz de neutrones epitérmicos, en un único tratamiento, que fue dado 12 hs. después de administrar BSH y 1 h. después de administrar el BPA. El paciente con tumor de parótida, recibió un segundo tratamiento un mes después del primero. Este tuvo la mejor respuesta con un 63% de reducción en el volumen del tumor al mes y un 94% de reducción 1 año después del segundo tratamiento, sin evidencia de recurrencia. Los 5 pacientes restantes mostraron una respuesta que osciló desde un 10% a 27% de reducción en el volumen tumoral con una mejora en el estado clínico. Este estudio ha extendido el uso del BNCT a un grupo de tumores que frecuentemente son ineffectivamente tratados con cirugía, radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, se necesitan más estudios clínicos para determinar objetivamente la utilidad clínica del BNCT para tumores de cabeza y cuello. Actualmente se están realizando otros estudios en el hospital Central de la Universidad de Helsinki (Barth RF y col., 2005).

Recientemente se ha explorado el potencial terapéutico de BNCT para tratar metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon (Pinelli T y col., 2002). Aunque en muchos centros se ha realizado hepatectomía seguida por trasplante hepático alogénico (Ringe B y col., 1991; Iwatsuki S y col., 1991), Pinelli, Zonta y colaboradores en Pavia, Italia, han enfocado el problema de las metástasis hepáticas multicéntricas usando un procedimiento innovador pero altamente experimental: BNCT de hígado ex-situ seguido de autotrasplante total. Su primer paciente presentaba más de 14 nódulos metastásicos en el parénquima hepático, cuyo tamaño no permitía una resección quirúrgica. Antes de

efectuar la hepatectomía el paciente recibió una infusión de BPA (300mg/kg p.c.) durante 2 hs., vía la vena cólica. Se tomaron muestras de tumor e hígado normal para determinar la concentración de boro, y una vez que se demostró que el boro se ubicaba selectivamente en los nódulos tumorales y en pequeñas cantidades en el hígado normal se completó la hepatectomía (Pinelli T y col., 2004, Zonta y col., 2006). El hígado se transportó entonces al Laboratorio del Reactor de la Universidad de Pavia para la irradiación con neutrones, después de lo cual se reimplantó en el paciente. Los resultados clínicos en este caso demostrarían el potencial de BNCT de erradicar depósitos multicéntricos de tumores en un órgano sólido. En un segundo paciente se demostró el efecto terapéutico de la técnica sobre los nódulos metastásicos de hígado pero el paciente falleció por causas clínicas no relacionadas con el tratamiento (Zonta y col., 2006). El grupo de Pavia planea tratar a otros pacientes y varios otros grupos están explorando la posibilidad de tratar pacientes con tumores hepáticos primarios así como metastásicos usando este procedimiento. En este contexto, recientemente nuestro grupo ha estudiado a nivel experimental la factibilidad de tratar metástasis hepáticas con un nuevo protocolo de BNCT basado en irradiación con un haz de neutrones térmicos ex-situ seguido de autotransplante **parcial** de hígado. A diferencia de la técnica propuesta por el grupo de Pavia, esta técnica evita la necesidad de una fase anhepática de alto riesgo para el paciente pero requiere que los lóbulos hepáticos tratados por BNCT sean capaces de regenerar (Cardoso y col., en prensa).

## **8. 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 JJ 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).



**Figura 1:** Bolsa de la mejilla del hámster, A-evertida para su observación, B- expuesta, sin evertir

La bolsa de la mejilla del hámster es anatómicamente similar a un “bolsillo” (Fig. 1) en el espesor de cada mejilla. Solo está comunicada con la boca en las comisuras, y está recubierta por epitelio escamoso estratificado semejante al de la cavidad oral propiamente dicha. La bolsa de la mejilla es de fácil acceso, permitiendo así su topicación con diferentes sustancias tales como carcinógenos químicos (Fig. 2). Asimismo, las bolsas

pueden ser evitadas 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.



**Figura 2:** Topicación con un carcinógeno químico

El desarrollo de un tumor maligno involucra complejas interacciones entre diversos factores, tanto exógenos (ambientales) como endógenos (genéticos, hormonales, etc.) (Weinstein IB y col., 1983). 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 hiperplasias reversibles. 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 (Boutwell RK, 1964; Klein-Szanto AJP and Slaga TJ, 1982; Slaga TJ y col., 1981). Si se disminuye la dosis, se hace necesario administrar el DMBA en forma reiterada o bien aplicar un agente promotor 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 realizando las topicaciones 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 – (Wynder EL 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

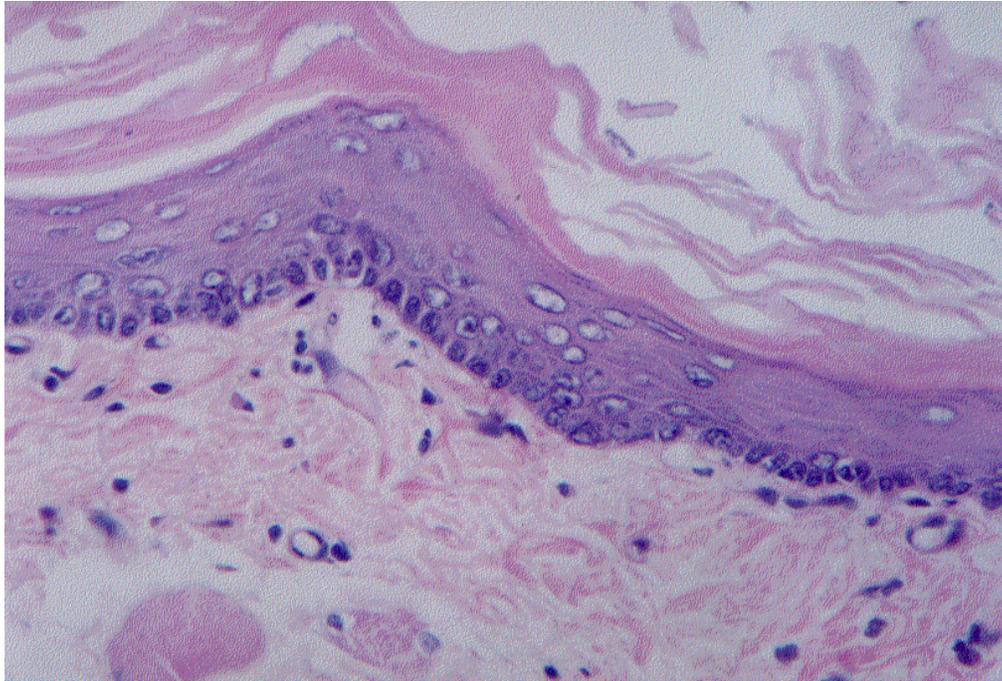
tiempo. No existe una correlación estrecha entre tiempo de topicación y tipo de lesión debido a que distintos estadios pueden coexistir en una misma bolsa.



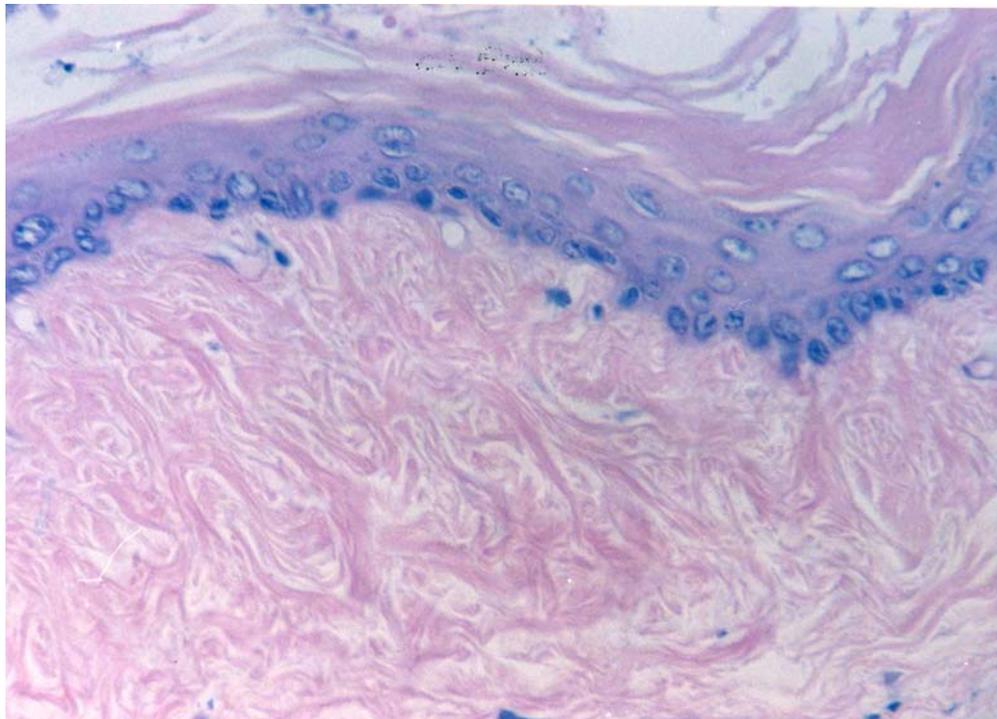
**Figura 3:** Corte histológico de una bolsa topicada con DMBA donde se distinguen los diferentes estadios del proceso de cancerización (tejido precanceroso que incluye NUMF (non unusual morphological features): epitelio sin características morfológicas inusuales, hiperplasia y displasia y carcinomas exofíticos y endofíticos).

Se desarrollan progresivamente lesiones leucoplásicas, carcinoma in situ, carcinomas exofíticos (Fig. 3) y endofíticos (después de las 18 semanas) (Slaga y col., 1992; Kohno N y col., 1996). Los tumores endofíticos son infiltrantes, de mayor velocidad de crecimiento y menor diferenciación. Aunque se producen formas exo-endofíticas, los tumores endofíticos no son formas evolutivas de los tumores exofíticos, sino que constituyen dos formas independientes.

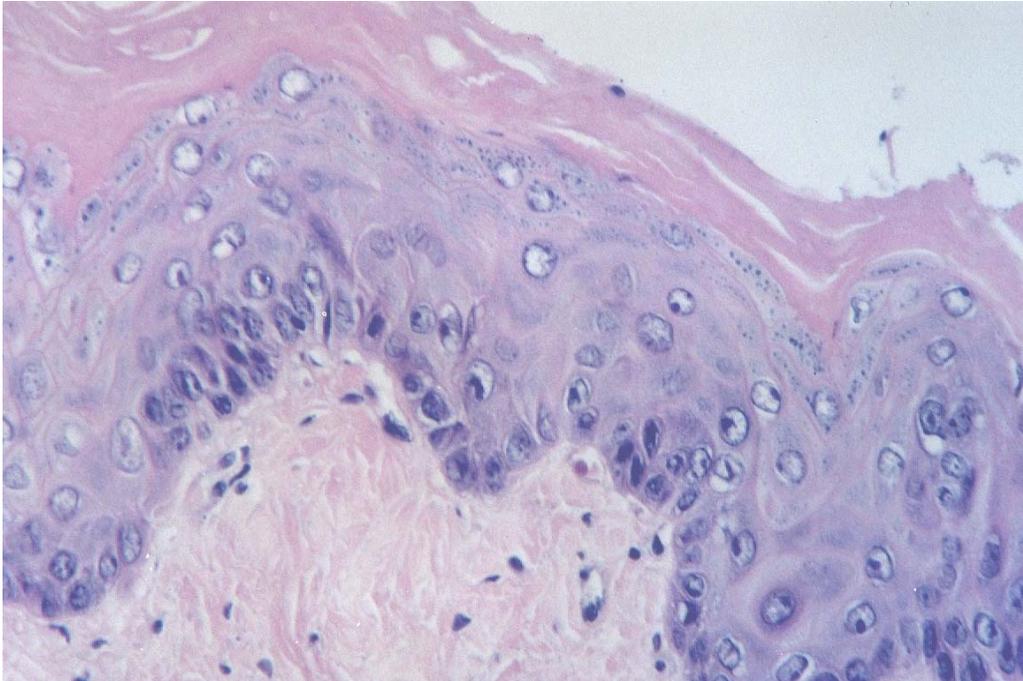
Los tumores exofíticos de la bolsa estudiados en el presente trabajo se asemejan a los carcinomas de la boca humana. Las figuras 5-8 muestran progresivamente los cambios que se observan durante el proceso de transformación maligna a partir de un epitelio normal (Fig. 4). Cabe destacar que en el modelo de la bolsa de la mejilla del hamster pueden coexistir todos los estadios mencionados. No obstante, a medida que transcurre el proceso de carcinogénesis, aumenta la incidencia de lesiones con mayor atipía.



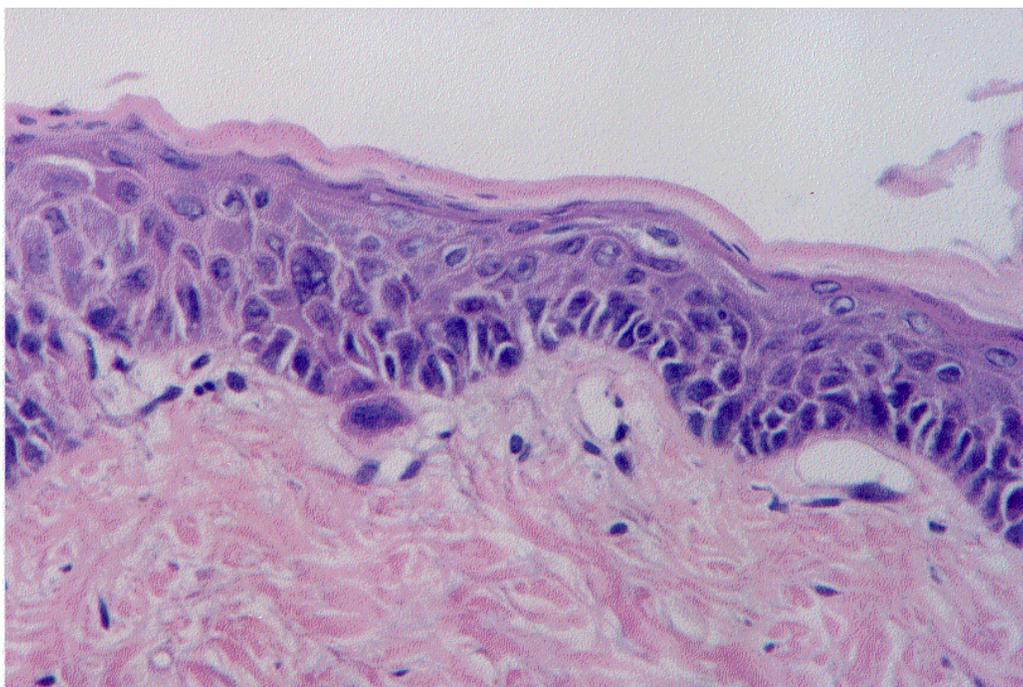
**Figura 4:** Epitelio normal sin cancerizar (control). Se observan 2-3 hileras de células, con capa granulosa y capa cornea bien definidas. H & E; 200X.



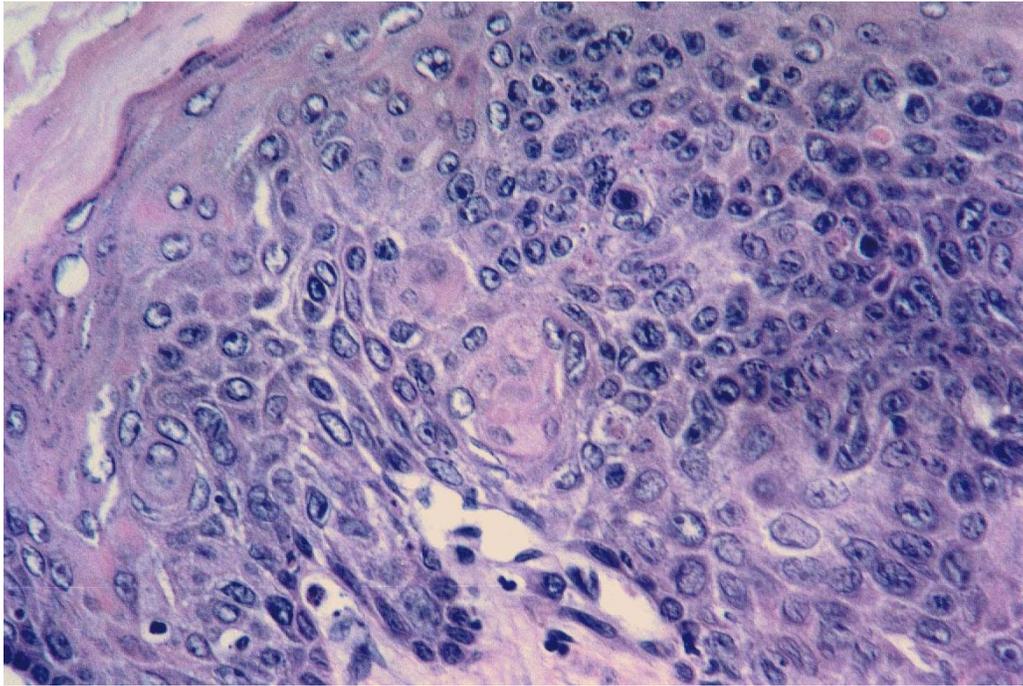
**Figura 5:** Bolsa tratada con DMBA. Se observa un epitelio con fibrosis y sin características microscópicas inusuales (NUMF). H & E; 250X.



**Figura 6:** Bolsa tratada con DMBA. Se observa una hiperplasia donde las células epiteliales presentan apariencia normal pero aumentan su índice de proliferación con lo cual aumenta el grosor epitelial. H & E; 250X.



**Figura 7:** Bolsa tratada con DMBA. Se observa una displasia donde hay alteraciones celulares morfológicas y de orientación. H & E; 250X.



**Figura 8:** Bolsa tratada con DMBA. Se observa un carcinoma semidiferenciado. 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, el efecto iniciador de la radiación ionizante y la radiación ultravioleta ha sido demostrado contundentemente. 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 de la mejilla 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 AE y col., 1993; Collet AM y col., 1995), las variaciones de

las regiones organizadoras del nucleolo asociadas a cambios focales (Schwint AE y col., 1996), el efecto sinérgico de la irradiación X y el DMBA (Méndez AE y col., 1994) y distintos marcadores histoquímicos de alteración celular en respuesta a la radiación (Itoiz ME y col., 1984; Itoiz ME y col., 1986; Schwint AE 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 carcinógenesis (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 RL y col., 1970; Itoiz ME y col., 1977; Klein-Szanto AJP y col., 1970; Klein-Szanto AJP y col., 1972; Klein-Szanto AJP 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 ML 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 RE y col., 1992). Así, la radiación ionizante produciría efectos como iniciador y promotor tumoral (Ootsuyama A y col., 1987).

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 AG, 1983; Lurie AG 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.

Nuestro laboratorio propuso y validó el uso del modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster para estudios de BNCT (Kreimann EL y col., 2001), a los fines de explorar nuevas aplicaciones de BNCT y contribuir al estudio de la biología y radiobiología del BNCT para mejorar sus ventaja terapéutica, y evaluar la respuesta de los tejidos normales limitantes de dosis así como también el tejido precanceroso que rodea al tumor. La relevancia clínica de explorar la potencial ventaja terapéutica del BNCT en este modelo yace en la necesidad de una alternativa terapéutica estratégica para mejorar la relativamente pobre tasa de supervivencia a 5 años del 52% para tumores de cabeza y cuello y evitar cirugías radicales mutilantes (Kastenbauer E and Wollenberg. B, 1999). Los protocolos de carcinogénesis en este modelo experimental inducen cambios premalignos y carcinomas que se asemejan mucho a las lesiones humanas (Morris L, 1961). Una ventaja significativa del modelo se basa en el hecho que los tumores se inducen por un proceso que imita el proceso espontáneo de transformación maligna más que por el crecimiento de células implantadas como ocurre en otros modelos experimentales de tumor empleados para estudios de BNCT (Barth RF, 1998). 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. El modo de inducción tumoral utilizado en la bolsa de la mejilla del

hámster, permite estudiar la respuesta del tejido tumoral, del tejido normal y del tejido precanceroso circundante al tumor 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 DP y col., 1953; Cahan WG, 1977; Choy ATK y col., 1992; Wynder EL y col., 1977; Silverman S y col., 1972; Schwint AE y col., 1994) es de gran relevancia clínica el contar con un modelo que permite abordar el estudio del tejido precanceroso. El cáncer de cabeza y cuello es conocido por presentar múltiples tumores primarios. Además la recurrencia loco-regional es un problema oncológico común y un desafío no resuelto en pacientes afectados por esta enfermedad (Smith D, Haffty BG, 1999). Frecuentemente, el desarrollo de segundos tumores primarios en un área con cancerización de campo alrededor de tumores primarios tratados, es la causa del fracaso terapéutico. La captación de boro por el tejido precanceroso que rodea al tumor justificaría tratar al tejido con cancerización de campo junto con el tumor para reducir el riesgo de desarrollo de segundos tumores primarios en el área. Otra ventaja significativa, clínicamente relevante, de este modelo es que tiene un paralelismo con la heterogeneidad característica de tumores orales humanos en cuanto al grado de diferenciación y estado metabólico, y por lo tanto, proporciona material experimental adecuado para estudiar la forma de enfrentar el desafío de llegar terapéuticamente a diferentes áreas tumorales dentro de un único tumor heterogéneo. El hecho que se aproxima mucho a la heterogeneidad inherente a la carcinogénesis humana espontánea es una ventaja en términos de la relevancia de los datos obtenidos. Sin embargo, este hecho también confiere complejidad al modelo en términos de tamaños variables de tumores e histología y el desarrollo continuo de tumores a partir del tejido precanceroso puede impedir su uso para evaluar recurrencias de tumores. Sin embargo, la heterogeneidad del tumor y la respuesta del tejido precanceroso son aspectos con los que se tiene que enfrentar la práctica clínica y que constituyen grandes desafíos en el tratamiento del cáncer. El tejido precanceroso también puede ser limitante de dosis, el desafío consiste en encontrar una dosis de boro y un tiempo de irradiación que sean terapéuticos para el tumor, no radiotóxicos para el tejido normal que se encuentra dentro del área de tratamiento y que sean tolerados por el tejido precanceroso, mientras producen un efecto terapéutico en términos de inhibición del desarrollo de segundos tumores primarios a partir de este tejido precanceroso.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se pudo demostrar que se pueden alcanzar concentraciones de boro potencialmente terapéuticas en el modelo de cáncer bucal del hámster usando BPA como agente borado y se observó además que el BPA se incorpora selectivamente aunque heterogéneamente en los tumores (Kreimann EL y col., 2001a). Además, se reportó la primera evidencia de éxito del BNCT para el tratamiento de cáncer bucal en el modelo experimental de la bolsa de la mejilla del hámster sin daño al tejido normal (Kreimann EL y col., 2001b). Sin embargo un efecto colateral no deseado, asociado al éxito terapéutico fue una mucositis reversible limitante de dosis en el tejido precanceroso alrededor del tumor. Cabe destacar que la mucositis bucal puede ser potencialmente limitante de dosis en BNCT de tumores de cerebro o de cabeza y cuello (Coderre JA y col., 1999).

Dado que la llegada del boro a todas las poblaciones tumorales dentro de un tumor heterogéneo es crítica para el éxito del BNCT se ha postulado que la administración combinada de diferentes compuestos borados con diferentes propiedades y mecanismos de captación complementarios puede mejorar la tasa terapéutica del BNCT (Ono K y col., 1999). El protocolo de administración de los compuestos borados en forma combinada debería ser tal que ambos alcancen simultáneamente su biodistribución óptima en el momento de la irradiación con neutrones. Las posibilidades de emplear mezclas de compuestos son muy numerosas y potencialmente permitirían diseñar la óptima combinación para cada tipo de tumor (Hawthorne MF y LEE MW., 2003).

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto del BNCT en el tejido tumoral, precanceroso y normal en un modelo experimental de la bolsa de la mejilla del hámster con un compuesto borado alternativo (GB-10), administrado solo o en combinación con BPA (compuesto empleado en la clínica), y explorar un escenario preclínico tratando CCEs espontáneos en pacientes felinos.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos principales:

- a. Realizar estudios de biodistribución en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster con distintos compuestos borados (GB-10, GB-10 + BPA) y distintos protocolos de administración, para evaluar las concentraciones de boro en tumor y las relaciones de concentración de boro Tumor / Tejido Normal y Tumor / Sangre y determinar si estos valores de concentraciones absolutas y relativas de boro se encuentran dentro de un rango terapéuticamente útil.
- b. Evaluar la distribución del boro que resulta de la administración de GB-10 y GB-10 + BPA en zonas tumorales predominantemente necróticas y predominantemente viables determinadas macroscópicamente para estudiar una potencial relación entre incorporación de los compuestos borados y actividad metabólica de las células. Esta información contribuiría a diseñar/seleccionar protocolos que contribuyan a mejorar el “targeting” con boro de las distintas poblaciones tumorales.
- c. Evaluar la homogeneidad de la biodistribución con los mismos compuestos borados en tejido tumoral, precanceroso y normal. Esta información contribuiría a diseñar/seleccionar protocolos que contribuyan a mejorar el “targeting” con boro de las distintas poblaciones tumorales.
- d. Realizar estudios de BNCT *in vivo* empleando distintos protocolos (basados sobre los resultados de los estudios de biodistribución) en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster, empleando el haz de neutrones epitérmico termalizado del Reactor Nuclear RA-6, sito en el Centro Atómico

Bariloche, con una dosis baja de irradiación para evaluar la factibilidad y seguridad del tratamiento.

- e. Una vez demostrada la factibilidad y seguridad del tratamiento a baja dosis de irradiación, se propuso estudiar la eficacia de BNCT *in vivo* en el mismo modelo y con los mismos protocolos a una dosis mayor de irradiación, empleando el haz de neutrones epitérmico termalizado del Reactor Nuclear RA-6, sito en el Centro Atómico Bariloche.
- f. Habiendo demostrado la eficacia del BNCT en un modelo experimental sin efecto radiotóxico al tejido normal, se planteó realizar, dentro de un contexto preclínico, estudios preliminares de BNCT en tumores espontáneos en felinos domésticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Inducción de Tumores en la Bolsa de la Mejilla del Hámster

Hámsters Syrian (*Mesocricetus auratus*) jóvenes (6-8 semanas) fueron sometidos a un protocolo de carcinogénesis química. Se aplicó un carcinógeno químico completo, 0.5% dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) en aceite mineral, mediante topicaciones locales de aproximadamente 0.1 ml 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). No fue necesario anestesiarse a los animales para realizar las topicaciones. A partir de la semana 7 de topicación con DMBA los hámsters fueron anestesiados periódicamente con Ketamina (70mg/kg de peso corporal (pc))-Xilazina (10.5mg/kg de peso corporal (pc)) intraperitonealmente (ip) y se examinaron las bolsas tratadas con el fin de monitorear el desarrollo tumoral. Una vez que se desarrollaron los tumores exofíticos (diámetro superior a 1 mm aproximadamente) los animales fueron usados para estudios de biodistribución y farmacocinética de los compuestos borados y BNCT in vivo.

### 2. Preparación de compuestos borados

Para los estudios de biodistribución y farmacocinética y para BNCT in vivo se utilizaron como compuestos borados el BPA y el GB-10.

Para preparar la solución de BPA se utilizó la p-borofenilalanina (BPA; L-enantiómero, > 98 % enriquecida en <sup>10</sup>B de Boron Biologicals, Inc. Raleigh, NC) conteniendo 4.9 % de boro por peso de BPA. El BPA fue convertido en un compuesto más soluble por formación de un complejo con fructosa en una relación 1:1 molar en agua destilada. Se prepararon soluciones del complejo BPA-fructosa (BPA-F) a una concentración 0.14 M y 0.28 M para ser utilizada en los diferentes protocolos. 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 agua destilada 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  $\mu\text{m}$  de poro (Nalge Company, Rochester, N.Y.) y almacenada a 4 °C hasta su utilización.

Para preparar la solución de GB-10 ( $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$ ) se empleó GB-10 provisto por Neutron Therapies, L.L.C., USA, isotópicamente enriquecido en un 99% en  $^{10}\text{B}$ . La solución original de aproximadamente 100 mg  $^{10}\text{B}/\text{ml}$  se diluyó 1:10 en agua destilada.

### **3. Estudios de biodistribución**

#### Protocolo de administración del GB-10:

La solución de GB-10 diluida 1:10 fue administrada como una inyección en bolo en la vena yugular que fue expuesta por cirugía en los animales anestesiados con una inyección ip de Ketamina (140 mg/kg pc)-Xilazina (21 mg/kg pc) y posterior sutura de la piel. Se administró una dosis de 50 mg  $^{10}\text{B}/\text{kg}$  pc. Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena yugular bajo anestesia ip de Ketamina (140 mg/kg pc) y Xilazina (21 mg/kg pc) a diferentes tiempos post-administración del compuesto borado. Distintos lotes de animales fueron sacrificados 5-10, 15-20, 30-40, 60, y 90 minutos y 2, 3, 4, y 6 h post-administración del compuesto para tomar muestras de sangre y tejido.

#### Protocolo alternativo de administración de GB-10

Queriendo aprovechar una potencial diferencia en el clearance entre el tumor y el tejido normal a las 3 h post-administración del GB-10, realizamos una doble administración de GB-10. Para ello entregamos una primera dosis de boro (GB-10 (50 mg  $^{10}\text{B}/\text{kg}$  pc)) de igual manera que como se indica arriba y una 2ª dosis (idéntica a la primera) 3h después. Los animales fueron sacrificados 30-60 min. ó 2 h después de la 2ª dosis de GB-10.

#### Protocolo de administración combinada de GB-10 + BPA:

Sobre la base de nuestros estudios previos de biodistribución y BNCT in vivo empleando BPA como compuesto borado (Kreimann et al., 2001a; Kreimann et al., 2001b) y para explorar la posibilidad de aprovechar las diferentes propiedades del GB-10 y el BPA para aumentar la potencial eficacia terapéutica del BNCT, propusimos diferentes protocolos de combinación de ambos compuestos, como se indica abajo.

a. GB-10 (i.v.), 50 mg  $^{10}\text{B}$  /kg pc + BPA (ip, en bolo), 15.5 mg  $^{10}\text{B}$  /kg pc Los animales fueron sacrificados 3 h post-administración de GB-10 y 3.5 h post-administración de BPA. Asimismo, para detectar posibles efectos sinérgicos o antagónicos, los compuestos también fueron administrados separadamente siguiendo el mismo protocolo.

b. GB-10 (i.v.), 34.5 mg  $^{10}\text{B}$  /kg pc + BPA (ip, en bolo), 31 mg  $^{10}\text{B}$  /kg pc Los animales fueron sacrificados 3 h post-administración de GB-10 y 3.5 h post-administración de BPA. Asimismo, para detectar posibles efectos sinérgicos o antagónicos, los compuestos también fueron administrados separadamente siguiendo el mismo protocolo.

c. GB-10 (i.v.), 34.5 mg  $^{10}\text{B}$  /kg pc + BPA (ip), 31 mg  $^{10}\text{B}$  /kg pc dosis total, administrada como dosis fraccionada en intervalos de 20 min. durante 3 h. Los animales fueron sacrificados 3 h post-administración de GB-10 y 1.5 h después de la última inyección ip de BPA. Asimismo, para detectar posibles efectos sinérgicos o antagónicos, los compuestos también fueron administrados separadamente siguiendo el mismo protocolo.

A los tiempos post-administración establecidos se tomaron muestras de: tumor, tejido precanceroso alrededor del tumor (bolsa derecha de la mejilla del hámster tratada con DMBA), tejido normal de la bolsa de la mejilla (bolsa contralateral no tratada con DMBA), mucosa de carrillo, piel, paladar, lengua, glándula parótida, hígado, bazo, riñón, pulmón, cerebro, médula espinal y sangre. Se tomaron muestras de tejido de 25-50 mg. Las muestras de mayor peso dificultan el procesado y las muestras de menor volumen aumentan los errores en la medición de boro (ver más abajo). Todas las muestras de tejido fueron almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y las de sangre a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior pesado y procesamiento.

#### Estudio de la incorporación de boro en función de la viabilidad tumoral

De acuerdo con el concepto propuesto por Coderre y col. (1998) que la captación de BPA depende de la viabilidad de las células tumorales y dada la importancia de la captación de boro en todas las células tumorales, nosotros evaluamos la captación de GB-10 por las diferentes áreas tumorales. Para este propósito, durante la toma de muestras (a distintos tiempos post-administración del compuesto),

discriminamos las áreas disponibles de tumor que aparentemente eran predominantemente necróticas por inspección visual y procesamos el tejido para análisis de boro separadamente del resto del tejido tumoral que aparentemente por inspección visual era predominantemente viable. El procesamiento del tejido y el análisis de boro fueron realizados de igual manera que en los estudios de biodistribución. En cada caso se estableció una relación de viable sobre necrótico (V/N) de captación de boro para evaluar posibles diferencias en la incorporación de boro entre tejido tumoral predominantemente viable y predominantemente necrótico. No se intentó realizar una correlación entre el análisis de boro y la histología dada la escasa cantidad de tejido predominantemente necrótico que podía ser disecado de cada tumor.

En los estudios de biodistribución se realizó el análisis estadístico de los datos en aquellos casos que resultaba de interés para la interpretación de los resultados. Para ello se usó análisis de varianza de un factor (ANOVA de 1 factor) con  $\alpha=0.05$ .

#### Estudio del grado de homogeneidad en la incorporación de boro en tumores heterogéneos

Una vez elegido el tiempo óptimo post-administración de compuesto/s borado/s en los estudios de biodistribución para lograr la mejor combinación posible de relación Tumor/Tejido Normal y Tumor/Sangre de contenido de boro y contenido absoluto de boro en tumor se evaluó el grado de homogeneidad de incorporación de boro a este tiempo post-administración en las diferentes porciones de tumor, tejido precanceroso y tejido normal, los tejidos de mayor interés por su relevancia clínica.

Para ello se administró GB-10 (50 mg  $^{10}\text{B}/\text{kg pc}$ ), BPA (15.5 mg  $^{10}\text{B} /\text{kg pc}$ ) y GB-10 (i.v.), 34.5mg  $^{10}\text{B} /\text{kg pc}$  + BPA (ip), 31 mg  $^{10}\text{B} /\text{kg pc}$  como se indica arriba y se tomaron para cada animal entre 4-6 muestras de tejido precanceroso y tejido normal (a diferencia de los estudios de biodistribución descritos en el punto anterior en los cuales se tomó una muestra de cada tejido por cada animal) y la mayor cantidad de muestras de tumor disponibles, según el tamaño y número de tumores y de acuerdo a los requerimientos de tamaño de muestra descritos más arriba.

El grado de homogeneidad en la distribución de boro fue evaluada en términos

del coeficiente de variación ( $V: [D.S./media] \times 100$ ) para cada tejido para cada uno de los diferentes protocolos de administración. Se realizó el análisis estadístico de los datos por ANOVA de un factor y el test de menor diferencia significativa. Los supuestos del ANOVA fueron examinados por el test de Bartlett's para homocedacia y el test de Lilliefors' para normalidad. Se realizó una transformación logarítmica de los valores de  $V$  para cumplir con los supuestos del ANOVA. La significancia estadística se fijó en  $\alpha=0.05$ .

#### **4. Procesamiento de muestras para medición de contenido de boro por Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivo (ICP-OES)**

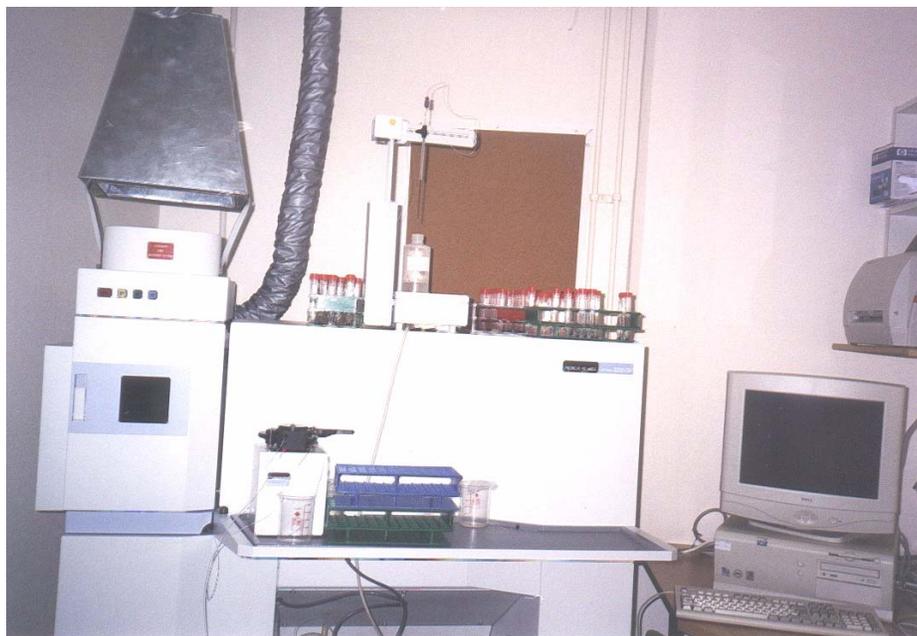
Las muestras de tejido previamente pesadas (50 mg ó menos) fueron digeridas toda la noche a temperatura ambiente ó a 60 °C por 1h en 0.2 ml de una mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico y ácido nítrico. Luego de la digestión la solución se observó límpida y de color amarillento. A esta mezcla se le agregó un volumen de 600  $\mu$ l de una solución al 5% de detergente Tritón X-100, y 200  $\mu$ l de una mezcla de itrio (0.5ppm) y estroncio (25ppm) como estándar interno. Inmediatamente antes del análisis por ICP-OES la mezcla fue sonicada durante 15 minutos (Coderre JA y col. , 1998).

El paso de digestión es muy importante debido a que las partículas pueden tapar el nebulizador del ICP-OES e inducir a errores en la medición. En este sentido es importante el uso de un patrón interno, un elemento de concentración conocida que se agrega a cada una de las muestras (el cual no está presente naturalmente en ellas) y que funciona como un control para saber si la muestra ingresó correctamente al área de detección. En este caso el patrón interno que se usó fue la mezcla de itrio y estroncio descripta.

Las muestras de sangre (200-300ml) fueron pesadas y luego fueron digeridas toda la noche a temperatura ambiente ó a 60 °C por 1h en 1 ml de una mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico y ácido nítrico. Luego de la digestión y una vez que se comprobó que la solución estaba límpida y de un color amarillento se agregaron 3 ml de una solución al 5% de detergente Tritón X-100 y 1 ml de la mezcla de itrio y estroncio como patrón interno. De esa solución se extrajo 1ml para ser medido por ICP-OES.

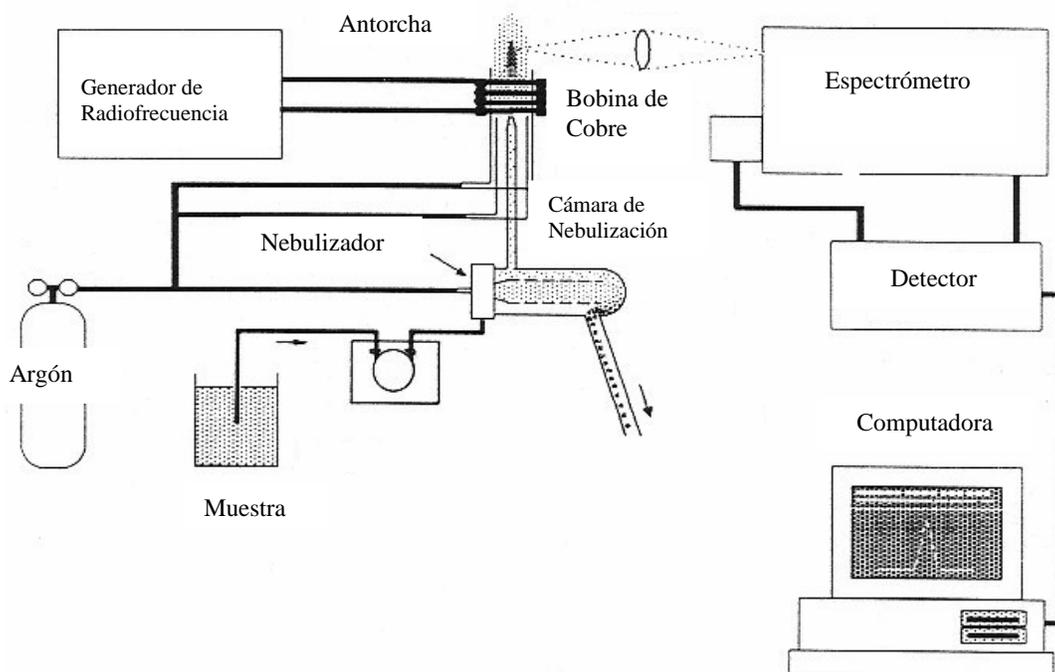
## 5. Valoración de Boro por Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivo (ICP-OES) (*modelo ICP Optima 3100 XL UV, axial*).

*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.



**Figura 9:** ICP-OES, foto del equipo utilizado.

En un ICP-OES 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. 9-10).

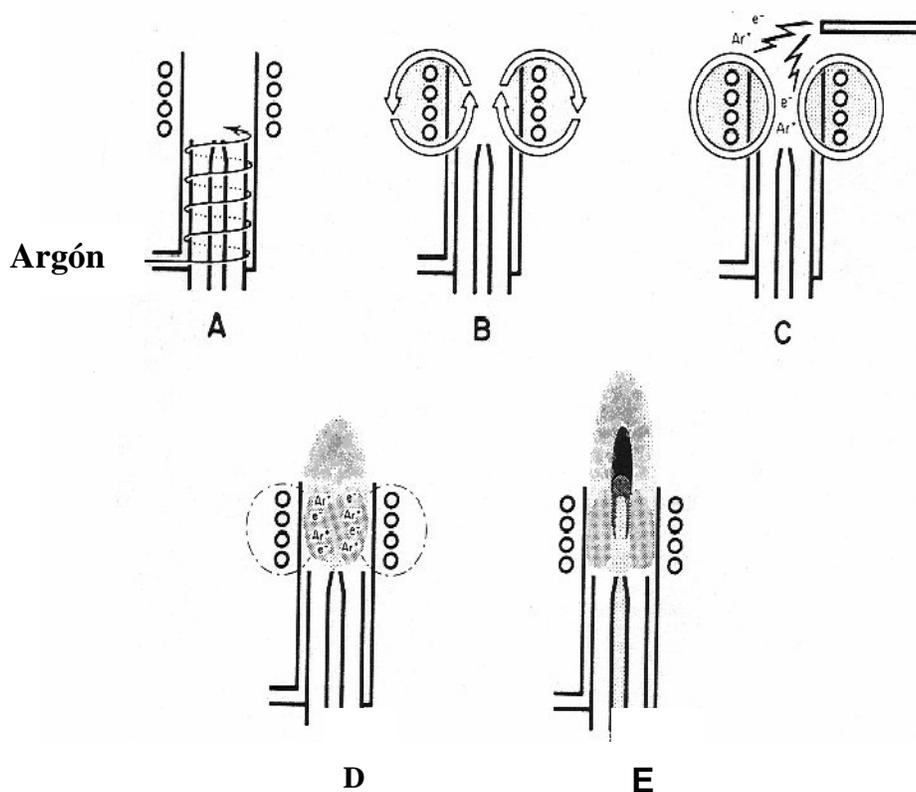


**Figura 10:** Esquema básico de un Espectrómetro de Emisión de Plasma.

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. 11).

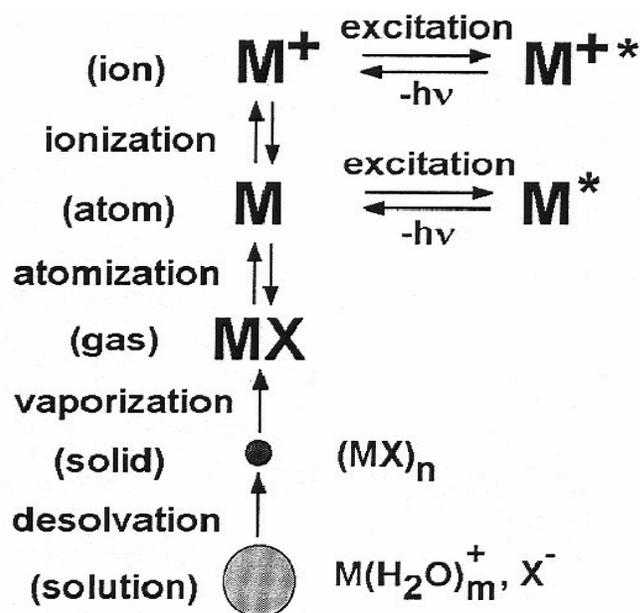


**Figura 11:** Vista transversal de la antorcha del ICP y el alambre de cobre representando la secuencia de ignición. A- Gas Argón entrando a la antorcha B- Generador de radiofrecuencia RF C- Una chispa produce electrones libres en el Argón D- Los electrones libres son acelerados por el campo magnético 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.).



**Figura 12:** Proceso que se desencadena cuando una muestra líquida es introducida en la descarga del ICP.

La Fig. 12 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.

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 SCD 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 saturan 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-OES 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 CB y Fredeen KJ 1999).

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-volúmenes. Debido a que esta modalidad de trabajo no se encuentra entre las permitidas de forma rutinaria por el software comercial del ICP-OES, 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 pixeles 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.).

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:

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

Empleando este instrumento se obtuvieron los valores de contenido de boro en las distintas muestras de sangre y tejido para los distintos protocolos de administración de compuestos borados. Asimismo, estos valores de contenido de boro se emplearon para hacer los cálculos dosimétricos para realizar los estudios de BNCT in vivo.

## 6. BNCT in vivo

Se realizaron dos grupos de experiencias de irradiación. Un grupo de experiencias se realizó a baja dosis, empleando tiempos cortos de irradiación, para evaluar principalmente la radiotoxicidad en los tejidos normales y el tejido precanceroso alrededor del tumor y secundariamente la eficacia terapéutica de la técnica. Habiendo evaluado los resultados del primer grupo de experiencias, se diseñó un segundo grupo de experiencias de irradiación a altas dosis, aumentando el tiempo de irradiación, para

evaluar principalmente el control tumoral y la respuesta concomitante del tejido precanceroso y el tejido normal.

Cada uno de estos dos grupos de experiencias de irradiación requirió de un viaje en avión al Centro Atómico Bariloche (sito en la ciudad de San Carlos de Bariloche), con aproximadamente 65 animales cada vez y 100 kg de equipaje (material de laboratorio, etc.), para realizar irradiaciones con el haz epitérmico termalizado del Reactor Nuclear RA-6.

Los animales fueron distribuidos al azar en los diferentes protocolos. En la Tabla 4 se detalla la cantidad de hámsters, tumores y tiempos de irradiación de cada grupo experimental. Los animales cancerizados tenían tumores con localización y tamaño conocido en la bolsa derecha de la mejilla del hámster. Se incluyeron en el estudio 5 animales sometidos a irradiación “sham” (viaje a San Carlos de Bariloche + irradiación simulada).

En cada grupo de experiencias (baja dosis y alta dosis, Tabla 4), quince animales con tumor y 10 animales normales (no cancerizados), fueron irradiados bajo anestesia con Ketamina (140 mg/kg pc)-Xilazina (21 mg/kg pc) 3 h post administración de GB-10 (50 mg 10B/kg pc) en bolo i.v. en la vena yugular que fue expuesta quirúrgicamente en animales anestesiados.

En cada grupo de experiencias (baja dosis y alta dosis, Tabla 4), quince animales con tumor y 10 animales normales (no cancerizados), fueron irradiados después de la administración combinada de GB-10 y BPA. El GB-10 fue administrado i.v. como una inyección en bolo (34.5 mg 10B/kg pc) y el BPA fue administrado como inyecciones ip fraccionadas a intervalos de 20 min. durante 3 h simulando una infusión (dosis total 31 mg 10B/kg pc). Los animales fueron irradiados 3 h post-administración del GB-10 y 1.5 h post la última inyección de BPA.

Cinco hámsters con tumor y 5 hámsters normales fueron irradiados con el haz solamente en cada grupo de experiencias (baja dosis y alta dosis).

En la Tabla 4 se observa la distribución de los animales en cada protocolo y la cantidad total de tumores tratados.

Antes de la irradiación, en cada caso se calculó el volumen tumoral como el producto de los valores de 3 ejes (aproximando a largo, ancho y altura) tomados con regla milimetrada. Arbitrariamente se establecieron 3 grupos de tamaño tumoral, chicos ( $< 10\text{mm}^3$ ), medianos ( $>10\text{mm}^3$  y  $<100\text{mm}^3$ ) y grandes ( $\geq 100\text{mm}^3$ ), para evaluar una potencial respuesta diferencial de los tumores a la terapia en función de su tamaño en el momento de la irradiación. También para cada animal se hizo un diagrama de la bolsa con la ubicación de los tumores para su seguimiento post tratamiento y se fotografió.

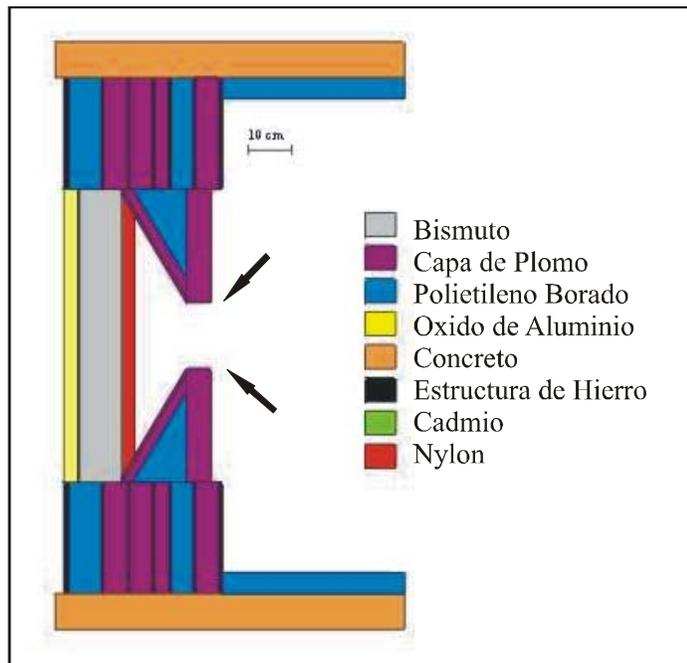
	Baja dosis de irradiación			Alta dosis de irradiación		
	GB-10 <sup>a</sup> 49 min. de irradiación	GB-10 + BPA <sup>b</sup> 17.3 min. de irradiación	Solo Haz 49 min. de irradiación	GB-10 <sup>a</sup> 74.5 min. de irradiación	GB-10 + BPA <sup>b</sup> 34.6 min. de irradiación	Solo Haz 74.5 min. de irradiación
<b>Hámsters con tumor</b>	15 animales c/ 57 tumores	15 animales c/ 54 tumores	5 animales c/ 5 tumores	15 animales c/ 54 tumores	15 animales c/ 55 tumores	5 animales c/ 15 tumores
<b>Hámsters normales</b>	10 animales	10 animales	5 animales	10 animales	10 animales	5 animales

**Tabla 4:** Distribución de animales en cada protocolo y cantidad de tumores tratados. a-GB-10 (50 mg 10B/kg pc), b-GB-10 (34.5 mg 10B/kg pc) + BPA (31 mg 10B/kg pc, 3 h. similitud). infusión).

La bolsa evertida e inevitablemente parte de la cabeza fue colocada en el puerto del haz que es de 15 cm de diámetro (Fig. 13). El resto del cuerpo fue blindado con plomo y polietileno borado que delimita el haz (Fig. 14). Los tiempos de irradiación para BNCT mediado por GB-10 fueron de 49.5 min., para la experiencia de baja dosis de irradiación y de 74.5 min. para la experiencia de alta dosis de irradiación. Para el caso de BNCT mediado por la combinación de GB-10 y BPA el tiempo de irradiación fue de 17.3 min., para la experiencia de baja dosis de irradiación y de 34.6 min. para la experiencia de alta dosis de irradiación. En el caso de “solo haz” (irradiación sin previa administración de compuesto borado) se emplearon los tiempos de irradiación más largos usados para los correspondientes tratamientos con BNCT, es decir 49 min. en el caso del primer grupo de experiencias y 74.5 min. para el segundo grupo de experiencias.



**Figura 13:** Dispositivo de irradiación donde se posicionan los animales. La circunferencia central del dispositivo corresponde al diámetro de salida del haz de neutrones y los colores marcan un gradiente de dosis.



**Figura 14:** Sección transversal de la geometría del Reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche. El diámetro del haz de 15 cm quedó delimitado por un blindaje de polietileno borado y una capa de plomo. Las flechas indican el puerto de salida del haz.

El flujo promedio de neutrones térmicos para tejido tumoral y tejido sano en la posición de la bolsa fue de  $3.4 \pm 0.3 \times 10^8$  neutrones /  $\text{cm}^2 \text{ s}$ . Los valores del contenido de boro para el cálculo de dosis de irradiación (en particular la dosis boro de irradiación), la dosis administrada de BPA y GB-10 y el tiempo óptimo post-administración para realizar la irradiación se obtuvieron a partir de nuestros estudios de biodistribución y farmacocinética de GB-10 y GB-10 + BPA en este modelo descriptos en el punto anterior. En la Tabla 5 se presentan algunos valores de contenido de boro, centrales para realizar los cálculos dosimétricos necesarios para diseñar los protocolos de BNCT in vivo. Estos valores corresponden a la concentración de boro 3 h post-administración del GB-10 como compuesto borado y en el caso de la combinación (GB-10 + BPA) 3 h post-administración de GB-10 y 1.5 h después de la última inyección ip de BPA. Las tablas completas que muestran los resultados de los estudios de biodistribución se encuentran en la sección “Resultados”. Los valores correspondientes a la administración de BPA solamente corresponden a un estudio anterior y se incluyeron a fines comparativos (Kreimann et al., 2001a).

	<b>GB-10</b> (50 mg $^{10}\text{B}/\text{kg pc}$ )	<b>GB-10</b> (34.5 mg $^{10}\text{B}/\text{kg pc}$ ) <b>+ BPA</b> (31 mg $^{10}\text{B}/\text{kg pc}$ , 3h similinfusión )	<b>BPA</b> (15.5 mg B/kg pc en bolo ip) (Kreimann y col., 2001a)
<b>Tumor</b>	31.9±21.4	121.7±38.6	36.9±17.5
<b>Tejido precanceroso</b>	34.3±16.9	58.3±19.2	19.6±5.8
<b>Bolsa normal</b>	21.6±7	61.6±22.4	15.6±5.4
<b>Sangre</b>	31.8±6.4	47.9±13.3	11.7±4.9

**Tabla 5:** concentración de boro (media  $\pm$  DS) (ppm) en sangre y tejido para los diferentes protocolos de administración. Los tiempos que se emplearon para la medición de boro fueron: 3 h post-administración de GB-10 y para la combinación (GB-10 + BPA) 3 h post-administración de GB-10 y 1.5 h después de la última inyección ip de BPA. En el caso de BPA solamente el tiempo empleado fue fue 3.5 h post-administración.

### Cálculos dosimétricos

Las dosis físicas estimadas absorbidas para las diferentes componentes de radiación para los diferentes protocolos de administración se presentan en la Tabla 6. Los valores correspondientes al protocolo de BNCT mediado por BPA corresponden a un estudio anterior y se incluyeron a fines comparativos (Kreimann et al., 2001b).

	Neutrones rápidos	Fotones Gamma	Boro (tumor)	Boro (tejido normal)	Protones inducidos
<b>A: GB-10 (50 mg <sup>10</sup>B/kg pc) 49.5 min. de irradiación</b>					
<b>Bolsa</b>	0.69±0.06	1.93±0.08	2.46±0.25	1.66±0.17	0.20±0.02
<b>Cabeza</b>	0.44±0.04	0.94±0.04		0.50±0.05	0.040±0.004
<b>Cuerpo</b>	0.22±0.02	0.35±0.01		0.040±0.004	0.003±0.03
<b>B: GB-10 (34.5 mg <sup>10</sup>B/kg pc) + BPA (31 mg <sup>10</sup>B/kg pc, 3 h. simil-infusión ) 17.3 min. de irradiación</b>					
<b>Bolsa</b>	0.24±0.02	0.67±0.03	3.28±0.33	1.66±0.17	0.07±0.01
<b>Cabeza</b>	0.15±0.02	0.33±0.01		0.26±0.03	0.010±0.001
<b>Cuerpo</b>	0.08±0.01	0.12±0.01		0.020±0.002	0.001±0.01
<b>C: GB-10 (50 mg <sup>10</sup>B/kg pc) 74.5 min. de irradiación</b>					
<b>Bolsa</b>	1.04±0.09	2.90±0.10	3.69±0.37	2.49±0.25	0.30±0.03
<b>Cabeza</b>	0.66±0.06	1.41±0.06		0.75±0.08	0.06±0.006
<b>Cuerpo</b>	0.33±0.03	0.53±0.02		0.06±0.006	0.01±0.001
<b>D: GB-10 (34.5 mg <sup>10</sup>B/kg pc) + BPA (31 mg <sup>10</sup>B/kg pc, 3 h. similinfusión ) 34.6 min. de irradiación</b>					
<b>Bolsa</b>	0.48±0.04	1.34±0.05	6.56±0.66	3.32±0.33	0.14±0.01
<b>Cabeza</b>	0.30±0.03	0.66±0.03		0.52±0.05	0.02±0.002
<b>Cuerpo</b>	0.16±0.01	0.24±0.01		0.04±0.004	0.002±0.0002
<b>E: BPA (15.5 mg B/kg b.w., bolus ip) (Kreimann et al., Cancer Research, 2001b)</b>					
<b>Bolsa</b>	1.02±0.08	1.40±0.06	2.52±0.25	0.84±0.08	0.22±0.02
<b>Cabeza</b>	0.72±0.06	0.95±0.04		0.61±0.06	0.15±0.02
<b>Cuerpo</b>	0.41±0.03	0.50±0.02		0.31±0.03	0.08±0.01

**Tabla 6:** Dosis física absorbida (Gy) para los diferentes protocolos experimentales.

La Tabla 7 muestra la dosis física absorbida total en cada caso. Los valores de haz solo corresponden a los valores de neutrones rápidos, fotones Gamma, y protones inducidos citados en la Tabla 6A y 6C, correspondientes a tiempos de irradiación de 49.5 min. y 74.5 min respectivamente. La dosis física absorbida correspondiente al tumor de la bolsa de la mejilla del hámster incluye los valores de solo haz más la correspondiente componente de boro del tumor como se muestra en la primera línea de la Tabla 6 de cada protocolo. La dosis física absorbida correspondiente a la bolsa normal incluye los valores de solo haz más la componente de boro correspondiente a tejido normal como se muestra en la primera línea de la Tabla 6 de cada protocolo.

Como se describió en cada caso, a fines comparativos se incluyeron en las Tablas 5, 6 y 7 los datos correspondientes a la biodistribución de BPA y a BNCT

mediado por BPA. Este estudio fue realizado por la ahora Dra. Erica Kreimman como trabajo de tesis doctoral en nuestro laboratorio bajo la dirección de la Dra. Amanda Schwint (Kreimann y col., 2001a; Kreimann y col., 2001b).

	BPA (15.5 mg B/kg b.w., bolus ip) (Kreimann et al., Cancer Research 2001b)	Baja dosis de irradiación			Alta dosis de irradiación		
		GB-10 49 min. de irradiación	GB-10 + BPA 17.3 min. de irradiación	Solo Haz 49 min. de irradiación	GB-10 74.5 min. de irradiación	GB-10 + BPA 34.6 min. de irradiación	Solo Haz 74.5 min. de irradiación
<b>Tumor</b>	5.16±0.41	5.28±0.41	4.26±0.39	2.82±0.05	7.92±2.52	8.52±2.61	4.24±0.007
<b>Tejido Precanceroso</b>	4.32±0.32	5.28±0.41	2.64±0.23	2.82±0.05	8.20±2.02	5.10±1.79	4.24±0.007
<b>Bolsa normal</b>	3.48±0.24	4.48±0.33	2.64±0.23	2.82±0.05	6.72±0.90	5.28±1.90	4.24±0.007

**Tabla 7:** Dosis física total absorbida (Gy)

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 y para el GB-10 y el GB-10 + BPA de comunicación personal (David Nigg, INL) o estimado a partir de resultados, Tabla 8.

	Neutrones Rápidos	Fotones (gamma)	Boro Tumor	Boro Bolsa normal	Protones Inducidos
<b>RBE</b>	3.2	1			3.2
<b>CBE (BPA)</b>			3.8 <sup>a</sup>	2.5 <sup>b</sup>	
<b>CBE (GB-10)</b>			2	1.25	
<b>CBE (GB-10 + BPA)</b>			2.5	2	

**Tabla 8:**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 calcula 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**

A modo de ejemplo se muestra el cálculo de dosis equivalente para tumor y bolsa normal con GB-10 baja dosis:

**Tumor**

$$2.46 \times 3.8 \text{ Gy-Eq} + (0.69 + 0.20) \times 3.2 \text{ Gy-Eq} + 1.93 \times 1 \text{ Gy-Eq} = \mathbf{9.7 \text{ Gy-Eq}}$$

**Bolsa Normal**

$$1.6 \times 2.5 \text{ Gy-Eq} + (0.69 + 0.20) \times 3.2 \text{ Gy-Eq} + 1.93 \times 1 \text{ Gy-Eq} = \mathbf{6.8 \text{ Gy-Eq}}$$

La dosis equivalente total de todos los protocolos se muestra en la Tabla 9.

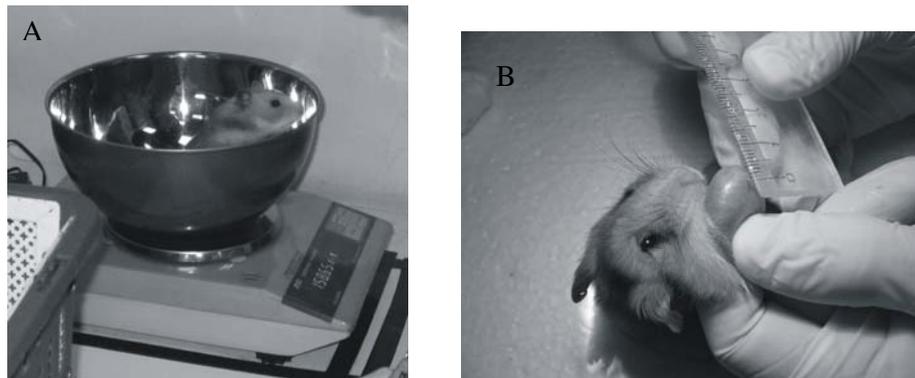
	BPA (15.5 mg B/kg b.w., bolus ip) (Kreimann et al., Cancer Research 2001b)	Baja dosis de irradiación			Alta dosis de irradiación		
		GB-10 49 min. de irradiación	GB-10 + BPA 17.3 min. de irradiación	Solo Haz 49 min. de irradiación	GB-10 74.5 min. de irradiación	GB-10 + BPA 34.6 min. de irradiación	Solo Haz 74.5 min. de irradiación
<b>Tumor</b>	14.9 Gy-Eq	9.7 Gy-Eq	9.9 Gy-Eq	4.8 Gy-Eq	14.6 Gy-Eq	19.7 Gy-Eq	7.2 Gy-Eq
<b>Bolsa normal</b>	7.5 Gy-Eq	6.8 Gy-Eq	5.0 Gy-Eq	4.8 Gy-Eq	10.3 Gy-Eq	10.0 Gy-Eq	7.2 Gy-Eq

**Tabla 9:** Dosis equivalente total (Gy-Eq)

## 7. Seguimiento post – BNCT

La respuesta del tejido tumoral, precanceroso y normal fue determinada por inspección visual, toma de imágenes y evaluación del volumen tumoral a 1, 7, 14, 21 y 30 días post-irradiación (Fig. 14). La respuesta del tejido normal en los hámsters

normales irradiados de cada protocolo, fue evaluada en cada uno de los tiempos y hasta los 6 meses de finalizado el tratamiento. Dos o tres animales de cada protocolo fueron sacrificados al azar en cada uno de los tiempos para realizar un análisis histológico del tejido tumoral, el tejido precanceroso y el tejido normal. Los animales que fueron sacrificados se perdieron para los subsecuentes seguimientos y la respuesta tumoral fue evaluada al tiempo del sacrificio. La respuesta tumoral se clasificó como remisión total, parcial o progresión tumoral. La remisión completa fue definida como la desaparición del tumor según la inspección visual y la ausencia de evidencia de tumor en el análisis histológico. La remisión parcial fue definida como una reducción en el tamaño tumoral. Progresión tumoral se definió como crecimiento tumoral y se interpretó como una falta de efecto terapéutico. La presencia de tejido precanceroso alrededor del tumor que da lugar al desarrollo de segundos tumores primarios impide el uso de este modelo para evaluar recurrencia. El estado clínico del animal y su peso corporal (Fig. 15) fueron monitoreados periódicamente a lo largo de todo el período de seguimiento.



**Figura 15:** En la foto A se observa la balanza de precisión donde se monitoreaba el peso corporal de los animales. La foto B muestra la medición con una regla milimetrada de los tumores tratados.

## RESULTADOS

### 1. Estudio de biodistribución

No se observaron signos visibles de toxicidad inducidos por los compuestos borados, administrados individualmente o en forma combinada, en ninguno de los animales en términos de cambios en el peso corporal, apariencia y comportamiento. Estudios previos de GB-10 realizados por Stelzer y col. (2001) y Díaz y col. (2002) y la extensa literatura sobre BPA (por ejemplo Kreimann y col., 2001) también presentan evidencia de la falta de toxicidad de estos compuestos borados en los rangos de dosis empleados.

Habiendo administrado GB-10 en una dosis de 50 mg B /kg pc se observó un pico de concentración media de boro en tumor de  $77.7 \pm 28.0$  ppm a los 20 min. post-administración, permaneciendo en  $31.9 \pm 21.4$  ppm a las 3 h. Los valores de sangre, tejido precanceroso, tejidos orales normales y piel no mostraron diferencias significativas con los valores de tumor (Tabla 10). El “clearance” en el tejido normal fue más rápido que en el tejido tumoral, por ejemplo, el valor medio de boro en la bolsa normal cayó a 28.8% del valor pico a las 3 h post-administración del GB-10, mientras que el valor medio de boro en tumor cayó solo al 41.1% del valor pico en el mismo tiempo (Tabla 10). No se observó una acumulación preferencial en hígado y bazo comparado con otros tejidos normales como por ejemplo la piel. Ciertos compuestos borados tales como las porfirinas boradas se acumulan preferencialmente en hígado y bazo (Kreimann y col., 2003). Si se ha demostrado que el compuesto no es tóxico en las dosis estudiadas, una acumulación preferencial en determinado órgano será relevante si el órgano se encuentra dentro del volumen de tratamiento. El pulmón incorporó GB-10 de forma similar a los tejidos orales normales y la piel. Los valores de cerebro y médula espinal permanecieron consistentemente bajos y por debajo de los valores de tumor en todos los puntos, dando diferencias estadísticamente significativas entre 20 min. y 3 h post-administración de GB-10 ( $p$  en un rango de 0.0000 a 0.0030 para cerebro versus tumor y de 0.0000 a 0.0133 para médula espinal versus tumor). A las 3 h post-administración la relación de concentración media de boro del Tumor / Cerebro fue de 22.8/1 y del Tumor / Médula Espinal de 17.7/1 (Tabla 10).

<i>Tejido / Tiempo</i>	<i>5' – 10'</i>	<i>15' – 20'</i>	<i>30' – 40'</i>	<i>60'</i>	<i>90'</i>	<i>2 h</i>	<i>3 h</i>	<i>4 h</i>	<i>6 h</i>
<i>Sangre</i>	120.5 ± 37.7 (n = 9)	90.0 ± 39.4 (n = 19)	75.0 ± 46.2 (n = 22)	62.9 ± 29.0 (n = 17)	52.9 ± 20.0 (n = 10)	41.2 ± 14.8 (n = 12)	31.8 ± 6.4 (n = 5)	37.3 ± 21.9 (n = 7)	20.7 ± 11.0 (n = 4)
<i>Tumor</i>	41.3 ± 21.3 (n = 6)	77.7 ± 28.0 (n = 7)	42.3 ± 20.7 (n = 16)	32.3 ± 8.3 (n = 8)	40.4 ± 13.5 (n = 12)	29.0 ± 18.5 (n = 15)	31.9 ± 21.4 (n = 11)	34.6 ± 25.9 (n = 12)	17.3 ± 7.9 (n = 10)
<i>Precanceroso</i>	44.3 ± 5.7 (n = 3)	83.2 ± 21.1 (n = 3)	64.0 ± 24.2 (n = 6)	42.5 ± 8.3 (n = 6)	41.8 ± 9.3 (n = 5)	25.5 ± 7.9 (n = 6)	34.3 ± 16.9 (n = 4)	38.3 ± 27.7 (n = 3)	17.9 ± 11.1 (n = 4)
<i>Bolsa normal</i>	55.4 ± 21.9 (n = 3)	74.9 ± 37.8 (n = 2)	49.3 ± 14.8 (n = 6)	43.8 ± 7.7 (n = 6)	37.7 ± 9.9 (n = 5)	25.1 ± 7.2 (n = 6)	21.6 ± 7 (n = 5)	34.4 ± 31.3 (n = 3)	14.8 ± 10.2 (n = 4)
<i>Mucosa de carrillo</i>	69.8 ± 9.9 (n = 3)	75.4 ± 21.1 (n = 3)	48.7 ± 15.2 (n = 6)	34.9 ± 9.8 (n = 5)	37.5 ± 10.1 (n = 4)	19.5 ± 2.9 (n = 5)	17.4 ± 8.4 (n = 5)	29.0 ± 18.6 (n = 3)	15.3 ± 10.2 (n = 3)
<i>Piel</i>	58.7 ± 26.8 (n = 3)	70.2 ± 35.5 (n = 3)	51.3 ± 3.5 (n = 6)	38.6 ± 10.7 (n = 6)	41.3 ± 12.4 (n = 5)	27.4 ± 9.7 (n = 5)	26.2 ± 10.5 (n = 5)	36.7 ± 27.7 (n = 3)	14.9 ± 9.0 (n = 4)
<i>Paladar</i>	99.8 ± 11.8 (n = 3)	97.2 ± 29.5 (n = 3)	55.6 ± 21.4 (n = 5)	58.5 ± 18.4 (n = 6)	45.7 ± 10.6 (n = 5)	31.0 ± 11.8 (n = 6)	27.1 ± 11.6 (n = 5)	37.6 ± 29.0 (n = 3)	19.0 ± 14.6 (n = 4)
<i>Lengua</i>	122.1 ± 72.1 (n = 3)	74.4 ± 10.1 (n = 3)	50.6 ± 23.9 (n = 6)	41.9 ± 19.6 (n = 5)	26.0 ± 21.0 (n = 4)	19.9 ± 5.4 (n = 6)	18.4 ± 11.7 (n = 5)	35.4 ± 14.7 (n = 3)	13.9 ± 10.2 (n = 3)
<i>Glándula parótida</i>	43.9 ± 33.6 (n = 3)	30.0 ± 13.5 (n = 3)	19.6 ± 11.1 (n = 6)	15.3 ± 4.3 (n = 6)	17.0 ± 8.2 (n = 3)	10.4 ± 5.5 (n = 6)	9.5 ± 4.1 (n = 5)	14.2 ± 6.1 (n = 3)	8.9 ± 7.0 (n = 4)
<i>Hígado</i>	95.0 ± 48.3 (n = 3)	90.0 ± 34.9 (n = 3)	87.8 ± 40.3 (n = 6)	72.8 ± 42.3 (n = 6)	42.7 ± 18.4 (n = 5)	44.1 ± 18.0 (n = 6)	27.9 ± 11 (n = 4)	13.8 ± 3.5 (n = 3)	33.0 ± 14.1 (n = 4)
<i>Bazo</i>	63.8 ± 10.2 (n = 3)	64.8 ± 27.5 (n = 3)	34.4 ± 7.0 (n = 6)	36.6 ± 11.3 (n = 5)	29.7 ± 8.8 (n = 5)	18.9 ± 5.7 (n = 6)	19.1 ± 8.3 (n = 5)	29.5 ± 21.5 (n = 3)	19.1 ± 14.9 (n = 4)
<i>Pulmón</i>	68.8 ± 32.9 (n = 2)	94.8 ± 7.3 (n = 2)	47.1 ± 9.6 (n = 5)	44.1 ± 12.1 (n = 6)	40.8 ± 11.8 (n = 5)	33.0 ± 15.8 (n = 6)	26.5 ± 23.1 (n = 5)	32.5 ± 21.8 (n = 3)	16.8 ± 9.6 (n = 3)
<i>Cerebro</i>	5.4 ± 2.7 (n = 3)	6.5 ± 2.1 (n = 3)	4.1 ± 1.2 (n = 5)	3.1 ± 1.6 (n = 6)	5.1 ± 4.2 (n = 5)	2.8 ± 2.3 (n = 6)	1.4 ± 1.1 (n = 5)	2.9 ± 1.8 (n = 3)	1.5 ± 0.7 (n = 4)
<i>Médula espinal</i>	16.2 ± 14.6 (n = 2)	9.2 ± 4.4 (n = 4.4)	7.9 ± 4.0 (n = 6)	5.4 ± 4.2 (n = 6)	7.4 ± 4.1 (n = 5)	2.9 ± 0.6 (n = 4)	1.8 ± 1.2 (n = 4)	2.2 ± 0.3 (n = 2)	7.7 ± 5.5 (n = 2)

**Tabla 10:** concentración de boro (ppm) en sangre y muestras de tejido a diferentes tiempos (indicado en minutos u horas) después de administrar GB-10 en una dosis de 50 mg B/kg pc. Los resultados están expresados como media ± DS. El número de muestras para cada condición se indica entre paréntesis.

## **2. Protocolo alternativo de administración de GB-10**

La administración de las dos dosis sucesivas de GB-10 mejoró la captación absoluta del tejido tumoral pero fracasó en proporcionar una ventaja en términos de una incorporación selectiva de boro en el tejido tumoral versus la bolsa de la mejilla normal. Si comparamos el protocolo de doble dosis de GB-10, 0.5-1 h post-administración, con el protocolo de administración elegido (única dosis de GB-10, 50 mg B/kg pc, i.v. en bolo), 3 h post-administración, vemos que la doble dosis aumenta la captación de boro en el tumor pero también aumenta proporcionalmente o más la incorporación de boro a los tejidos normales y al tejido precanceroso (Tabla 11).

## **3. Estudio de la incorporación de boro en función de la viabilidad tumoral**

A diferencia de la incorporación de BPA (Coderre y col., 1998), el análisis de la concentración de boro entregada por GB-10 en tejido tumoral predominantemente necrótico y predominantemente viable reveló que la captación del GB-10 no depende de la viabilidad celular. En un trabajo previo en nuestro laboratorio con la ahora Dra. Erica Kreimann, se registró una relación de incorporación de BPA para Tejido Tumoral Predominantemente Viable / Predominantemente Necrótico, en el mismo modelo de la bolsa de la mejilla del hámster, de aproximadamente 1.46 / 1 ( $32.0 \pm 13.5$  /  $18.5 \pm 2.0$ ) (Kreimann y col., 2001). Esta relación indicaría que el BPA deposita boro heterogéneamente en distintas zonas de un tumor heterogéneo. La relación de incorporación de boro para el caso de GB-10 en Tejido Tumoral Predominantemente Viable / Predominantemente Necrótico (V/N) fue de  $0.97 \pm 0.21$  / 1, indicando una captación marcadamente homogénea en las diferentes áreas tumorales (Tabla 12).

## **4. Protocolo de administración combinada de GB-10 + BPA**

Los resultados de la concentración de boro para los diferentes tejidos después de la administración combinada de GB-10 y BPA, de acuerdo con los protocolos descritos en Materiales y Métodos, se presentan en la Tabla 13a. Los datos correspondientes a la administración de los 2 compuestos en forma separada se presentan a fines comparativos en la Tabla 13b.

Tejidos	Protocolos de administración				
	<i>GB-10</i> 3 h post-adm. (n=4-5)	<i>GB-10</i> 1 h post-adm. (n=5-17)	<i>GB-10</i> →3h→ <i>GB-10</i> 0.5-1 h post-adm. (n=2-10)	<i>GB-10</i> 2 h post-adm. (n=4-15)	<i>GB-10</i> →3h→ <i>GB-10</i> 2 h post-adm. (n=2-7)
<i>Sangre</i>	31.8 ± 6.4	62.9 ± 29.0	98.0 ± 29.5	41.2 ± 14.8	43.2 ± 12.3
<i>Tumor</i>	31.9 ± 21.4	32.3 ± 8.3	79.0 ± 37.6	29.0 ± 18.5	49.1 ± 11.7
<i>Tejido precanceroso</i>	34.3 ± 16.9	42.5 ± 8.3	109.7 ± 20.8	25.5 ± 7.9	61.0 ± 10.2
<i>Bolsa normal</i>	21.6 ± 7	43.8 ± 7.7	76.1 ± 31.1	25.1 ± 7.2	53.5 ± 0.3
<i>Mucosa de carrillo</i>	17.4 ± 8.4	34.9 ± 9.8	84.5 ± 34.0	19.5 ± 2.9	44.0 ± 1.3
<i>Piel</i>	26.2 ± 10.5	38.6 ± 10.7	74.0 ± 12.0	27.4 ± 9.7	52.0 ± 4.7
<i>Mucosa de paladar</i>	27.1 ± 11.6	58.5 ± 18.4	130.4 ± 52.4	31.0 ± 11.8	65.8 ± 0.3
<i>Lengua</i>	18.4 ± 11.7	41.9 ± 19.6	108.2 ± 45.9	19.9 ± 5.4	46.6 ± 2.5
<i>Glándula parótida</i>	9.5 ± 4.1	15.3 ± 4.3	36.0 ± 14.3	10.4 ± 5.5	23.3 ± 2.3
<i>hígado</i>	27.9 ± 11	72.8 ± 42.3	268.2 ± 160.4	44.1 ± 18.0	108.7 ± 14.1
<i>Bazo</i>	19.1 ± 8.3	36.6 ± 11.3	74.0 ± 33.5	18.9 ± 5.7	78.6 ± 27.5
<i>Pulmón</i>	26.5 ± 23.1	44.1 ± 12.1	62.1 ± 45.3	33.0 ± 15.8	53.3 ± 6.5
<i>Cerebro</i>	1.4 ± 1.1	3.1 ± 1.6	7.6 ± 4.1	2.8 ± 2.3	4.1 ± 1.2
<i>Médula espinal</i>	1.8 ± 1.2	5.4 ± 4.2	20.9 ± 5.0	2.9 ± 0.6	8.1 ± 1.3
<i>Tumor/ Sangre</i>	1.0/ 1	0.5/ 1	0.8/ 1	0.7/ 1	1.1/ 1
<i>Tumor / Bolsa Normal</i>	1.5/ 1	0.7/ 1	1.0/ 1	1.2/ 1	0.9/ 1

**Tabla 11:** concentración de boro en sangre y muestras de tejido para la administración de dos dosis sucesivas de GB-10. A los fines comparativos se incluyen los datos correspondientes a las dosis únicas así como también a la dosis de GB-10 seleccionada para BNCT in vivo. En todos los casos la dosis de GB-10 administrada fue de 50 mg B/kg pc para cada inyección. Los resultados se expresan como media ± DS. El número de muestras para cada condición se indica entre paréntesis.

<i>Dosis GB-10 mg B/kg pc</i>	<i>Tiempo post-administ.</i>	<i>Tejido predominant. viable</i>	<i>Tejido predominant. necrótico</i>	<i>Relación ó Índice V/N</i>
50	20'	69.4	53.6 52.3	1.3
50	30'	28.8	60.4	0.5
		27.6	33.7	0.8
		29.0	32.0	0.9
		55.2	47.0	1.2
50	60'	25.1	27.2	0.9
		23.9		
50	90'	39.1	45.9	0.9
		36.3		
		47.1		
		44.8		
		28.2	33.6	0.8
50	2 h	44.5	33.8	1.3
50	3 h	26.6	31.7	1.05
		24.4		
		43.6		
		32.3		
		39.8		
34.5	3 h	18.4	17.0	1.02
		21.3		
		12.6		
50	4 h	60.2	75.8 62.5	0.9
50	6 h	7.1	7.5	1.0
		14.6	13.0	1.1
		15.6	16.6	0.9

**Tabla 12:** Concentración de boro (ppm) en tejido tumoral predominantemente viable y predominantemente necrótico en los casos en los que fue posible separar porciones representativas de estos de un mismo tumor para su evaluación en forma separada. Los casos en que se han registrado varios valores para tejido tumoral predominantemente viable corresponden a casos en los que fue posible dividir la porción viable de un único tumor en diferentes muestras para evaluarlas independientemente. La relación de incorporación de boro entregada por GB-10 fue: Tejido Predominantemente Viable / Tejido Predominantemente Necrótico (V/N) =  $0.97 \pm 0.21$ .

En el caso de los protocolos 1 y 2 parecería que en la administración combinada (BPA + GB-10) se estarían sumando en forma aproximadamente lineal las dosis separadas de estos compuestos en todos los tejidos excepto en el tumor donde la concentración de boro es menor. Este hallazgo podría sugerir un posible efecto antagónico de ambos compuestos en el tumor con este protocolo de administración combinada. El protocolo 3 involucra la administración de BPA durante 3h, simulando

una infusión, en combinación con la administración iv de GB-10 en bolo como se indicó en la sección de Materiales y Métodos, y produjo una mejora estadísticamente significativa ( $p= 0.0000$ ) en la captación media absoluta de boro en el tumor, comparado con el protocolo 2 donde el BPA se administró como una inyección ip en bolo (121.7 ppm vs. 59.7 ppm). Además, la relación de concentración media de boro del Tumor / Bolsa Normal subió de 1.6/1 (59.7/38.1) a 2.0/1 (121.7/61.6) (Tabla 13a). Parecería que la administración del BPA como una infusión simulada en combinación con el GB-10 produce un efecto sinérgico en cuanto a la incorporación de boro al tejido tumoral. Más específicamente, la concentración media de boro esperada, obtenida por la suma de los valores de los compuestos administrados en forma separada 14.5 ppm (GB-10, 34.5 mg B/kg pc) + 59.9 ppm (BPA 31 mg B/kg pc, en infusión simulada), sería de 74.4ppm. Sin embargo, el valor real correspondiente a la administración combinada fue de  $121.7 \pm 38.6$  ppm (Tabla 13a y b). A pesar de los grandes desvíos característicos de la heterogeneidad tumoral, se observó una llamativa mejoría en la incorporación de boro al tumor. La administración de BPA, solo o combinado con GB-10, produjo un aumento en los valores de concentración de boro en cerebro y médula espinal comparado con una dosis similar de GB-10 solo. Sin embargo, en todos los casos los valores de cerebro y médula espinal permanecieron muy por debajo de los valores en tumor. En particular, en el caso de la administración del GB-10 combinado con BPA como infusión simulada (protocolo 3) las relaciones de concentraciones medias de boro fueron 9.3/1 (121.7/13.1) para Tumor / Cerebro y 12.8/1 (121.7/9.5) para Tumor / Médula Espinal (tabla 13a).

Una vez evaluado el potencial terapéutico de los valores de biodistribución que resultaron de la administración de GB-10 y la administración combinada de GB-10 y BPA, se eligieron los protocolos 3 (GB-10 (34.5 mg B/ kg) + BPA (31 mg B/ kg, 3 h infusión)) y 4 (GB-10 (50 mg B/ kg)) para los estudios de BNCT y para el estudio de homogeneidad en la incorporación de boro en tumores heterogéneos (Tabla 13a y b). El protocolo de BPA que se empleó fue el utilizado por Kreimann y colaboradores en el 2001 (BPA (15.5 mg B/ kg)) (protocolo 5 de la Tabla 13b).

Tejidos	Protocolo de administración de compuestos borados		
	GB-10 (50 mg B/ kg) + BPA (15.5 mg B/ kg) GB-10: 3 h post-adm. y BPA: 3.5 h post-adm. Protocolo 1	GB-10 (34.5 mg B/ kg) + BPA (31 mg B/ kg) GB-10: 3 h post-adm. y BPA: 3.5 h post-adm. Protocolo 2	GB-10 (34.5 mg B/ kg) + BPA (31 mg B/ kg 3 h infusión) GB-10: 3 h post-adm. BPA: 1.5 h de finalizada la infusión Protocolo 3
Sangre	41.3 ± 11.1 n = 4	23.0 ± 4.6 n = 5	1.5 h infus, pre GB- 10: 7.8 ± 2.9, n = 3 Sacri. 47.9 ± 13.3, n=3
Tumor	42.7 ± 8.7 n = 9	59.7 ± 15.2 n = 21	121.7 ± 38.6 n = 12
Tejido precanceroso	49.5 ± 9.7 n = 4	45.9 ± 15.4 n = 5	58.3 ± 19.2 n = 3
Bolsa normal	41.9 ± 6.9 n = 4	38.1 ± 6.1 n = 5	61.6 ± 22.4 n = 3
Mucosa de carrillo	38.5 ± 12.1 n = 4	50.6 ± 17.2 n = 5	63.6 ± 10.6 n = 3
Piel	37.0 ± 18.2 n = 4	29.3 ± 13.2 n = 4	59.4 ± 3.1 n = 3
Mucosa de paladar	51.1 ± 12.0 n = 4	49.8 ± 17.4 n = 5	69.2 ± 13.0 n = 3
Lengua	37.6 ± 10.9 n = 4	35.2 ± 5.5 n = 4	52.0 ± 8.0 n = 3
Glándula parótida	19.3 ± 6.4 n = 4	17.7 ± 4.2 n = 5	27.1 ± 8.8 n = 3
Hígado	56.4 ± 17.9 n = 4	40.9 ± 20.1 n = 4	77.2 ± 13.7 n = 2
Bazo	27.6 ± 7.1 n = 4	30.6 ± 6.9 n = 4	59.6 ± 29.1 n = 3
Pulmón	46.1 ± 16.9 n = 4	38.2 ± 21.4 n = 5	53.6 ± 17.4 n = 3
Cerebro	7.5 ± 2.3 n = 4	13.3 ± 3.4 n = 5	13.1 ± 0.97 n = 3
Médula espinal	12.6 ± 6.9 n = 4	13.4 ± 0.9 n = 4	9.5 ± 2.0 n = 3
Tumor/ Sangre	1.0/ 1	2.6/ 1	2.5/ 1
Tumor / Bolsa Normal	1.0/ 1	1.6/ 1	2.0/ 1

**Tabla 13a:** Concentración de boro (media ± DS.) (ppm) en muestras de sangre y de tejido para los diferentes protocolos de administración como se indica.

<b>Tejidos</b>	<b>Protocolo de administración de compuestos borados</b>				
	<b>GB-10 (50 mg B/ kg) 3 h post-adm. Protocolo 4</b>	<b>BPA (15.5 mg B/ kg) 3.5 h post-adm. Protocolo 5</b>	<b>GB-10 (34.5 mg B/ kg) 3 h post-adm. Protocolo 6</b>	<b>BPA (31 mg B/ kg) 3.5 h post-adm. Protocolo 7</b>	<b>BPA (31 mg B/ kg 3 h infusión) 1.5 h de finalizada la infusión Protocolo 8</b>
<b>Sangre</b>	31.8 ± 6.4 n = 5	11.5 ± 4.1 n = 14	18.7 ± 5.6 n = 3	20.4 ± 4.2 n = 8	13.4 ± 0.3 n = 3
<b>Tumor</b>	31.9 ± 21.4 n = 11	33.3 ± 17.4 n = 26	14.5 ± 8.3 n = 25	64.3 ± 34.4 n = 12	59.9 ± 15.7 n = 12
<b>Tejido precanceroso</b>	34.3 ± 16.9 n = 4	19.6 ± 5.8 n = 8	27.3 ± 20.5 n = 4	19.6 ± 5.9 n = 5	30.0 ± 8.8 n = 3
<b>Bolsa normal</b>	21.6 ± 7 n = 5	14.4 ± 4.9 n = 12	25.2 0 ± 9.2 n = 4	19 ± 3.8 n = 8	33.7 ± 8.2 n = 3
<b>Mucosa de carrillo</b>	17.4 ± 8.4 n = 5	18.2 ± 8.9 n = 7	18.2 ± 10.7 n = 4	18.7 ± 5.1 n = 5	50.7 ± 35.6 n = 3
<b>Piel</b>	26.2 ± 10.5 n = 5	14.2 ± 8.3 n = 7	20.0 ± 10.1 n = 4	13.7 ± 5.4 n = 5	26 ± 16.6 n = 3
<b>Mucosa de paladar</b>	27.1 ± 11.6 n = 5	13.0 ± 4.3 n = 5	24.0 ± 14.9 n = 4	24.2 ± 12.4 n = 5	33.8 ± 4.5 n = 3
<b>Lengua</b>	18.4 ± 11.7 n = 5	14.1 ± 6.9 n = 6	18.4 ± 12.2 n = 4	14.3 ± 2.8 n = 5	28.7 ± 7.5 n = 3
<b>Glándula parótida</b>	9.5 ± 4.1 n = 5	4.3 ± 2.8 n = 3	5.1 ± 3.0 n = 4	11.0 ± 2.8 n = 3	14.3 ± 2.3 n = 3
<b>Hígado</b>	27.9 ± 11 n = 4	11.4 ± 4.5 n = 5	39.3 ± 33.2 n = 4	12.5 ± 5.4 n = 5	17.3 ± 0.6 n = 3
<b>Bazo</b>	19.1 ± 8.3 n = 5	12.9 ± 6.3 n = 6	15.3 ± 9.6 n = 4	14.8 ± 5.5 n = 5	20.2 ± 1.9 n = 3
<b>Pulmón</b>	26.5 ± 23.1 n = 5	6.2 ± 2.6 n = 3	21.6 ± 14.9 n = 4	12.0 ± 2.4 n = 3	16.1 ± 2.7 n = 3
<b>Cerebro</b>	1.4 ± 1.1 n = 5	6.1 ± 2.0 n = 3	0.6 ± 0.6 n = 3	6.9 ± 0.4 n = 3	10.1 ± 2.3 n = 3
<b>Médula espinal</b>	1.8 ± 1.2 n = 4	1.6 ± 1.3 n = 3	3.9 ± 2.9 n = 4	5.7 ± 0.8 n = 3	7.3 ± 1.8 n = 3
<b>Tumor / Sangre</b>	1.0/ 1	4.8/ 1	0.8/ 1	2.8/ 1	4.5/ 1
<b>Tumor / Bolsa Normal</b>	1.5/ 1	2.4/ 1	0.6/ 1	3.1/ 1	1.8/ 1

**Tabla 13b:** Concentración de boro (media ± DS.) (ppm) en muestras de sangre y de tejido para los diferentes protocolos de administración como se indica.

## **5. Estudio del grado de homogeneidad en la incorporación de boro en tumores heterogéneos**

Los tres protocolos de administración entregaron cantidades absolutas de boro terapéuticamente útiles al tejido tumoral. Sin embargo, los valores de la media de concentración absoluta de boro en tumor fueron más altos para el protocolo combinado (GB-10 + BPA) ( $63.2 \pm 21.0$  ppm) que para los protocolos de BPA ( $30.3 \pm 14.0$  ppm) o de GB-10 ( $18.1 \pm 7.0$ ) (Tabla 14). Las relaciones de concentración media de boro de Tumor / Tejido normal y de Tumor / Sangre revelaron que el BPA se incorporó preferentemente en el tumor mientras que el GB-10 fue virtualmente no selectivo (Tabla 13). El protocolo de administración combinada (GB-10 + BPA) exhibió un valor de selectividad intermedio entre los protocolos de administración de BPA y de GB-10.

El análisis estadístico de los valores de coeficiente de variación ( $V: [D.S./media] \times 100$ ) mostraron que el protocolo de administración combinada (GB-10 + BPA) entregó boro al tumor 3.3 veces más homogéneamente ( $p < 0.05$ ) que el BPA, y que el protocolo de GB-10 depositó boro en el tumor 1.8 veces más homogéneamente ( $p < 0.05$ ) que el protocolo de BPA. El grado de homogeneidad en la incorporación de boro en el tejido normal y tejido precanceroso fue similar para los tres protocolos de administración ( $p > 0.05$ ). La distribución de boro en estos tejidos histológicamente homogéneos fue relativamente homogénea independientemente del compuesto borado y el protocolo de administración empleados (Tabla 14).

## **6. Estudios de BNCT in vivo con baja dosis de irradiación**

### **Respuesta tumoral**

En la Tabla 15 se presenta la respuesta tumoral a BNCT mediado por GB-10 solo o combinado con BPA. Se clasificó el tamaño del tumor en el momento de la irradiación de acuerdo a tres rangos de tamaño tumoral definidos arbitrariamente, como se describe en Materiales y Métodos, para evaluar una potencial respuesta diferencial en relación con el tamaño. En algunos casos se observó un aumento inicial en el volumen tumoral seguido de una remisión parcial o total. Esta respuesta inicial ocasional fue reversible y se debería a una reacción inflamatoria y la inducción de edema en el tumor. La mayoría de los casos de remisión tumoral completa ocurrieron 14 días post-BNCT.

El control tumoral expresado como remisión parcial más completa fue de 75.5% para BNCT-GB-10 (Tabla 15A) y 64.8% para BNCT-(GB-10 + BPA) (Tabla 15B). Un ejemplo representativo de una remisión tumoral parcial se ilustra en la Figura 16. En este caso se observa una remisión parcial 7 días post-BNCT mediado por GB-10, donde el volumen tumoral se reduce de 42mm<sup>3</sup> a 11mm<sup>3</sup> (tumor superior en la foto) y de 45mm<sup>3</sup> a 35mm<sup>3</sup> (tumor inferior en la foto).

<i>Tejidos</i>	<i>Protocolo de administración de compuestos borados</i>		
	<i>BPA (15.5 mg B/kg b.w.)</i>	<i>GB-10 (50 mg B/kg b.w.)</i>	<i>BPA (31 mg B/kg b.w.) + GB-10 (34.5 mg B/kg b.w.)</i>
<i>Tumor</i>	[B]: 30.3 ± 14.0 ppm (n=25)	[B]: 18.1 ± 7.0 ppm (n=15)	[B]: 63.2 ± 21.0 ppm (n=32)
	V: 36.0 ± 35.7 (n=13)	V: 19.8 ± 15.3 (n=7)	V: 10.8 ± 7.2 (n=20)
<i>Tejido precanceroso</i>	[B]: 16.5 ± 4.0 ppm (n=13)	[B]: 20.1 ± 14.6 ppm (n=11)	[B]: 40.7 ± 14.2 ppm (n=12)
	V: 15.8 ± 6.7 (n=7)	V: 14.5 ± 4.0 (n=7)	V: 10.9 ± 6.6 (n=9)
<i>Bolsa normal</i>	[B]: 14.2 ± 3.5 ppm (n=13)	[B]: 15.9 ± 6.7 ppm (n=12)	[B]: 37.8 ± 17.8 ppm (n=12)
	V: 13.3 ± 4.3 (n=7)	V: 16.5 ± 8.9 (n=7)	V: 11.5 ± 4.0 (n=9)
<i>Sangre</i>	[B]: 9.10 ± 4.3 ppm (n=12)	[B]: 21.8 ± 9.8 ppm (n=12)	[B]: 30.1 ± 13.6 ppm (n=12)
<i>[B]: Tumor / Tejido normal</i>	2.1 ± 1.0 (n=12)	1.3 ± 0.4 (n=7)	1.8 ± 0.8 (n=11)
<i>[B]: Tumor / Sangre</i>	3.5 ± 1.7 (n=13)	0.9 ± 0.3 (n=7)	2.1 ± 0.6 (n=12)

**Tabla 14:** Concentración de boro y grado de homogeneidad en la deposición de boro para los diferentes tejidos y protocolos de administración. [B]: Concentración de boro. V: Coeficiente de variación. Los valores están expresados como media ± DS. El número de muestras está indicado entre paréntesis. En el caso de los valores de V, las medias fueron calculadas para cada grupo de valores de V disponible para cada tipo de tejido y protocolo.



**Figura 16:** Ejemplo de remisión tumoral parcial. En la foto de la izquierda se observan dos tumores pre-BNCT y en la foto de la derecha se observa una remisión parcial de ambos tumores a los 7 días post-BNCT.

Los valores más altos de concentración absoluta de boro en el tumor en el caso del GB-10 + BPA (Tabla 13a) nos permitió reducir el tiempo efectivo de irradiación a 17.3 minutos en comparación con los 49.5 minutos para GB-10 solo y de esa forma reducir la dosis de fondo. La dosis física resultante al tumor en el caso del BNCT-(GB-10 + BPA) fue aproximadamente 19% menos que para BNCT-GB-10. Dado que el control tumoral con BNCT-(GB-10 + BPA) fue 14% menos que con BNCT-GB-10, a una dosis física 19% menor, podríamos asumir que dosis físicas similares al tumor inducirían valores similares de control tumoral.

Sin embargo la dosis física concomitante al tejido normal en el caso del BNCT-(GB-10 + BPA) fue 60% menor que la dosis administrada al tejido normal en el caso del BNCT-GB-10 y la dosis concomitante a tejido precanceroso en el caso del BNCT-(GB-10 + BPA) fue el 50% de la dosis administrada al tejido precanceroso en el caso del BNCT-GB-10. Esto permitiría potencialmente realizar una escalada de dosis de irradiación con el protocolo BNCT-(GB-10 + BPA).

La Tabla 15 muestra que el porcentaje de remisión completa fue mayor para tumores pequeños que para tumores medianos con ambos protocolos de irradiación, (BNCT-GB-10 y BNCT-(GB-10 + BPA)). Los tumores grandes solo mostraron remisión parcial.

Solo uno de los 5 tumores sometidos al haz solo presentó una leve disminución en el tamaño. Los demás tumores continuaron creciendo.

**A:** GB-10 (50 mg B/kg pc) (Tiempo efectivo de irradiación: 49.5 min.)

<i>Tumores</i>	<i>Remisión parcial</i>	<i>Remisión completa</i>	<i>Control tumoral (remisión completa + parcial)</i>
<i>Total (n=57)</i>	47.4%	28.1%	75.5%
<i>Grandes: &gt;100 mm<sup>3</sup> (n=6)</i>	83.3%	0%	83.3%
<i>Medianos: 10-100 mm<sup>3</sup> (n=15)</i>	66.7%	6.7%	73.4%
<i>Chicos: &lt; 10 mm<sup>3</sup> (n=36)</i>	33.3%	41.7%	75%

**B:** GB-10 (34.5 mg B/kg pc) + BPA (31 mg B/kg pc 3 h infusión) (Tiempo efectivo de irradiación: 17.3 min.)

<i>Tumores</i>	<i>Remisión parcial</i>	<i>Remisión completa</i>	<i>Control tumoral (remisión completa + parcial)</i>
<i>Total (n=54)</i>	42.6%	22.2%	64.8%
<i>Grandes: &gt;100 mm<sup>3</sup> (n=11)</i>	54.6%	0%	54.6%
<i>Medianos: 10-100 mm<sup>3</sup> (n=12)</i>	66.7%	8.3%	75.0%
<i>Chicos: &lt; 10 mm<sup>3</sup> (n=31)</i>	29.0%	35.5%	64.5%

**Tabla 15:** Respuesta tumoral para cada protocolo. **A:** GB-10 (50 mg B/kg pc), **B:** GB-10 (34.5 mg B/kg pc) + BPA (31 mg B/kg pc 3 h infusión).

## 7. Respuesta del tejido precanceroso y normal

Este estudio reveló que ni BNCT-GB-10, ni BNCT-(GB-10 + BPA) indujeron daño radiotóxico a nivel macroscópico o histológico en el tejido normal. Las 10 bolsas normales tratadas con BNCT-GB-10 y las 10 bolsas normales tratadas con BNCT-(GB-10 + BPA) no se pudieron distinguir de las bolsas no tratadas, ni mediante inspección visual, ni mediante el análisis histológico. No se detectaron alteraciones macroscópicas ni histológicas en el tejido precanceroso con los protocolos de irradiación empleados en el presente estudio. Las 5 bolsas normales tratadas con el haz solo, no mostraron alteraciones macroscópicas ni microscópicas durante el período experimental. La piel de la mejilla expuesta a BNCT o al haz solo no presentó ningún daño en ninguno de los

tiempos experimentales. Ninguno de los animales irradiados (BNCT o haz solo) presentó signos de radiotoxicidad. No se observó ningún efecto significativo en el peso corporal en ninguno de los animales experimentales. Los animales del grupo irradiación simulada (sham) no presentaron ningún cambio.

## **8. Análisis histológico**

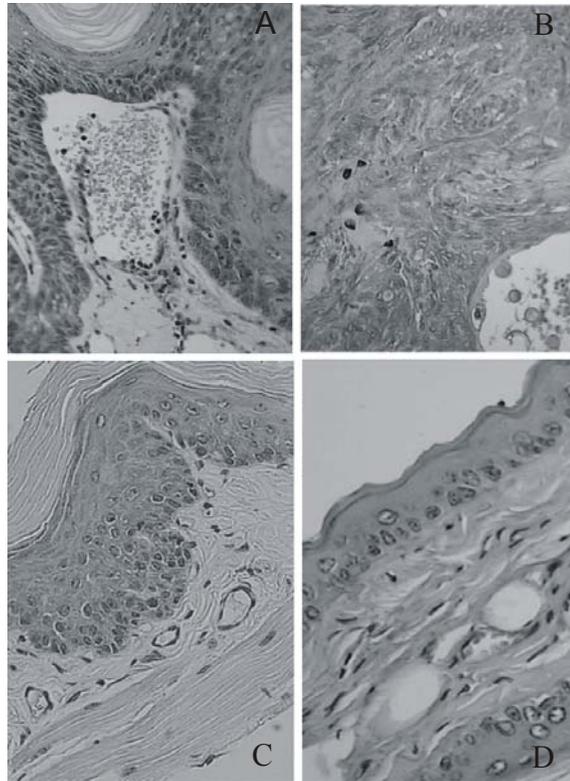
### **BNCT-GB-10**

El análisis por microscopía óptica de los tumores tratados con BNCT-GB-10 mostró un marcado daño en el estroma caracterizado por congestión, edema y conspicuas hemorragias causadas por la ruptura de la pared de los vasos (Fig. 17A). En el parénquima tumoral se observaron áreas de necrosis focal entre los cordones tumorales viables (Fig. 17B). El tejido precanceroso alrededor del tumor no mostró daño vascular ni alteraciones epiteliales significativas radioinducidas (Fig. 17C). La bolsa normal tratada con BNCT-GB-10 no exhibió alteraciones en el epitelio o en el tejido conectivo (Fig. 17D).

### **BNCT-(GB-10+BPA)**

Los tumores tratados con BNCT-(GB-10 + BPA) mostraron un menor daño vascular. El daño a las células tumorales fue más marcado que en los tratados con BNCT-GB-10. Se observaron áreas de necrosis focal y vacuolización celular entre cordones tumorales viables. El tejido precanceroso alrededor del tumor no mostró daño vascular pero sí presentó algunas alteraciones en las células epiteliales, como vacuolización y daño en la capa basal. La bolsa normal tratada con BNCT-(GB-10 + BPA) no exhibió alteraciones en el epitelio o en el tejido conectivo.

En ambos grupos se observaron extensas áreas de necrosis tumoral. En general, las conclusiones descriptas arriba fueron válidas para todos los tiempos post-tratamiento analizados.



**Figura 17:** imágenes de microscopía óptica (H & E, magnificación 250x). (A) Tumor tratado con GB-10 a los 21 días post-tratamiento, se puede observar la ruptura de la pared del vaso con los eritrocitos saliendo del lumen, alrededor, parénquima tumoral con células dañadas y viables. (B) Tumor tratado con GB-10 30 días post-tratamiento donde se observa áreas de necrosis focal entre los cordones viables. (C) Tejido precanceroso tratado con GB-10 a los 21 días post-tratamiento, donde no se observa daño en la pared de los vasos sanguíneos así como tampoco alteraciones epiteliales radioinducidas significativas. (D) Tejido normal tratado con GB-10 30 días post-tratamiento donde se observa la ausencia de alteraciones en el epitelio y en el tejido conectivo.

## 9. Estudios de BNCT in vivo con alta dosis de irradiación

### Respuesta tumoral

Habiendo demostrado la seguridad y el potencial terapéutico del BNCT con baja dosis de irradiación mediado por GB-10 solo y combinado con BPA, realizamos el presente estudio para evaluar la respuesta del tejido tumoral, precanceroso y normal a una dosis mayor de BNCT empleando los mismos protocolos de administración de compuestos borados con un tiempo de exposición más prolongado al haz de neutrones.

La respuesta tumoral al BNCT mediado por GB-10 solo o combinado con BPA se presenta en la Tabla 16 A y B. A fines comparativos, se han incluido datos sobre la

respuesta tumoral al BNCT-BPA (Kreimann y col., 2001) (Tabla 16 C). La respuesta tumoral se analizó para los tumores en su totalidad y clasificados por tamaño, según se describe en Materiales y Métodos. Los datos de BNCT-BPA publicados previamente se volvieron a analizar para discriminar la respuesta tumoral en relación al tamaño tumoral en el momento de la irradiación según los rangos de tamaño establecidos (chicos, medianos y grandes).

En algunos casos se observó un aumento inicial en el volumen tumoral seguido por remisión parcial o completa. Esta respuesta ocasional inicial fue reversible y sería consecuencia de reacciones inflamatorias e inducción de edema en el tumor. El control tumoral expresado como remisión parcial + completa, fue del 70.3% para BNCT-GB-10 (Tabla 16 A) y 92.8% para BNCT-(GB-10 + BPA) (Tabla 16 B). Un ejemplo representativo de una remisión tumoral completa y parcial se ilustra en la Figura 18. En este caso, en un tumor de 3 mm<sup>3</sup> pre-tratamiento (tumor superior de foto izquierda), se observa una remisión completa 7 días post BNCT-(GB-10 + BPA) notándose una pequeña úlcera (flecha) en el sitio donde estaba el tumor.

El tumor inferior (foto izquierda) con un volumen de 4 mm<sup>3</sup> sufrió una remisión parcial llegando a un volumen de 0.5 mm<sup>3</sup>.



**Figura 18:** Ejemplo de remisión completa y remisión parcial. La diferencia en la inclinación que se observa en la foto se debe al posicionamiento de la bolsa y a la diferencia entre los ángulos con los cuales se tomaron ambas fotos.

Los valores absolutos más altos de concentración de boro en tumor en el caso de (GB-10 + BPA) (Tabla 13a) permitieron reducir el tiempo de irradiación efectivo a 34.6 minutos en comparación con 74.5 minutos para GB-10 solo y reducir de esta forma la

dosis de fondo asociada, con aproximadamente la misma dosis a tumor (Tabla 7, Materiales y Métodos).

La relación entre la dosis de irradiación al tumor y la dosis de irradiación al tejido normal (tasa terapéutica) fue, como se esperaba, mayor para BNCT-(GB-10 + BPA) que para BNCT-GB-10, es decir 1.6 vs. 1.2.

El BNCT-(GB-10 + BPA) indujo una remisión tumoral completa total, es decir sin discriminar por el tamaño tumoral, mayor que el BNCT-GB-10, o sea 65.5% vs. 40.7%. BNCT-GB-10 y BNCT-(GB-10 + BPA) indujeron una remisión completa en tumores grandes del 25% y 33.3% respectivamente frente a ninguna remisión completa en tumores grandes tratados con BNCT-BPA. En el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster, clásicamente solo se dispone de un pequeño número de tumores grandes para su tratamiento y evaluación (Tabla 16). A pesar del pequeño tamaño muestral, es clara la tendencia que presenta la respuesta de los tumores grandes.

Para ambos protocolos de BNCT (Tabla 16 A y B) la remisión completa fue mayor en los tumores pequeños que en los medianos y grandes.

En el caso del BNCT-GB-10, 13% de los tumores, presentó remisión completa 1 día post-BNCT y 31.3% de los tumores presentó remisión completa 7 días post-tratamiento. Por lo tanto, la mayor parte de la remisión completa que tuvo lugar a lo largo de todo el período experimental (40.7% a los 30 días) ocurrió durante los primeros 7 días post-tratamiento. En el caso del BNCT-(GB-10 + BPA) 5.5%, de los tumores presentó remisión completa 1 día post-BNCT y 59.2% presentó remisión completa 7 días post-tratamiento. Por lo tanto, una vez más la mayor parte de la remisión completa que tuvo lugar a lo largo de todo el período experimental (65.5% a los 30 días) ocurrió durante los primeros 7 días post-tratamiento.

De los 15 tumores expuestos al haz solo durante 74.5 minutos el 26.7% presentó remisión parcial y el 26.7% presentó remisión completa. Los tumores restantes progresaron.

**A:** GB-10 (50 mg B/kg pc) (Tiempo efectivo de irradiación: 74.5 min.)

<i>Tumores</i>	<i>Remisión parcial</i>	<i>Remisión completa</i>	<i>Control tumoral (remisión completa + parcial)</i>
<i>Total (n=54)</i>	29.6%	40.7%	70.3%
<i>Grandes: &gt;100 mm<sup>3</sup> (n=3)</i>	33.3%	33.3%	66.6%
<i>Medianos: 10-100 mm<sup>3</sup> (n=8)</i>	37.5%	25.0%	62.5%
<i>Chicos: &lt; 10 mm<sup>3</sup> (n=43)</i>	27.9%	41.9%	69.8%

**B:** GB-10 (34.5 mg B/kg pc) + BPA (31 mg B/kg pc 3 h infusión) (Tiempo efectivo de irradiación: 34.6 min)

<i>Tumores</i>	<i>Remisión parcial</i>	<i>Remisión completa</i>	<i>Control tumoral (remisión completa + parcial)</i>
<i>Total (n=55)</i>	27.3%	65.5%	92.8%
<i>Grandes: &gt;100 mm<sup>3</sup> (n=4)</i>	50.0%	25.0%	75.0%
<i>Medianos: 10-100 mm<sup>3</sup> (n=12)</i>	66.7%	25.0%	91.7%
<i>Chicos: &lt; 10 mm<sup>3</sup> (n=39)</i>	12.8%	82.1%	94.9%

**C:** BPA (15.5 mg B/kg pc, i.p. en bolo) (*Kreimann y col., Cancer Research, 2001b*)

<i>Tumores</i>	<i>Remisión parcial</i>	<i>Remisión completa</i>	<i>Control tumoral (remisión completa + parcial)</i>
<i>Total (n=23)</i>	13.0%	78.3%	91.3%
<i>Large: &gt;100 mm<sup>3</sup> (n=2)</i>	100%	0%	100%
<i>Medium: 10-100 mm<sup>3</sup> (n=14)</i>	7.1%	78.6%	85.7%
<i>Chicos: &lt; 10 mm<sup>3</sup> (n=7)</i>	0%	100%	100%

**Tabla 16:** Respuesta tumoral para cada protocolo de tratamiento. **A:** GB-10 (50 mg B/kg pc), **B:** GB-10 (34.5 mg B/kg pc) + BPA (31 mg B/kg pc 3 h infusión), **C:** BPA (15.5 mg B/kg pc, i.p. en bolo).

## 10. Respuesta del tejido precanceroso y normal

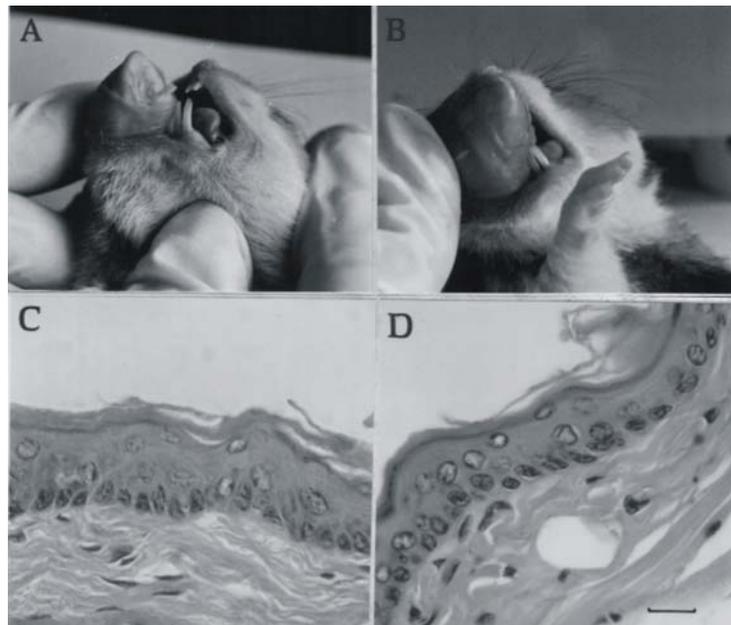
En algunos casos el tejido precanceroso alrededor del tumor, tratado con los

mismos protocolos de BNCT (BNCT-GB-10 y BNCT-(GB-10+BPA)), mostró una mucositis que luego remitió.

Las 10 bolsas normales tratadas con BNCT-GB-10 y las 10 bolsas normales tratadas con BNCT-(GB-10 + BPA) fueron indistinguibles de las bolsas normales no tratadas a nivel macroscópico e histológico (Fig. 19).

Las 5 bolsas normales tratadas con haz solo no mostraron alteraciones macroscópicas ni microscópicas hasta 6 meses post-tratamiento. La piel de la mejilla expuesta a BNCT (con los dos protocolos) o solo haz no exhibió ningún daño en ninguno de los tiempos experimentales.

Ninguno de los animales irradiados mostró signos de radiotoxicidad o alteraciones en el peso corporal a causa de la irradiación. Los animales de irradiación simulada (sham) no mostraron cambios respecto de los controles absolutos.



**Figura 19:** Se observa una bolsa normal a nivel macroscópico e histológico pre-BNCT (A y C) y 7 días post-BNCT (B y D). C y D: H & E, barra: 20  $\mu$ m.

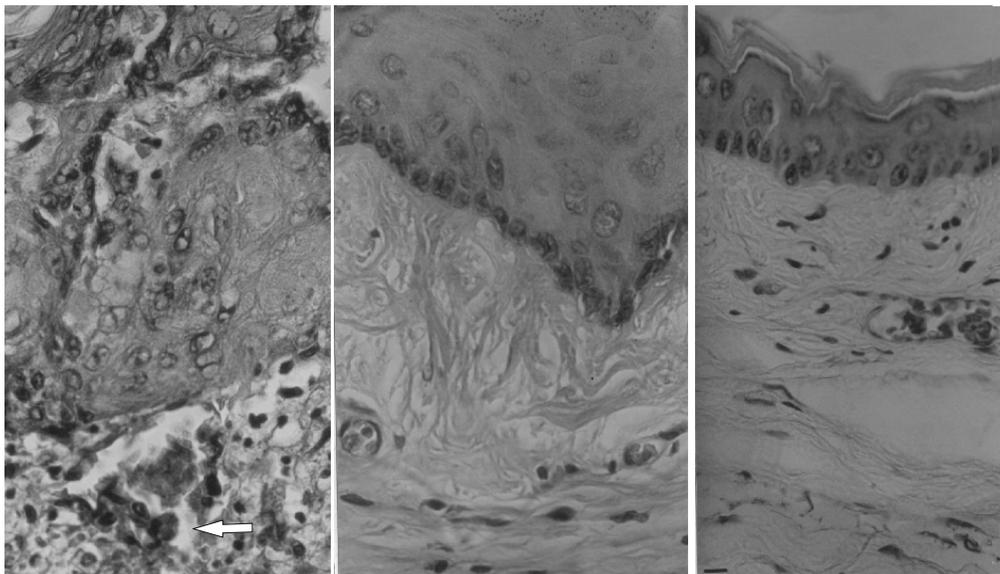
## 11. Análisis histológico

### BNCT-GB-10

El análisis por microscopía óptica de los tumores tratados con BNCT-GB-10 que presentaron remisión parcial, y, por lo tanto, estaban disponibles para ser estudiados, mostró áreas de necrosis focal de tamaño variable en el parénquima tumoral entre células tumorales viables (Fig. 20 izq.).

El estroma se caracterizó por una marcada hemorragia causada por la ruptura de las paredes de los vasos sanguíneos (Fig. 20 izq.), congestión y edema. El tejido precanceroso alrededor del tumor no mostró daño en los vasos sanguíneos y tampoco evidenció alteraciones radioinducidas significativas en las células epiteliales.

El tejido precanceroso dentro del volumen de tratamiento fue virtualmente indistinguible del tejido precanceroso no tratado (Fig. 20 centro). La bolsa normal tratada con BNCT-GB-10 no mostró ninguna alteración en el tejido conectivo o en el epitelio (Fig. 20 der.). En ninguno de los campos examinados del tejido precanceroso y normal detectamos algún caso de vaso sanguíneo dañado o roto.



**Figura 20:** imagen de microscopía óptica (H & E, magnificación 250X) del estroma del tumor (izquierda), tejido precanceroso (centro) y tejido normal (derecha) 21 días post-BNCT-GB-10. Panel izquierdo: CCE con áreas de necrosis en el parénquima (imágenes fantasma) entre núcleos viables. El estroma muestra un vaso sanguíneo con el característico daño endotelial (flecha) producto del BNCT-GB-10. Panel central: tejido precanceroso con hiperplasia epitelial característica y fibrosis subepitelial. El BNCT no indujo alteraciones en el epitelio ni en el tejido conectivo subyacente. Se observa el endotelio vascular intacto. Panel derecho: tejido normal con el epitelio característico de 2 o 3 capas de células y el tejido conectivo

subyacente. El BNCT no indujo ningún cambio en el epitelio ni en el tejido conectivo subyacente. Se observa el endotelio vascular intacto.

Los patrones descriptos arriba fueron consistentes en todas las muestras de tejido correspondientes a los distintos tiempos post-tratamiento evaluados.

#### BNCT-(GB-10 + BPA)

El análisis por microscopía óptica de los tumores tratados con BNCT-(GB-10 + BPA) que presentaron remisión parcial, y, por lo tanto, estaban disponibles para su estudio, también exhibieron áreas de necrosis focal de distinto tamaño en el parénquima tumoral junto con cordones tumorales viables. Sin embargo, el daño a las células tumorales, o sea, vacuolización y alteraciones de la capa basal, fue más marcada que en el caso de los tumores tratados con BNCT-GB-10. El daño vascular y las hemorragias fueron menos conspicuas que en el caso de los tumores tratados con BNCT-GB-10. Sin embargo, el daño vascular observado en el tejido tumoral fue un hallazgo consistente en todos los campos evaluados con microscopía óptica. El tejido precanceroso alrededor del tumor tratado con BNCT-(GB-10 + BPA) presentó una cierta vacuolización y daño en la capa basal en células epiteliales pero ningún daño vascular. Las bolsas normales tratadas con BNCT-(GB-10 + BPA) no presentaron ninguna alteración ni en el tejido conectivo ni en el epitelio. No se observó ningún daño vascular en el tejido normal tratado con BNCT-(GB-10 + BPA). Las observaciones mencionadas anteriormente son válidas para todos los tiempos post-tratamiento evaluados.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se demostró la efectividad de la terapia BNCT con dos protocolos de administración y dos compuestos borados con propiedades diferentes. Se alcanzaron valores de control tumoral tanto con GB-10 como con GB-10+BPA comparables con los valores de control tumoral obtenidos por este grupo con el BPA (Kreimann et al., 2001b), compuesto que se usa a nivel mundial en la clínica (Barth et al., 2005). También fue posible postular un nuevo paradigma en la radiobiología del BNCT. El fundamento tradicionalmente descrito para esta terapia es el requerimiento de la acumulación selectiva del compuesto borado en el tejido tumoral para lograr un efecto terapéutico en tumor sin radiotoxicidad en el tejido normal. En este estudio demostramos que es posible lograr un efecto selectivo en tumor con un compuesto borado que no se acumula preferencialmente en tumor.

El presente estudio describe la biodistribución del GB-10 en un modelo tumoral experimental sin barrera hematoencefálica (BHE). El hecho que el GB-10 no atraviese la BHE intacta se podría usar como ventaja para llegar selectivamente a tumores de cerebro que tienen la BHE dañada. En este sentido la captación selectiva del GB-10 por el tumor en relación con el tejido normal podría depender en principio de una BHE intacta en el tejido normal y una BHE patológicamente permeable en el tejido tumoral. De acuerdo con el paradigma tradicional, para que el BNCT sea terapéuticamente eficaz el compuesto borado debe llegar selectivamente al tejido tumoral (Coderre JA y col., 1998). En este sentido el GB-10 solo se podría seleccionar como portador de boro para BNCT en órganos protegidos por la BHE. Para que el BNCT sea exitoso debemos minimizar la dosis al tejido normal y maximizarla en el tejido tumoral. Las altas relaciones de concentración media de boro entre Tumor / Tejido Normal y Tumor / Sangre contribuyen a la eficacia terapéutica de BNCT. Sin embargo, el BNCT no será terapéuticamente efectivo si no se hace blanco en todas las células tumorales, independientemente de su posición en el tumor, su estado metabólico y su grado de viabilidad entre otras variables. Por lo tanto, la microlocalización y la acumulación diferencial del  $^{10}\text{B}$  son factores críticos para el resultado terapéutico del BNCT (Smith DR y col., 2001).

El BPA se incorpora selectivamente en el tejido tumoral con relación al tejido normal. Sin embargo, esta captación dentro del tumor es heterogénea ya que se realiza a través de un mecanismo activo que depende de la viabilidad de las células tumorales. La captación selectiva del BPA por las células tumorales se debería a un incremento en la tasa de transporte de aminoácidos a través de la membrana de la célula tumoral (Wittig A y col., 2000). Este fenómeno lleva a una distribución heterogénea de boro en tumores heterogéneos (Coderre JA y col., 1998, Kreimann EL y col., 2001, Patel H y col., 2000). Las células deficientes en BPA sobrevivirían al BNCT y comprometerían el control tumoral. El problema de la heterogeneidad sería más crítico en tumores de gran tamaño y explicaría la falta de control de tumores grandes tratados con BNCT-BPA. Por lo tanto, la administración combinada de compuestos borados con diferentes propiedades, podría contribuir a hacer blanco en todas las células tumorales y lograr una ventaja terapéutica del BNCT.

El análisis del grado de homogeneidad en la distribución de boro en el tejido juega un rol esencial en la optimización de los protocolos para lograr que la terapia por BNCT sea exitosa. A diferencia del BPA, la naturaleza difusiva del GB-10 contribuye a una distribución homogénea de boro en un tejido tumoral heterogéneo. La captación homogénea en diferentes porciones del tumor explicaría parcialmente el control tumoral alcanzado con BNCT-GB-10. Este fenómeno es similar al descrito previamente para BNCT-BSH y BNCT-(BPA+BSH) donde la distribución homogénea de  $^{10}\text{B}$  en las células tumorales jugaría un rol esencial en el control tumoral con BNCT (Ono K y col., 1999; Kato I y col., 2004). La gran homogeneidad en la distribución de boro con los tres protocolos de administración (BPA, GB-10 y BPA+GB-10), tanto en el tejido precanceroso como en el tejido normal, se debería a la homogeneidad histológica de estos tejidos que se diferencia notoriamente de la heterogeneidad característica de los tumores.

Dentro de este contexto y a pesar del hecho que a priori esperábamos que la acumulación del GB-10 fuera solo marginalmente selectiva en órganos que no están protegidos por la BHE, estudiamos la biodistribución y las propiedades del GB-10 en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster. El objetivo fue determinar su potencial como portador de boro para el tratamiento con BNCT en tumores de cabeza y

cuello e investigar la biodistribución en el tejido tumoral, precanceroso y normal de un compuesto químicamente no selectivo. El objetivo ulterior era estudiar el potencial terapéutico de GB-10 administrado en forma conjunta con el BPA, combinando así compuestos borados con propiedades diferentes que pudieran contribuir a la distribución homogénea del boro en tumores heterogéneos. Además, el hecho que el GB-10 haya sido propuesto como un agente para la terapia con neutrones rápidos potenciada por BNCT (BNCT-enhanced Fast Neutron Therapy) (Stelzer KJ y col., 2001, Nigg DW y col., 2000) para tumores profundos tales como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, confiere un valor particular a un estudio de biodistribución de GB-10 en un modelo tumoral experimental sin BHE.

Para que el BNCT sea efectivo, se estimó que las células tumorales deben contener como mínimo entre 15-30  $\mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$  de tejido (ppm) para que la dosis de captura neutrónica en boro en el tumor sea significativamente mayor que la dosis de irradiación de fondo y para que se produzcan suficientes reacciones de captura del neutrón térmico en el átomo de  $^{10}\text{B}$  con una fluencia estándar de neutrones para producir un efecto letal en la célula tumoral. Este valor de contenido de boro corresponde a una concentración atómica de boro de aproximadamente  $10^9$  átomos de  $^{10}\text{B}$  distribuida uniformemente en una célula tumoral (Coderre JA y col., 1999, Fairchild RG y Bond VP., 1985). Relaciones de concentración de boro bajas entre Tejido Tumoral / Normal y entre Tejido Tumoral / Sangre no son necesariamente un factor negativo para el uso de un compuesto como agente portador de boro para BNCT. La tasa terapéutica (dosis de irradiación al tumor en relación con la dosis de irradiación al tejido normal) de BNCT mejora en la medida que se obtienen mejores concentraciones absolutas de  $^{10}\text{B}$  tanto en el tumor como en el tejido normal. Esto se debe a que es posible reducir la fluencia de neutrones (disminuyendo el tiempo de irradiación) y obtener la misma dosis física absoluta de boro con una dosis de fondo menor atribuible a reacciones de captura en el  $^1\text{H}$  y  $^{14}\text{N}$  del tejido normal.

Los datos obtenidos del estudio de biodistribución del GB-10 muestran que los valores absolutos de boro en tumor se encuentran dentro de un rango terapéuticamente útil a lo largo del período de observación, entre 5-10 minutos y 6 hs. En particular, a las 3 hs. post-administración del compuesto la relación de concentración media de boro entre el

tumor y el tejido normal fue más favorable que en otros tiempos, probablemente debido a una diferencia en el clearance entre el tejido tumoral y el normal. Esta potencial diferencia en el clearance se podría aprovechar para obtener una acumulación selectiva de boro en el tumor. El intento de mejorar la selectividad administrando 2 dosis sucesivas de GB-10 no fue efectivo en términos de captación preferencial pero incrementó la captación absoluta. En forma similar se ha informado que 2 dosis intragástricas secuenciales de BPA son aditivas en cuanto a la acumulación de boro en el tumor, en gliosarcoma intracerebral en ratas, a pesar del hecho que no se incrementan las relaciones de concentración de boro Tumor / Tejido Normal y Tumor / Sangre (Coderre JA y col., 1991, Coderre JA y col., 1992). Es más efectivo tener altos niveles de  $^{10}\text{B}$  en el tumor a una relación fija Tumor / Tejido Normal debido a la posibilidad de disminuir la dosis de fondo reduciendo el tiempo de irradiación como fue mencionado previamente (Coderre JA y col., 1999).

Siendo la médula espinal y el cerebro tejidos limitantes de dosis para diferentes tipos de tumores, por ejemplo el glioblastoma, es ventajoso haber obtenido, con un compuesto borado como el GB-10, valores de concentración de boro consistentemente bajos en ambos tejidos. Ciertos compuestos, tales como las porfirinas boradas, se acumulan en el hígado en cantidades que exceden por lejos el contenido de otros tejidos normales (Kreimann EL y col., 2003). Aún si el compuesto no es hepatotóxico, esto es problemático cuando el hígado se encuentra dentro del volumen de tratamiento. Es una ventaja que el GB-10 no se acumule más en hígado, bazo y pulmón que en otros tejidos normales.

El modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster nos permite estudiar el comportamiento de la piel y de los tejidos orales. En pacientes, sería de suma importancia evaluar, o al menos estimar, la captación del boro en la mucosa oral y piel, más que extrapolarla del valor de sangre. El estudio de tejidos normales clínicamente relevantes, potencialmente limitantes de dosis, en un modelo animal adecuado como el que se describe aquí, puede contribuir a esclarecer y prevenir efectos colaterales en tejido normal anteriormente impredecibles y establecer las condiciones para erradicar tumores dentro del límite de tolerancia de los tejidos normales circundantes.

Los valores de boro en sangre disminuyeron progresivamente después de una única dosis de GB-10. Diaz y colaboradores (Diaz A y col 2002) mostraron un efecto similar en

humanos con una dosis de aproximadamente 30 mg  $^{10}\text{B}/\text{kg}$  pc administrado intravenosamente en pacientes. Obtuvieron valores de boro en sangre de aproximadamente 60 ppm a las 2 hs. post- administración de GB-10, mientras que en nuestro estudio, con una dosis de 50 mg  $^{10}\text{B}/\text{kg}$  pc en hámster se obtuvieron aproximadamente 40 ppm de boro en sangre a las 2 hs. post-administración. Dentro de este contexto, es claro que los valores que presentamos aquí no se pueden extrapolar directamente a pacientes. Dado que en pacientes no se dispone de valores de concentración de boro en tejidos, no se puede realizar un estudio comparativo. Sin embargo, el presente estudio proporciona un amplio rango de valores de biodistribución para sangre, tumor y tejido precanceroso y tejidos normales que podrían asemejarse a los valores de concentración de boro en un contexto clínico. En el estudio de biodistribución de GB-10 de Diaz y colaboradores (Diaz A y col 2002) 5 pacientes recibieron una dosis seguida por una infusión i.v. continua de GB-10 durante dos horas alcanzando una concentración de boro estable en sangre de 100 ppm. Los valores altos de B en sangre son potencialmente útiles para aumentar las reacciones de captura si el haz está circunscripto casi exclusivamente a la zona de tumor. En éste estudio, en el modelo de cáncer bucal en el hámster, no se ha estudiado la aplicación de una dosis seguida de una infusión continua. Valores excesivamente altos de B en sangre pueden llevar a una toxicidad inaceptable en el tejido normal expuesto al haz de neutrones en la terapia de BNCT.

El hallazgo que el tejido precanceroso que rodea al tumor incorpora considerables cantidades de B, justificaría el tratamiento de áreas con “cancerización de campo” alrededor del tumor (Slaughter P y col., 1953, Braakhuis BJM y col., 2003) con el objeto de reducir el riesgo de desarrollar tumores adicionales en el área. Sin embargo, es necesario explorar la naturaleza limitante de dosis de éste tejido en términos de efectos agudos. El hecho que se pueda utilizar el modelo de cáncer bucal en el hámster para estudiar el efecto del BNCT en el tejido precanceroso, como se demostró en nuestro laboratorio (Kreimann EL y col., 2001<sup>a</sup>, Kreimann EL y col., 2001<sup>b</sup>), es una ventaja para el estudio de BNCT respecto de otros modelos en los que se induce el desarrollo de tumores mediante el implante de células tumorales en tejido sano.

La captación heterogénea por tejidos tumorales heterogéneos no permite hacer una planificación exacta del tratamiento. La discrepancia entre la dosis real y la esperada, depende en gran medida de la diferencia que existe entre la concentración de boro obtenida y la estimada a partir de estudios previos. Una gran variabilidad de las concentraciones de boro crea problemas adicionales en el análisis de las respuestas biológicas (Raaijmakers PJ y col., 1995). El hecho que los tumores de la bolsa ocasionalmente sufren necrosis parcial espontánea, nos permite explorar la correlación entre la captación de GB-10 y la viabilidad en muestras seleccionadas de tumor con cantidades variables de tejido tumoral viable y pequeñas áreas de necrosis. Previamente demostramos que áreas tumorales predominantemente viables tendían a incorporar más BPA que áreas tumorales predominantemente necróticas, es decir  $36.9 \pm 17.5$  ppm versus  $25.2 \pm 18.5$  ppm respectivamente (Kreimann et al., 2001<sup>a</sup>). A pesar de la dispersión característica en los valores, la captación promedio de boro en tejido tumoral predominantemente viable sería aproximadamente 50% mayor que en tejido tumoral predominantemente necrótico. En el presente estudio, mostramos que el GB-10 es incorporado homogéneamente a todas las áreas tumorales, independientemente de su grado de viabilidad. Es fundamental que el boro llegue a todas las áreas de un tumor heterogéneo para lograr un control tumoral. En pacientes en los cuales no se logra un control tumoral a largo plazo, a pesar de haber recibido una dosis relativamente alta (40-55 Gy-eq), se podría atribuir cierto grado de fracaso terapéutico a una distribución no uniforme de  $^{10}\text{B}$  en las células tumorales (Chanana D y col., 1999). Serán necesarios estudios adicionales para evaluar el efecto de otras variables, que no se han estudiado hasta el momento, como el grado de diferenciación del tumor y el grado de vascularización, sobre la incorporación de boro en tumores viables.

El estudio de la administración combinada de GB-10 y BPA busca explorar la posibilidad de combinar propiedades diferenciales de diferentes compuestos borados para hacer blanco en todas las poblaciones tumorales e incrementar la potencial eficacia terapéutica de BNCT. La administración combinada de estos dos compuestos buscó aprovechar la captación selectiva del BPA por el tejido tumoral y la distribución homogénea del GB-10 en las diferentes áreas tumorales. El estudio de homogeneidad en la distribución de boro, en el cual se determinó la concentración de boro en diferentes muestras de tejido de un mismo tumor, demostró que con el protocolo de administración

combinada (BPA+GB-10) se alcanzó la deposición más homogénea de boro en las diferentes áreas tumorales. Además se obtuvieron los mejores valores absolutos de boro y la mejor relación Tumor / Tejido Normal con este mismo protocolo, administrando una dosis de GB-10 en combinación con una similinfusión de BPA. En otros modelos se ha demostrado que tiempos de infusión iv. más prolongados son más efectivos en entregar boro selectivamente al tejido tumoral (Joel D y col., 1999). En un protocolo clínico, la administración combinada de GB-10 y una infusión iv. de BPA podría mejorar la ventaja terapéutica del BNCT logrando la incorporación de boro a todas las áreas tumorales. De esta manera se reduciría la probabilidad de recurrencia y mejoraría las relaciones de concentración de boro Tumor / Tejido Normal. Asimismo, se podrían administrar dosis altas de irradiación al tumor reduciendo el riesgo de radiotoxicidad al tejido normal. Todavía resta aclarar qué mecanismos participan en este aparente efecto sinérgico entre el GB-10 y una infusión de BPA en relación con la captación de boro por el tumor. Una posible explicación sería que la inducción de un potencial aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos del tumor por uno de los agentes borados, podría favorecer la incorporación del otro.

Los elevados valores de concentración de boro obtenidos con GB-10 en sangre y tejidos en éste modelo y los valores consistentemente bajos en cerebro y médula espinal, sugerirían que el GB-10 sería un compuesto útil para la terapia con neutrones rápidos potenciada por BNCT (BNCT-enhanced Fast Neutron Therapy) en ciertas patologías, como por ejemplo el cáncer de pulmón de células no pequeñas. En particular los tumores en que los neutrones rápidos presentan una ventaja terapéutica parecen ser aquellos que fácilmente reparan el daño causado por la irradiación convencional de baja transferencia lineal de energía (bajo LET). Los efectos colaterales en tejido normal impiden seguir escalando la dosis de neutrones (Joel D y col., 1999). Es necesario incrementar la dosis de irradiación a las células tumorales sin incrementar la dosis a las células del tejido normal. Una forma de lograr esto es combinando BNCT con la terapia de neutrones rápidos (FNT).

La selectividad marginal de la captación del GB-10 en los tumores de la bolsa de la mejilla del hámster hace que a priori no sea un compuesto atractivo para probar por sí solo en BNCT in vivo en tumores experimentales de órganos que no están protegidos por la

BHE. Sin embargo, la deposición homogénea de boro en poblaciones tumorales heterogéneas confiere al GB-10 una potencial ventaja terapéutica que consideramos valioso analizar. En base a valores de CBE aproximados de 3.8 para el BPA (Coderre y Morris , 1999) y de 1 para el GB-10 (David Nigg, Comunicación personal) en otros modelos tumorales, esperábamos que la eficacia terapéutica del BNCT-BPA fuera aproximadamente 3 o 4 veces mayor que la del BNCT-GB-10. Sin embargo, en el estudio de BNCT in vivo con baja dosis de irradiación, el BNCT-BPA fue solo 1.2-2.8 veces más efectivo que el BNCT-GB-10 (Kreimann EL y col., 2001b), de acuerdo con el end-point estudiado en este modelo. Estos datos son sorprendentes dado que el GB-10, un compuesto no selectivo, produjo un significativo control tumoral en un tejido que no está protegido por la BHE y no causó alteraciones radioinducidas en tejido normal y precanceroso. En el estudio previo realizado en nuestro laboratorio con BNCT-BPA se demostró un notable control tumoral sin daño al tejido normal. Sin embargo, la terapia con este compuesto causó una mucositis reversible en el tejido precanceroso que no permitiría escalar la dosis de irradiación. El efecto del BNCT-BPA ocurriría vía un daño directo a las células y no vía alteraciones vasculares (Kreimann EL y col., 2001b). No se observó mucositis en el tejido precanceroso tratado con BNCT-GB-10 y BNCT-(GB-10+BPA) con los tiempos de irradiación de 49.5 minutos y 17.3 minutos, respectivamente, correspondientes al estudio con baja dosis de irradiación. Los presentes hallazgos histológicos sugerirían que el significativo control tumoral alcanzado con BNCT-GB-10, sin daño al tejido normal o precanceroso, se debería a un efecto diferencial sobre los vasos del tumor. El análisis histológico del tejido tratado con BNCT-GB-10 mostró un daño significativo en los vasos del tumor y virtualmente ningún daño en los vasos subyacentes al epitelio de la bolsa normal o al epitelio precanceroso. El daño a las células tumorales y por lo tanto el control tumoral serían en parte el resultado de una mala oxigenación resultante del daño a los vasos tumorales. Claramente hay una diferencia en la radiosensibilidad de los vasos tumorales respecto de los vasos del tejido normal y precanceroso. Desde el punto de vista puramente físico el CBE del GB-10 podría ser mayor en los vasos tumorales que en los vasos del tejido normal. La distribución de dosis en los vasos tumorales podría ser más cercana a la distribución de equilibrio de partículas cargadas que en el caso de los vasos del tejido normal, donde existe un gradiente de concentración de boro entre el interior del vaso, la lámina propia de las

células endoteliales y el tejido circundante. Esto ocurriría porque los vasos tumorales tienen normalmente un diámetro mayor que los vasos en el tejido normal. Por lo tanto, el efecto radiobiológico observado sería mayor en los vasos tumorales. La diferente radiosensibilidad de los vasos tumorales respecto de la de los del tejido normal y precanceroso, también se podría explicar desde el punto de vista biológico. Los vasos del tumor son estructural y funcionalmente anormales. En comparación con los vasos normales, la vasculatura tumoral es desorganizada y los vasos son tortuosos y dilatados. En cuanto a su ultraestructura los vasos tumorales también están alterados, sus paredes tienen numerosos orificios (endotelio fenestrado, vesículas y orificios transcelulares endoteliales), uniones interendoteliales ensanchadas y membrana basal discontinua o ausente. Por estos motivos los vasos tumorales son más permeables (Carmeliet y Jain, 2000). Dentro de este contexto los vasos tumorales pueden ser más sensibles al BNCT-GB-10 que los vasos del tejido normal y precanceroso. Por lo tanto, el efecto del GB-10 no se debería a una captación selectiva de éste por el tumor, sino a un efecto diferencial sobre los vasos. Como se ha descrito para el compuesto difusivo BSH (Ono y col., 1999) en un estudio de BNCT en SCCVII en ratones, el daño vascular y la distribución homogénea del  $^{10}\text{B}$  en células tumorales jugarían un rol definitorio en la cura tumoral al igual que en BNCT-GB-10.

Para llegar a las diferentes subpoblaciones de células tumorales (por ejemplo Barth y col., 2003) sería conveniente combinar varios compuestos borados. Dado que los mecanismos de captación tumoral y celular del GB-10 y del BPA son diferentes, resultaba atractivo combinar estos compuestos. Los resultados obtenidos con bajas dosis de irradiación indicaron que dosis físicas al tumor similares entregadas por BNCT-GB-10 y BNCT-(GB-10+BPA) resultaron en valores de control tumoral similares. Sin embargo, la dosis de irradiación a los tejidos normal y precanceroso que resultó de la administración combinada de estos compuestos borados fue aproximadamente 50-60% menor que la dosis entregada por el BNCT-GB-10, lo que permitiría escalar la dosis duplicando el tiempo de irradiación con el protocolo BNCT-(GB-10+BPA). Cabe mencionar que el tiempo de irradiación correspondiente al protocolo BNCT-(GB-10+BPA) fue aproximadamente 3 veces menor que el tiempo de irradiación correspondiente a BNCT-GB-10 dado que la concentración de boro en el tumor con (GB-10+BPA) fue 3-4 veces mayor que la determinada para el GB-10 ( $121.7 \pm 38.6$  ppm vs.  $31.9 \pm 21.4$  ppm respectivamente).

Además, la ausencia de mucositis, en ambos protocolos, tanto en el tejido normal como en el precanceroso, tejidos limitantes de dosis, justificaría la escalada de dosis. Nuestros hallazgos histológicos sugieren que en el caso del BNCT-(GB-10+BPA) el control tumoral sería el resultado del efecto directo sobre las células tumorales, posiblemente vía reacciones de captura neutrónica mediada por el BPA (Kreimann y col., 2001b) y del efecto indirecto sobre las células tumorales como consecuencia del daño vascular, posiblemente vía reacciones de captura neutrónica mediadas por el GB-10 en los vasos tumorales.

El hecho que el tejido precanceroso alrededor del tumor incorpora cantidades significativas de boro justificaría el tratamiento de áreas con cancerización de campo alrededor del tumor para reducir el riesgo de desarrollo de tumores adicionales en el área. Se han diseñado estudios (actualmente en curso) para explorar la dosis óptima tolerada necesaria para prevenir el desarrollo de nuevos tumores a partir del tejido precanceroso y alcanzar el control de los tumores existentes en el momento de realizar la terapia.

Habiendo demostrado la seguridad de los protocolos de BNCT-GB-10 y BNCT-(GB-10+BPA) con una dosis baja de irradiación, escalamos el tiempo de exposición en un 50% en el caso del BNCT-GB-10, incrementando la dosis física al tumor de  $5.28 \pm 0.41$  Gy a  $7.92 \pm 2.52$  Gy y escalamos el tiempo de exposición en un 100% en el caso del BNCT-(GB-10+BPA), incrementando la dosis física al tumor de  $4.26 \pm 0.39$  Gy a  $8.52 \pm 2.61$  Gy para determinar la eficacia terapéutica de estos protocolos y los efectos radiobiológicos sobre el tejido precanceroso y normal. Como hemos mencionado previamente los altos valores de captación de boro en el tumor cuando se administran en forma combinada el BPA y el GB-10, permiten entregar dosis de irradiación similares en el tumor con tiempos de exposición más cortos, es decir 34.6 minutos para el protocolo BNCT-(GB-10+BPA) comparado con 74.5 minutos para el protocolo BNCT-GB-10. Esto nos permite reducir la dosis de fondo en BNCT-(GB-10+BPA) y, en consecuencia, entregar dosis mayores al tumor a la vez que se disminuye la dosis al tejido precanceroso y normal.

Ambos protocolos de tratamiento han sido terapéuticamente muy efectivos y aparentemente inocuos para el tejido normal. A pesar del hecho que las dosis físicas al tumor fueron similares, la respuesta tumoral fue mayor con el BNCT-(GB-10+BPA) que

con BNCT-GB-10, o sea 92.8% comparado con 70.3%. La remisión tumoral completa total también fue mayor para BNCT-(GB-10+BPA) (65.5%), que para BNCT-GB-10 (40.7%).

Con la escalada de dosis del protocolo BNCT-GB-10 no se logró mejorar el control tumoral total (remisión completa + parcial), que permaneció alrededor de 70% igual que con la dosis baja. Sin embargo, se observó una tendencia favorable en la eficacia terapéutica respecto de los tumores grandes. Con la dosis baja de irradiación no se observó remisión completa de tumores grandes y solo 6.7% de remisión completa en tumores medianos, mientras que, con la dosis alta se observó remisión completa en 33.3% de los tumores grandes y 25.0% de los tumores medianos. Los valores de remisión completa total ascendieron de 28.1% a 40.7% al aumentar la dosis de irradiación. Por lo tanto el tratamiento con la dosis alta de irradiación indujo un control tumoral similar pero con una componente significativamente mayor de remisión completa.

La escalada de dosis del protocolo de BNCT-(GB-10+BPA) permitió mejorar el control tumoral total de 64.8% (dosis baja de irradiación) a 92.8%. Se observó una mejora notoria en los porcentajes de remisión completa. La remisión completa total aumentó de 22.2% (dosis baja de irradiación) a 65.5% al aumentar la dosis de irradiación, el valor de remisión completa para los tumores grandes ascendió de 0% a 25%, el valor para los tumores medianos ascendió de 8.3% a 25.0% y el valor para tumores pequeños ascendió de 35.5% a 82.1%. Mientras que en el BNCT-BPA no se observó ningún caso de remisión completa en los tumores grandes.

La dosis física total de los protocolos de BNCT de alta dosis osciló entre  $7.9 \pm 2.5$  y  $8.5 \pm 2.6$  Gy. El único informe en la literatura sobre el efecto terapéutico de irradiación X local sobre tumores de la bolsa de la mejilla del hámster totalmente desarrollados reveló que una dosis única de 20 Gy de rayos X causó un efecto terapéutico parcial pero indujo efectos colaterales inaceptables, o sea necrosis extensiva de la bolsa e inflamación en todos los casos y muerte espontánea a diferentes tiempos post- irradiación (hasta 39 días) en un número significativo (aunque no especificado) de animales (Horn Y y col., 1971). Si se usan estimaciones de la efectividad biológica relativa (RBE) para neutrones rápidos y protones inducidos (3.2) y factores de efectividad biológicas del compuesto (CBE) para el GB-10 y el BPA administrados solos y en combinación (1.4-3.8) basados en estudios

previos en este modelo (Kreimann EL y col., 2001b) para calcular una dosis estimada en unidades equivalentes de fotones, la dosis estimada total al tumor se aproxima a la dosis de rayos X citada. Las dosis totales estimadas de BNCT en unidades equivalentes de fotones que hemos usado son similares a las dosis usadas recientemente en un ensayo clínico de BNCT de carcinoma de células escamosas humano (12-20.7 Gy-eq) (Kato I y col., 2004). La alta efectividad biológica relativa de la componente de alto LET de BNCT y la capacidad de BNCT de hacer blanco biológicamente en las células tumorales serían en gran medida responsables de la ventaja terapéutica de la técnica. Los signos de eficacia terapéutica observados en algunos tumores tratados con haz solo estuvieron asociados a una extensiva progresión en otros tumores y a un deterioro en la alimentación. Estos hallazgos sugerirían que la componente de dosis boro sería la causa principal de la marcada eficacia terapéutica que hemos observado.

La gran variabilidad y heterogeneidad en las concentraciones de boro en muestras de tejido tumoral es un problema general en dosimetría de BNCT. Hasta ahora no existe una metodología no invasiva “on line” para estimar la concentración de boro durante el BNCT. Los análisis de muestras de tumor tomadas quirúrgicamente han mostrado una considerable variación en las concentraciones medias de boro, aún en múltiples muestras de pacientes individuales, que en gran medida se deberían a la diversidad biológica entre células patológicas, un flujo de sangre variable dentro del tumor y variabilidad entre organismo y organismo (Coderre JA y col., 1998; Gibson CR y col., 2003). De hecho, las relaciones de concentración de boro entre Tumor / Tejido Normal para carcinoma de células escamosas humano tratado con BNCT en un ensayo clínico reciente oscilaron entre 1.8 y 4.4 (Kato I y col., 2004). Por lo tanto los cálculos de dosis de irradiación al tumor se basan en múltiples supuestos relacionados con la biodistribución de boro que puede variar de paciente en paciente así como dentro de diferentes regiones del tumor y entre células tumorales. Los cálculos de dosis se tornan aún más complicados cuando se usan combinaciones de compuestos. Es imposible saber la verdadera biodistribución de cada droga o evaluar efectos sinérgicos o antagónicos en el momento de irradiar. En cambio las concentraciones de boro en tejido normal son mucho más predecibles y uniformes. Por lo tanto es seguro y confiable basar los cálculos de dosis en la tolerancia al tejido normal (Barth RF y col., 2005). Dentro de este contexto, hay una considerable e inevitable

incerteza en los cálculos de dosis al tumor (Tablas 6 y 7) que complica el análisis comparativo de la eficacia terapéutica de los diferentes protocolos. A pesar de estas incertezas, los presentes datos sugieren fuertemente que la combinación de compuestos borados usada es ventajosa y reduce la dosis de fondo al tejido normal y precanceroso.

La eficacia terapéutica del BNCT utilizando solo BPA en este modelo tumoral también fue alta (Kreimann EL y col., 2001b). Sin embargo, a pesar del hecho que los valores de remisión completa fueron altos, o sea 78.3%, no se observó remisión completa en tumores grandes. Además, no sería posible escalar la dosis física más allá de aproximadamente 5 Gy al tumor en el protocolo de BPA debido a la mucositis reversible observada en el tejido precanceroso alrededor del tumor (Kreimann EL y col., 2001b). Por lo tanto, se podría buscar mejorar potencialmente el éxito terapéutico administrando el BPA combinado con otro compuesto borado tal como el GB-10 como en este estudio. Esta estrategia tendería a compensar la entrega heterogénea de boro a distintas zonas del tumor con el BPA (Kreimann EL y col., 2001a).

El hecho que el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster se asemeja mucho al cáncer oral humano espontáneo es una ventaja dado que permite aproximarse a un contexto clínico de “la vida real”. Sin embargo, como se ha descrito previamente, los end points usados para evaluar la respuesta al BNCT tienen ciertas limitaciones. A pesar de estas limitaciones presentamos una clara evidencia de eficacia terapéutica sin signos de radiotoxicidad. Dentro de este contexto, este estudio proporciona datos sobre un modelo clínicamente relevante y por lo tanto inevitablemente complejo que permite realizar una extrapolación cautelosa a un escenario clínico. El modelo de cáncer oral en hámster permite incorporar mayor grado de complejidad al estudio, dando lugar a un análisis más completo del que permiten los end points empleados usualmente en estudios de BNCT en modelos de tumor implantado en tejido normal tal como un incremento en el tiempo de supervivencia de unos pocos días (Yang W y col., 1997) y una disminución en el crecimiento tumoral (Dagrosa MA y col., 2003).

El rol del GB-10 parece fundamental en el proceso de inducción de la remisión completa de tumores grandes. El daño a los vasos podría ser esencial en el control de tumores grandes que serían más difíciles de tratar “célula por célula”. Para la terapia

fotodinámica también se han descrito aspectos similares asociados con la heterogeneidad del microambiente tumoral y la distribución no homogénea del compuesto en las células tumorales y se han observado ventajas con un protocolo dual con efecto celular y vascular (Chen B y col., 2005).

El BNCT-GB-10 parece inducir la muerte de las células tumorales principalmente por un daño a la célula endotelial produciendo isquemia en el tejido tumoral en forma similar a lo descrito para la terapia fotodinámica (Fingar VH, 1996; Pogue BW y col., 2001). Podemos concluir que el GB-10, un compuesto borado que no llega selectivamente a las células tumorales en la bolsa de la mejilla del hámster, presenta efectos selectivos sobre el tumor sin dañar al tejido normal. Este hallazgo contradice al paradigma tradicional del BNCT (Morris GM y col., 2005) que atribuye a la captación selectiva de boro en el tumor el daño selectivo de este tejido. Los hallazgos histológicos que se han descrito aquí explicarían las remisiones tumorales alcanzadas con BNCT-GB-10 sin daño al tejido normal y precanceroso en términos de un efecto diferencial sobre los vasos tumorales.

## CONCLUSIONES

Podemos concluir que el uso combinado de GB-10 y BPA como agentes portadores de boro en BNCT podría mejorar la potencial eficacia terapéutica del BNCT. A pesar del hecho que la captación del GB-10 por tumores que no están protegidos por la BHE es solo marginalmente selectiva, la distribución homogénea del GB-10 en diferentes áreas del tumor y los elevados valores absolutos de boro en tumor, hacen que éste compuesto sea terapéuticamente útil para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello con BNCT.

La administración combinada de GB-10 y BPA permite alcanzar una mayor homogeneidad en la distribución de boro en las diferentes áreas tumorales dado que estos compuestos borados tienen diferentes propiedades y mecanismos de captación. La distribución homogénea del boro en tumores heterogéneos contribuiría a lograr un efecto terapéutico en todas las poblaciones de células tumorales evitando que queden áreas refractarias al tratamiento.

El GB-10, administrado individualmente, es un compuesto borado terapéuticamente útil para BNCT de cáncer oral. A pesar que no se incorpora selectivamente en las células tumorales en los estudios de BNCT in vivo descritos aquí casi sorprendentemente induce el control tumoral selectivo a la vez que protege al tejido normal. Esto ocurriría vía una acción selectiva sobre los vasos tumorales. El BNCT mediado por la administración combinada de GB-10 y BPA llevaría a una reducción de la dosis al tejido normal y permitiría por lo tanto escalar significativamente la dosis al tumor sin exceder la tolerancia al tejido normal.

Con los protocolos de alta dosis de irradiación mediados por GB-10 y (GB-10+BPA) se escaló 1.5-1.7 veces la dosis al tumor respecto de la dosis utilizada en BNCT-BPA. En este último protocolo no fue posible escalar la dosis debido a una severa (aunque reversible) mucositis observada en el tejido precanceroso alrededor del tumor tratado. La mucositis oral es un efecto colateral frecuente durante la radioterapia convencional de tumores de cabeza y cuello avanzados y sería una potencial limitante de dosis para BNCT de tumores de cerebro o de cabeza y cuello (Coderre JA y col., 1999). Dentro de este

contexto, los protocolos de BNCT que minimizan la mucositis entregarían dosis terapéuticas al tumor sin exceder la tolerancia del tejido normal y precanceroso.

El GB-10 y el BPA podrían combinar el daño vascular y celular respectivamente, optimizando la eficacia terapéutica de BNCT. El BNCT con la administración combinada de GB-10 y BPA, logra un mejor control tumoral probablemente a través de un efecto directo sobre las células tumorales, posiblemente por reacciones de captura mediadas por el BPA, y un efecto indirecto en las células tumorales como consecuencia del daño vascular, posiblemente debido a reacciones de captura mediadas por el GB-10.

El hecho que el GB-10 demostró ser un compuesto borado terapéuticamente útil por si solo a pesar de ser incapaz de entregar selectivamente boro a las células tumorales desafía el paradigma ortodoxo de la radiobiología del BNCT y abre el camino a futuros estudios de optimización que podrían mejorar la ventaja terapéutica del BNCT, explorando no solo la entrega selectiva de boro al tumor, sino el efecto selectivo del boro distribuido homogéneamente en tumor y tejido normal, un concepto que no ha sido considerado dentro de la complejidad de la radiobiología del BNCT.

## **ESTUDIO PRELIMINAR DE BNCT EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO ESPONTÁNEO EN PACIENTES FELINOS: UN ACERCAMIENTO PRECLÍNICO.**

### **INTRODUCCIÓN**

Habiendo demostrado que el BNCT indujo un control tumoral en carcinomas de células escamosas (CCE) experimentales de la mucosa de la bolsa de la mejilla del hámster sin daño al tejido normal, exploramos, dentro de un contexto preclínico, la factibilidad y seguridad del tratamiento de tumores de cabeza y cuello espontáneos en pacientes felinos terminales, enfocando especialmente en CCE, tumores del mismo tipo que los que inducimos experimentalmente en hámster.

El CCE es un tumor común que involucra la piel y representa aproximadamente 15% de los tumores cutáneos en gatos. Los CCEs se encuentran generalmente en piel no pigmentada o levemente pigmentada y en el gato se ubican preferentemente en áreas con poco pelo del plano nasal, párpados y pabellón de la oreja. Los CCEs pueden ser localmente muy invasivos y raramente producen metástasis. Antes de que el CCE progrese a un estadio invasivo generalmente se observa que la enfermedad transcurre durante un tiempo prolongado a través de los siguientes estadios: costra y eritema, erosiones superficiales y úlceras (carcinoma in situ) y finalmente lesiones profundamente invasivas y erosivas. Se han aplicado muchas modalidades terapéuticas al CCE de la piel facial en gatos. Las más comunes son cirugías y criocirugías. La radioterapia y la terapia fotodinámica se usan con eficacia variable. La quimioterapia presenta una escasa eficacia consistente. Los resultados generalmente son buenos para la mayoría de las modalidades si los tumores se tratan en un estadio precoz. Sin embargo, a medida que progresa la carcinogénesis el grado de invasión local puede ser bastante severo e impide lograr el éxito terapéutico. Los tumores en estadios más avanzados responden escasamente a todas las modalidades terapéuticas.

El objetivo de este trabajo fue realizar estudios de biodistribución con BPA y estudiar la factibilidad y seguridad del BNCT-BPA para el tratamiento en pacientes felinos terminales con tumores de cabeza y cuello enfocando especialmente en CCE espontáneo del plano nasal con dosis bajas de irradiación, empleando el haz térmico del reactor nuclear RA-1, ubicado en el Centro Atómico Constituyentes en la ciudad de Buenos Aires, y con una dosis más alta de irradiación, blindando el cuerpo del animal,

empleando el haz epitérmico termalizado del reactor nuclear RA-6, ubicado en el Centro Atómico Bariloche en la ciudad de San Carlos de Bariloche.

Estos estudios se realizaron en pacientes felinos sin opción a un tratamiento estándar debido al grado de invasión local del tumor o que fueron refractarios a los tratamientos estándares.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Pacientes Felinos**

Se establecieron los siguientes criterios de inclusión: un diagnóstico clínico e histopatológico de cáncer de cabeza y cuello y una evaluación clínica del caso indicando que las terapias estándares no eran una opción válida de tratamiento.

En el primer estudio de BNCT con baja dosis de irradiación en el RA-1 se incluyeron tres gatos con cáncer de cabeza y cuello terminal y en el estudio con una dosis más alta de irradiación en el RA-6, donde se blindó el cuerpo del animal, se incluyeron otros tres gatos con CCE avanzado de plano nasal.

Siempre que fue posible se realizaron análisis bioquímicos de sangre para determinar mejor el estado clínico del animal. La evaluación de los tumores se realizó por inspección visual, ya que no fue posible realizar una tomografía computada para animales. Los dueños de los gatos firmaron un consentimiento informado. El estudio se llevó a cabo en cumplimiento con las regulaciones locales e institucionales de protección de animales. Cuando fue posible se realizó un estudio de biodistribución previo al tratamiento con BNCT.

#### **Paciente 1 (Negrita):**

Hembra adulta de edad desconocida, con un peso aproximado de 5.5 kg., con un tumor muy agresivo, localmente invasor en la zona de la ceja. El diagnóstico histopatológico fue neurofibroma/neurinoma con algunas áreas fibrosas y zonas muy vascularizadas, con un tiempo de evolución de aproximadamente 2 años. La gata ya había sufrido 3 cirugías y ablación de un ojo y el tumor había vuelto a recidivar (Fig. 3 A). Las terapias estándares ya no eran una opción válida de tratamiento.

**Paciente 2 (Buffy):**

Hembra adulta de 13 años de edad, con un peso aproximado de 5.5 kg., en estadio terminal con una lesión ulcerativa, invasiva y sangrante en la zona nasal con diagnóstico de CCE semidiferenciado grado 2-3 con sectores con muchas atipías nucleares y sin zonas de necrosis tumoral, con un tiempo de evolución aproximado de 1 año y medio (Fig. 4 A y C). La gata presentaba muy mal estado general con astenia, dificultad respiratoria y anorexia. Se realizó directamente el tratamiento del tumor por BNCT-BPA, ya que el estado clínico de la gata no permitía hacer un estudio de biodistribución previo. En el momento previo a realizar el estudio de BNCT *in vivo* se tomaron muestras de tumor, tejido normal y sangre para tener algunos datos de biodistribución de BPA.

**Paciente 3 (Minnie):**

Hembra adulta de 12 años de edad, con un peso aproximado de 5 kg., con una lesión ulcerativa, invasiva y sangrante en la zona nasal (Fig. 5 A) con diagnóstico de CCE indiferenciado infiltrante con muchas atipías y mitosis (Fig. 5 C), con un tiempo de evolución aproximado de 5 años desde la detección de la primera lesión. La gata recibió 2 ciclos de quimioterapia 9 meses antes con un escaso control tumoral.

**Paciente 4 (Rulito):**

Macho adulto de edad desconocida, demasiado delgado para su tamaño con un peso aproximado de 4 kg. y falta de apetito. Se observó una gran masa tumoral localmente invasiva en el área de la nariz, con diagnóstico histopatológico de CCE semi-diferenciado (Fig. 6 A). El tumor mostraba un crecimiento activo con numerosas figuras mitóticas, escaso estroma y abundante parénquima (Fig. 6 C). Los análisis de laboratorio arrojaron valores dentro de los rangos de referencia excepto un bajo valor de hematocrito de 22% (valor de referencia 35-55%).

**Paciente 5 (Mario):**

Macho adulto de edad desconocida, con un peso aproximado de 7 kg. La inspección visual mostró un tumor mediano en el área de la nariz, con diagnóstico histopatológico de CCE semi-diferenciado grado 2-3 (Fig. 7 A y C). Los análisis de laboratorio arrojaron valores dentro de los rangos de referencia.

### **Paciente 6 (Michi):**

Hembra de 14 años de edad con un peso aproximado de 5,5 kg. La inspección visual mostró un tumor mediano en el área de la nariz, con diagnóstico histopatológico de CCE indiferenciado (Fig. 8 A y C). Los análisis de laboratorio arrojaron valores dentro de los rangos de referencia. Los valores de urea en sangre fueron de 55mg/dl, levemente mayor que los valores de referencia (14.00-40.00 mg/dl).

## **2. Estudio de biodistribución con BPA**

Se administró una solución 0.14M de L-BPA-fructosa (>98% de 10B enriquecido) por vía intravenosa durante aproximadamente 15-20 min. en una dosis de 300 mg/kg de peso corporal. Se tomaron muestras de sangre (de 0.2 ml por duplicado) antes de la infusión, al finalizar la infusión y 30 min., 1, 2 y 3 hs. después de finalizada la infusión bajo leve anestesia de Ketamina-Xilazina. Los animales se anestesiaron con Ketamina-Xilazina 3 hs. después de finalizada la infusión. El cirujano tomó una o más (cuando fue posible) muestras del tumor, una muestra de mucosa labial y/o una muestra de piel del dorso y en un caso (paciente 2) una muestra de pabellón de oreja infiltrado con tumor. En el caso del paciente 1 también se tomó una muestra de saliva y 2 muestras de orina. En el caso del paciente 4 se sacó una gran porción de tumor por criocirugía para facilitar la respiración. Todas las muestras se pesaron inmediatamente. Las muestras de tejido se guardaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y las muestras de sangre a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta procesarlas. El análisis de boro se realizó por espectroscopia de emisión óptica con plasma inductivo (ICP-OES). Las muestras de tejido ( $\leq 50\text{mg}$ ) se digirieron a temperatura ambiente durante toda la noche en 0.2 ml de una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico y nítrico concentrados. Una vez completado el proceso de digestión se agregaron 0.6 ml de una solución de detergente Tritón X-100 al 5% en agua y 0.2 ml de Ytrio-Estroncio como estándar interno y se obtuvo una solución clara para el análisis por ICP-OES (Coderre JA y col., 1998).

Las muestras de sangre (200-300 $\mu\text{l}$ ) se digirieron a temperatura ambiente durante toda la noche con 1 ml de una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico y nítrico concentrados. Una vez completado el proceso de digestión se agregaron 3 ml de una solución de detergente Tritón X-100 al 5% en agua y 1 ml de Ytrio-Estroncio como estándar interno. Un mililitro de la solución resultante se midió por ICP-OES.

Los valores obtenidos en el ICP-OES fueron corregidos por la masa de la muestra.

### **3. BNCT in vivo**

Habiendo demostrado una captación selectiva de boro en el tumor, dentro de rangos de valores absolutos terapéuticamente útiles en carcinoma de células escamosas experimental procedimos a realizar BNCT aproximadamente 1-5 semanas después del estudio de biodistribución.

Los primeros tres pacientes (Negrita, Buffy y Minnie) se irradiaron con el haz térmico del Reactor RA-1 del Centro Atómico Constituyentes de la Ciudad de Buenos Aires, con un flujo de aproximadamente  $3 \times 10^8$  n/cm<sup>2</sup>s en el área del tumor de acuerdo con los datos preliminares de mediciones realizadas con Nigg DW y col. (ANES 2004). La configuración geométrica actual no involucra un blindaje del cuerpo. Se construyó un dispositivo “ad hoc” para trasladar los animales a la salida del haz a través de la columna térmica (Fig. 1). Los animales se inyectaron por vía intravenosa con BPA durante aproximadamente 15-20 min. con una dosis de 300 mg/kg pc como se describe en el estudio de biodistribución. Los animales se irradiaron bajo anestesia con Ketamina-Xilazina, 3 hs. post-administración de BPA. Las irradiaciones duraron 10 min. resultando en una fluencia aproximada de neutrones térmicos de  $1.8 \times 10^{11}$  n/cm<sup>2</sup> y una dosis gamma total de  $0.28 \pm 0.06$  Gy en el área del tumor. El paciente 3 se trató una segunda vez con BNCT, 7.5 meses después del primer tratamiento.

Los tres últimos animales (Rulito, Mario y Michi) se transportaron en avión a la ciudad de San Carlos de Bariloche (1200 km al SE de Bs.As.), para ser irradiados con el haz de neutrones epitérmico termalizado del Reactor Nuclear RA-6 (Calzetta O y col., 2002). Este haz provee un adecuado espectro de neutrones para BNCT de tumores considerablemente superficiales. Además, la facilidad nos permite exponer el área del tumor (e inevitablemente parte de la cabeza) y blindar el resto del cuerpo.



**Figura 1:** Dispositivo “ad hoc” para trasladar los animales a la salida del haz en el RA-1. Se encuentra posicionado el paciente 1 (Negrita).

Los animales se inyectaron por vía intravenosa con BPA durante aproximadamente 15-20 min. con una dosis de 300 mg/kg pc como se describe en el estudio de biodistribución. Los animales se irradiaron bajo anestesia con Ketamina-Xilazina, 3 hs. post-administración de BPA. El área nasal e inevitablemente la cabeza se colocó en el puerto del haz de 15 cm de diámetro (Fig. 2). El resto del cuerpo quedó blindado por el plomo y polietileno borado que delimitan el haz. El flujo promedio de los neutrones térmicos para el tumor y los tejidos sanos en la posición de irradiación fue  $3.4 \pm 0.3 \times 10^8$  n/cm<sup>2</sup>s. La irradiación duró 40 min. resultando en una fluencia aproximada de neutrones térmicos de  $8.2 \times 10^{11}$  n/cm<sup>2</sup>.



**Figura 2:** Posicionamiento en el puerto del haz de 15 cm de diámetro en el RA-6.

Las Tablas 1 y 3 presentan las dosis físicas absorbidas estimadas de las diferentes componentes de irradiación para los diferentes animales tratados en el RA-1 y RA-6 respectivamente. La dosis boro se calculó en ambos casos teniendo en cuenta el contenido de boro en el tumor y en el tejido normal obtenidos de los estudios de biodistribución. Las Tablas 2 y 4 muestran las dosis físicas absorbidas totales para los diferentes animales tratados en el RA-1 y RA-6 respectivamente.

Paciente felino / Dosis	Dosis de neutrones de fondo (Gy)	Dosis Gamma (Gy)	Dosis Boro (tumor) (Gy)	Dosis Boro (tej. Normal) (Gy)
Paciente 1 (Negrita)	0.70 ± 0.14	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.08 ± 0.006
Paciente 2 (Buffy)	0.70 ± 0.14	0.13 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.06 ± 0.005
Paciente 3 (Minnie)	1 <sup>er</sup> BNCT	0.70 ± 0.14	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.01
	2 <sup>o</sup> BNCT	0.70 ± 0.14	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.01

**Tabla 1:** Dosis física absorbida para los pacientes felinos tratados en el RA-1.

Paciente felino / Dosis	Tejido Tumoral (Gy)	Tejido Normal (Gy)
Paciente 1 (Negrita)	0.96 ± 0.18	0.91 ± 0.17
Paciente 2 (Buffy)	1.07 ± 0.19	0.90 ± 0.15
Paciente 3 (Minnie)	1 <sup>er</sup> BNCT	0.94 ± 0.18
	2 <sup>o</sup> BNCT	0.98 ± 0.18

**Tabla 2:** Dosis física total absorbida para los pacientes felinos tratados en el RA-1.

Paciente felino / Dosis	Neutrones rápidos (Gy)	Dosis Gamma (Gy)	Dosis Boro (tumor) (Gy)	Dosis Boro (Tej. normal) (Gy)	Protones inducidos (Gy)
Paciente 4 (Rulito)	0.60 ± 0.07	2.40 ± 0.12	2.54 ± 0.35	1.31 ± 0.08	0.25 ± 0.01
Paciente 5 (Mario)	0.60 ± 0.07	2.40 ± 0.12	1.85 ± 0.09	1.08 ± 0.05	0.25 ± 0.01
Paciente 6 (Michi)	0.60 ± 0.07	2.40 ± 0.12	1.16 ± 0.10	0.95 ± 0.05	0.25 ± 0.01

**Tabla 3:** Dosis física absorbida para los pacientes felinos tratados en el RA-6.

Paciente felino / Dosis	Tejido Tumoral	Tejido Normal
Paciente 4 (Rulito)	5.79 ± 0.39	4.56 ± 0.16
Paciente 5 (Mario)	5.10 ± 0.17	4.33 ± 0.15
Paciente 6 (Michi)	4.41 ± 0.18	4.20 ± 0.15

**Tabla 4:** Dosis física total absorbida para los pacientes felinos tratados en el RA-6.

Tomando como factores de peso para cada componente de dosis un valor de efectividad biológica relativa (RBE) de 3.2 para neutrones rápidos, protones inducidos y dosis de neutrones de fondo, un factor de efectividad biológica del compuesto (CBE) de 3.8 para la componente de dosis de irradiación de boro (BPA) en el tumor, un factor CBE de 2.5 para la componente de dosis de irradiación de boro (BPA) en el tejido

normal y un valor de RBE de 1 para fotones (Coderre and Morris, 1999; IAEA-TECDOC-1233), la dosis total en tumor se estimó en los animales tratados en el RA-1 con una dosis baja de irradiación (10 min. de irradiación) en 2.85 Gy-Eq para el paciente 1 (Negrita), 3.26 Gy-Eq para el paciente 2 (Buffy) y 2.78 Gy-eq /1er BNCT y 2.91 Gy-Eq / 2° BNCT para el paciente 3 (Minnie), y en los animales tratados en el RA-6 con mayor dosis (40 min. de irradiación) en 14.8 Gy-Eq para el paciente 4 (Rulito), 12.2 Gy-Eq para el paciente 5 (Mario) y 9.5 Gy-Eq para el paciente 6 (Michi). La dosis total al tejido normal se estimó en 2.56 Gy-Eq para el paciente 1 (Negrita), 2.50 Gy-Eq para el paciente 2 (Buffy), 2.53 Gy-Eq / 1er BNCT y 2.58 Gy-Eq / 2° BNCT para el paciente 3 (Minnie) para los tres pacientes tratados en el RA-1. La dosis total al tejido normal para los animales tratados en el RA-6 se estimó en 8.4 Gy-Eq para el paciente 4 (Rulito), 7.8 Gy-Eq para el paciente 5 (Mario) y 7.5 Gy-Eq para el paciente 6 (Michi). Cabe destacar que no se conoce el factor CBE real para CCE del plano nasal felino. Sin embargo, algunos valores relevante de la literatura para estimar los CBE en tejido normal oscilan entre 2.4 en piel de hámster (Hiratsuka y col.,1991), 2.5 en piel humana (Coderre and Morris, 1999), 3.2 en piel de rata y 2.5 en mucosa de rata (IAEA-TECDOC-1233). Es importante resaltar que las dosis mencionadas son solo estimaciones. El uso de aproximaciones de los valores de RBE y CBE y el hecho que las concentraciones de boro se extrapolan de estudios de biodistribución previos, porque hasta la fecha no se dispone de una metodología en tiempo real no invasiva para estimar la concentración de boro durante el BNCT, impide un cálculo de dosis exacto.

#### **4. Seguimiento**

En todos los casos se realizó periódicamente el seguimiento de la evolución del tumor y del estado clínico de los animales. En un tiempo representativo se tomó una biopsia del área del tumor post-BNCT. Se realizaron autopsias de los pacientes después de la eutanasia. Se evaluaron efectos radiotóxicos en términos de signos clínicos, tales como presencia de síndrome gastrointestinal, síntomas de compromiso neurológico tales como convulsiones, ataxia y falta de coordinación, trastornos del comportamiento, pérdida regional del pelo y congestión periférica y hallazgos de la autopsia compatibles con toxicidad radioinducida tal como ulceraciones intestinales y gástricas, ascitis, depósitos grasos en hígado y edema de pulmón.

## RESULTADOS

### 1. Estudio de biodistribución de BPA

La Tabla 5 muestra los valores de boro de diferentes muestras de tejido y sangre tomadas en diferentes tiempos post-administración del BPA, para cada uno de los pacientes tratados en el RA-1 (pacientes 1 a 3). La Tabla 6 muestra los valores de boro de diferentes muestras de tejido y sangre tomadas en diferentes tiempos post-administración del BPA para los tres pacientes tratados en el RA-6 (pacientes 4 a 6). En cada caso se tomó la cantidad de muestras que fue compatible con la práctica clínica. Por lo tanto faltan los datos de algunos tiempos y tejidos. En todos los casos los valores pre-infusión estuvieron por debajo del límite de detección. En todos los pacientes los valores de boro absolutos en el tumor se encuentran dentro de un rango terapéuticamente útil (Tablas 5 y 6). Sin embargo, particularmente en el caso del paciente 6 los valores se encuentran dentro del rango inferior compatible con el potencial terapéutico.

Para los pacientes tratados en el RA-1 (Tabla 5), las relaciones de boro en Tumor / Sangre fueron 2.7/1 (paciente 1), 4.3/1 (paciente 2) y 2.3/1 (paciente 3 sección A) y 2.6/1 (paciente 3 sección C). Las relaciones de boro en Tumor / Sangre para los animales tratados en el RA-6 (Tabla 6) fueron 2.6/1 (paciente 4), 2.8/1 (paciente 5) y 1.6/1 (paciente 6). En la Tabla 5 se muestran también las relaciones de boro Tumor / Mucosa Labial Normal (1.6/1 paciente 1, 1.5/1 y 1.4/1 paciente 3 secciones A y C respectivamente). En el caso del paciente 2 no se pudo calcular esta relación ya que no se pudo tomar una muestra de tejido normal. Para los animales tratados en el RA-6 las relaciones de boro Tumor / Mucosa Labial Normal fueron 1.9/1, 1.7/1 y 1.2/1 para los pacientes 4, 5 y 6 respectivamente. Se empleó la mucosa labial para calcular la relación Tumor /Tejido Normal porque se encuentra dentro del volumen tratado y se expuso virtualmente a la misma fluencia de neutrones térmicos que el tejido tumoral. La piel normal del dorso en el RA-6 se encuentra blindada y fuera del haz y por lo tanto se expondría a una menor fluencia de neutrones térmicos.

Tejido / Paciente Felino		Paciente 1 (Negrita)	Paciente 2 (Buffy)	Paciente 3 (Minnie)		
				A	B	C
Sangre	Fin de la infusión	32.2		40.3		55.4
	0.5 hs.	16.4		19.5		20.2
	1 hs.	16.6	20.4	14.1		13.6
	2 hs.	12.8		11.1	9.7±0.4 (n=4)	9.5
	3 hs.	7.9	9.2	7.9	12.6±1.0 (n=4)	9.2
Tumor, 3 hs.		21.6±3.0 (n=12)	39.2	18.2±0.4 (n=3)		24.0±2.8 (n=6)
		18.3 (piel por encima del tumor)	35.4 (pabellón de oreja infiltrado con tumor)			
Mucosa labial Normal, 3 hs.		13.3		12.4		17.3
Piel Normal de Dorso 3 hs.				11.2	16.0±4.3 (n=5)	14.6
Tumor / Sangre		2.7/1	4.3/1	2.3/1		2.6/1
Tumor / Mucosa labial normal		1.6/1		1.5/1		1.4/1

**Tabla 5:** Concentración de boro (ppm) en muestras de sangre y tejido a diferentes tiempos post-administración de BPA en una dosis de 300 mg/kg en los diferentes pacientes felinos tratados en el RA-1. A: 2 semanas antes del 1<sup>er</sup> BNCT. B: el día del 1<sup>er</sup> BNCT. C: 2 semanas antes del 2<sup>o</sup> BNCT.

Tejido / Paciente Felino		Paciente 4 (Rulito)	Paciente 5 (Mario)	Paciente 6 (Michi)
Sangre	Fin de la infusión	44.0 ± 2.3 (n=2)	41.6 ± 6.4 (n=4)	45.9 ± 8.4 (n=4)
	0.5 hs.	19.8 ± 0.6 (n=2)	14.3 ± 1.5 (n=4)	17.5 ± 4.8 (n=3)
	1 hs.	14.9 ± 0.2 (n=2)	8.8 ± 0.1 (n=2)	11.2 ± 2.1 (n=4)
	2 hs.	10.5 ± 0.1 (n=2)	6.6 ± 0.6 (n=2)	7.5 ± 0.7 (n=2)
	3 hs.	10.3 ± 0.4 (n=2)	6.9 ± 1.1 (n=4)	7.7 ± 1.1 (n=4)
Tumor, 3 hs.		26.6 ± 3.4 (n=15)	19.4 (n=1)	12.2 ± 0.9 (n=3)
Piel Normal de Dorso, 3 hs.		9.2 (n=1)	16.9 ± 2.9 (n=2)	8.3 (n=1)
Mucosa labial Normal, 3 hs.		13.7 ± 0.4 (n=2)	11.3 ± 0.1 (n=2)	10.0 (n=1)
Tumor / Sangre		2.6 / 1	2.8 / 1	1.6 / 1
Tumor / Mucosa labial normal		1.9 / 1	1.7 / 1	1.2 / 1

**Tabla 6:** Concentración de boro (ppm) en muestras de sangre y tejido a diferentes tiempos post-administración de BPA en una dosis de 300 mg/kg en los diferentes pacientes felinos tratados en el RA-6

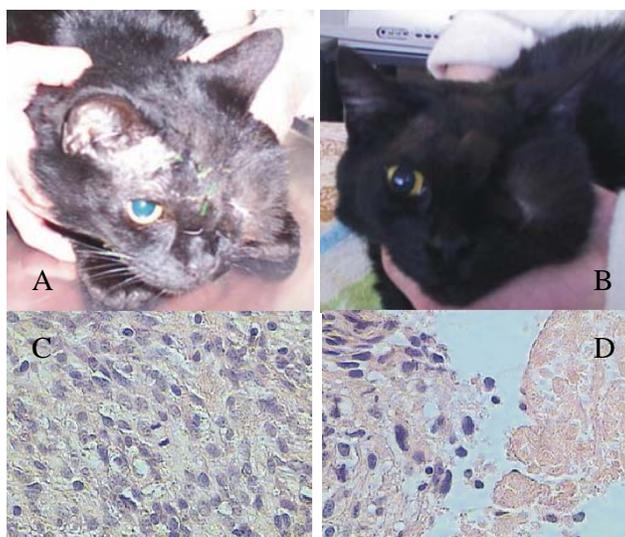
En el caso del paciente 3 (Minnie), el gato para el cual existen tres grupos de datos observamos una reproducibilidad razonable de los datos antes del tratamiento y en el día del tratamiento aunque no fue posible ajustar todas las muestras y los tiempos (Tabla 5 A y B). Los datos de biodistribución obtenidos a los 7 meses y medio del 1<sup>er</sup>

tratamiento de BNCT fueron levemente más altos que los del primer grupo de datos (Tabla 5 A y C). Sin embargo, las relaciones de boro Tumor / Sangre permanecieron constantes. En el paciente 1 (Negrita) se tomaron muestras de saliva donde la concentración de boro estaba por debajo del límite de detección. También se tomaron muestras de orina a la 0.5 hs. y 3 hs. post-administración del BPA donde se observa un aumento en la concentración debido a la excreción por vía renal del compuesto borado (182.5 ppm y 368.8 ppm respectivamente).

Los valores de boro absolutos y relativos justificaron realizar BNCT en los seis casos.

## 2. BNCT in vivo

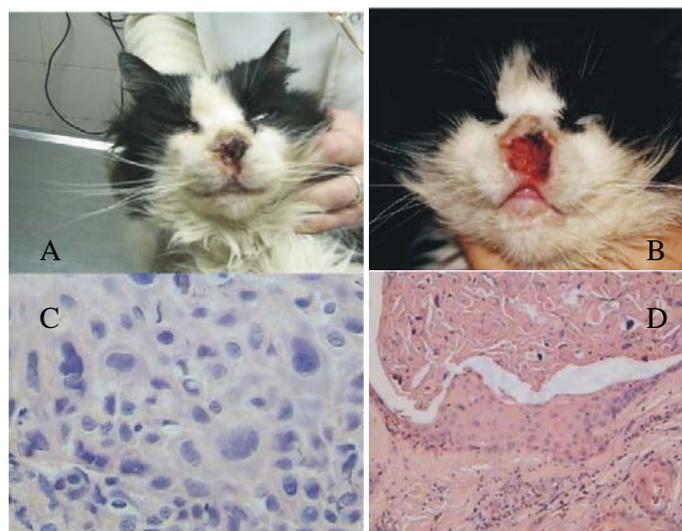
**Paciente 1 (Negrita):** El gato no presentó ningún efecto radiotóxico evaluado de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. En este caso a los 20 días post-BNCT se observó una reducción de la masa tumoral del 12%, seguido por una detención en el crecimiento tumoral (Fig. 3 B). Un mes post-BNCT el análisis histopatológico de una biopsia tomada del área del tumor mostró zonas de necrosis junto con áreas viables (Fig. 3 D). Las imágenes de microscopía óptica de la zona del tumor pre-BNCT solo mostró núcleos viables y proliferativos Fig. 3 C). El animal se eutanasió 5 meses post-BNCT debido a un desmejoramiento general. La necropsia no mostró lesiones atribuibles a toxicidad radioinducida.



**Figura 3:** Paciente 1 (A) Vista macroscópica del área del tumor pre-BNCT. (B) Vista macroscópica del área del tumor 20 días post-BNCT. (C) Microscopía óptica representativa

pre-BNCT (H & E, magnificación 400x). (D) Microscopía óptica representativa 1 mes post-BNCT (H & E, magnificación 400x).

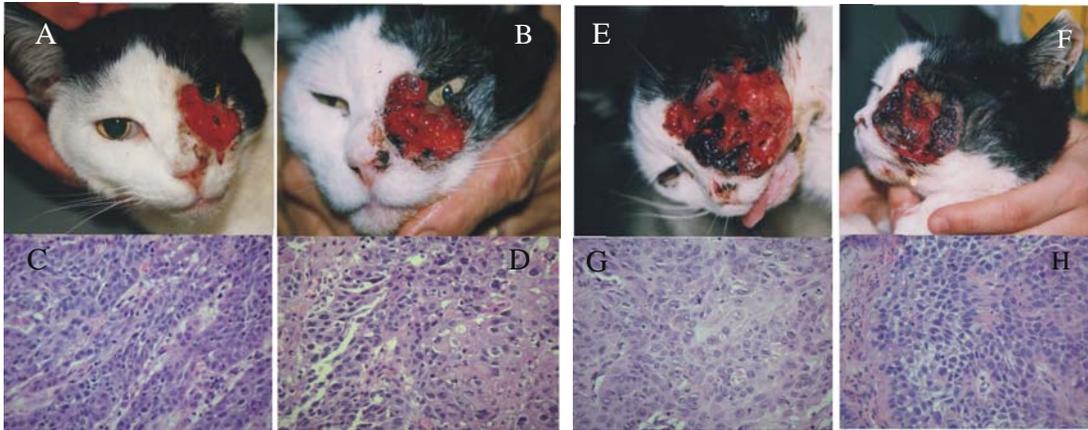
**Paciente 2 (Buffy):** Antes del BNCT se observó una lesión correspondiente a un tumor sangrante y proliferativo, cubierta por una costra que se desprendía periódicamente sin llegar a una epitelización (Fig. 4 A). El gato presentó dificultades respiratorias y falta de apetito. Post-BNCT el gato no presentó ningún efecto radiotóxico evaluado de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Veinticuatro horas post-BNCT el área tumoral presentó una costra. Una semana post-BNCT mejoró el estado clínico del gato en términos de movilidad, apetito y respiración. Diecisiete días post-BNCT el control tumoral permitió la formación de epitelio sano en el área tumoral (Fig. 4 B). Un mes y medio post-BNCT la biopsia del área del tumor mostró zonas de necrosis junto con áreas viables (Fig. 4 D) que contrastaban con las imágenes de microscopía óptica pre-BNCT que solo evidenciaban núcleos viables y proliferativos (Fig. 4 C). El animal se eutanasió 2 meses y medio post-BNCT debido a un desmejoramiento general. La necropsia no mostró lesiones atribuibles a toxicidad radioinducida.



**Figura 4:** Paciente 2 (A) Vista macroscópica del área del tumor pre-BNCT. (B) Vista macroscópica del área del tumor 17 días post-BNCT. (C) Microscopía óptica representativa pre-BNCT (H & E, magnificación 400x). (D) Microscopía óptica representativa 1.5 meses post-BNCT (H & E, magnificación 100x).

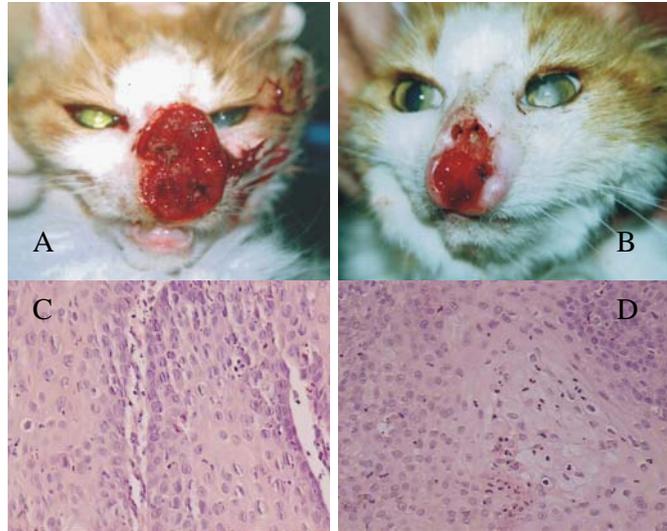
**Paciente 3 (Minnie):** El gato no presentó ningún efecto radiotóxico evaluado de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos después del primer tratamiento con

BNCT. A lo largo del primer mes post-1° BNCT el seguimiento macroscópico reveló un control tumoral parcial en términos de una detención del crecimiento y desarrollo de áreas de necrosis (Fig. 5 B). Las observaciones macroscópicas se correlacionaron con biopsias tomadas 8 y 33 días post-1° BNCT que mostraron áreas de necrosis rodeadas por cordones tumorales viables (Fig. 5 D). Tres meses post-BNCT el gato presentaba buenas condiciones clínicas evaluadas en términos de movilidad, apetito y confort general. Sin embargo, el control tumoral se detuvo. En ese momento se aplicó un ciclo de quimioterapia pero el tumor no respondió. Siete meses post-BNCT realizamos un segundo estudio de biodistribución de acuerdo con lo descrito previamente. Decidimos realizar un segundo tratamiento con BNCT 7.5 meses después del primer tratamiento dado que los valores de concentración de boro eran potencialmente terapéuticos (Tabla 5), no existía otra opción terapéutica para el animal y la respuesta observada del primer BNCT era muy alentadora. Dos días después del segundo tratamiento con BNCT el animal presentó un desmejoramiento clínico. Se administraron esteroides. El gato recuperó su movilidad y apetito y el tumor presentó áreas macroscópicamente necróticas 4 días post-2° BNCT. Veinte días post-2° BNCT el gato empezó a trepar árboles. En este momento una radiografía de los pulmones no mostró lesiones radioinducidas. El único cambio atribuible a radiotoxicidad fue la pérdida de pelo en el área alrededor del tumor. Cuarenta días post-2° BNCT el tumor presentó mayor cantidad de áreas macroscópicamente necróticas que pre-2° BNCT a nivel macroscópico (Fig. 5 E, F) y a nivel microscópico (Fig. 5 G, H). El control tumoral fue solo parcial y dos meses después del segundo tratamiento con BNCT se detectó clínicamente una marcada invasión tumoral en los nodos linfáticos del cuello. En el período posterior al primer tratamiento con BNCT, los análisis de laboratorio indicaron una leve anemia y desordenes renales que ya existían antes del tratamiento. Antes del segundo tratamiento con BNCT la anemia empeoró pero respondió a una terapia con hierro. El animal se eutanasió dos meses después del segundo tratamiento con BNCT y 9.5 meses después del primer tratamiento dado que ya no se observó control tumoral, anticipándose a un futuro desmejoramiento clínico del animal producto de una extensa invasión tumoral. La necropsia mostró metástasis pulmonares y no reveló lesiones atribuibles a toxicidad radioinducida.



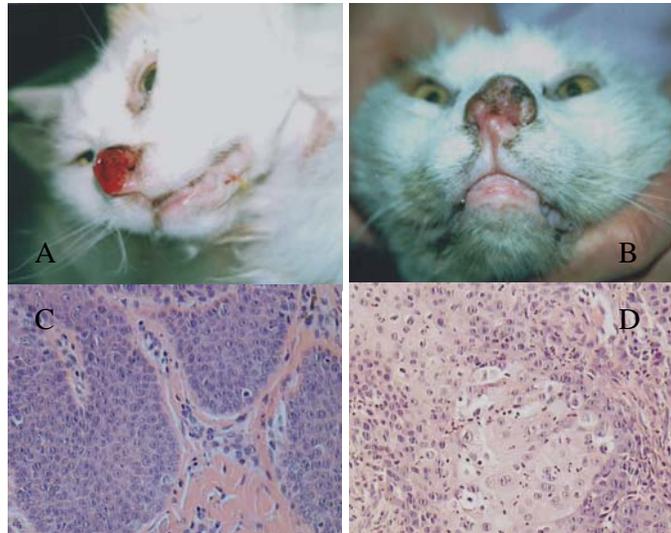
**Figura 5:** Paciente 3 (A) Vista macroscópica del área del tumor pre-1°BNCT. (B) Vista macroscópica del área del tumor 8 días post-1°BNCT. (C) Microscopía óptica representativa pre-1°BNCT (H & E, magnificación 400x). (D) Microscopía óptica representativa 8 días post-1°BNCT. (H & E, magnificación 400x). (E) Vista macroscópica del área del tumor pre-2°BNCT y 7.5 meses después del 1° tratamiento. (F) Vista macroscópica del área del tumor 40 días post-2°BNCT. (G) Microscopía óptica representativa pre-2°BNCT (H & E, magnificación 400x). (H) Microscopía óptica representativa 40 días post-2°BNCT. (H & E, magnificación 400x).

**Paciente 4 (Rulito):** El gato no presentó ningún efecto radiotóxico evaluado de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos excepto áreas de alopecia en el volumen del tratamiento. A lo largo del primer mes post-BNCT el seguimiento macroscópico periódico reveló control tumoral parcial en términos de una detención del crecimiento tumoral seguida por una significativa reducción en el volumen tumoral y el desarrollo de áreas de necrosis (Fig. 6 B). El estado clínico del gato mejoró en términos de movilidad, apetito y respiración. El análisis histopatológico de una biopsia tomada del área del tumor un mes post-BNCT mostró focos necróticos junto con cordones tumorales viables (Fig. 6 D). Se observaron imágenes de daño radioinducido en el tumor, o sea células hipercromáticas, vacuolización citoplasmática y núcleos bizarros. Sin embargo, a partir de un mes post-BNCT el tumor siguió creciendo, exhibiendo una reacción inflamatoria local. El animal se eutanasió 2 meses y 5 días post-BNCT debido a un desmejoramiento general. La necropsia no mostró diseminación metastásica. No se observaron lesiones en el tejido normal atribuibles a toxicidad radioinducida. El análisis histopatológico del área del tumor de la necropsia reveló la presencia de núcleos viables, algunas figuras mitóticas y figuras apoptóticas y signos de daño radioinducido tales como núcleos bizarros e hipercromáticos.



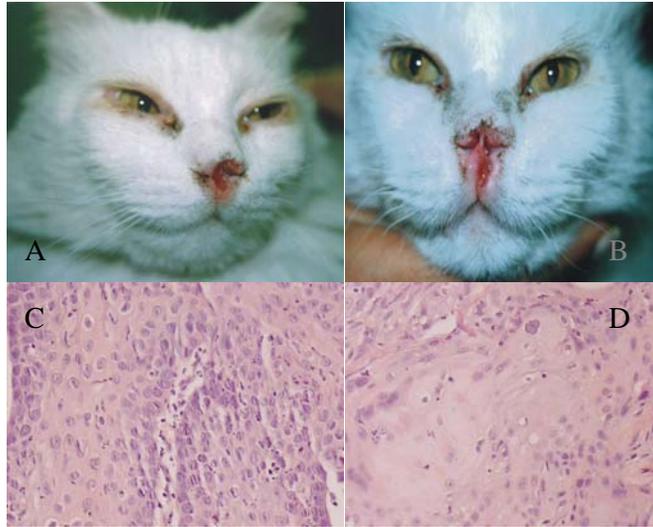
**Figura 6:** Paciente 4 (A) Vista macroscópica del área del tumor pre-BNCT. (B) Vista macroscópica del área del tumor 30 días post-BNCT. (C) Microscopía óptica representativa pre-BNCT (H & E, magnificación 400x). (D) Microscopía óptica representativa 1 mes post-BNCT (H & E, magnificación 400x).

**Paciente 5 (Mario):** El gato no presentó ningún efecto radiotóxico evaluado de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos excepto áreas de alopecia en el volumen del tratamiento y mucositis reversible y babeo aproximadamente 9 días post-BNCT. Los síntomas clínicos asociados a la mucositis revirtieron aproximadamente 15 días post-BNCT. A lo largo del primer mes post-BNCT el seguimiento macroscópico periódico reveló control tumoral parcial en términos de una detención del crecimiento tumoral. El estado clínico del animal se mantuvo constante, con un moderado aumento del apetito. Veinte días post-BNCT se observaron áreas de epitelio normal revistiendo el área del tumor (Fig. 7 B). El crecimiento de epitelio normal indica que hay un cierto grado de control tumoral. El análisis histopatológico de una biopsia tomada del área tumoral 3 meses post-BNCT mostró núcleos viables en la periferia del tumor, imágenes fantasmas en el centro del tumor y signos de daño radioinducidos tal como núcleos bizarros e hiper cromáticos (Fig. 7 D). Cinco meses post-BNCT el tumor continuó creciendo y el animal se eutanasió debido a un desmejoramiento general. Lamentablemente los dueños no autorizaron realizar la necropsia.



**Figura 7:** Paciente 5 (A) Vista macroscópica del área del tumor pre-BNCT. (B) Vista macroscópica del área del tumor 20 días post-BNCT. (C) Microscopía óptica representativa pre-BNCT (H & E, magnificación 400x). (D) Microscopía óptica representativa 3 meses post-BNCT (H & E, magnificación 400x).

**Paciente 6 (Michi):** El gato no presentó ningún efecto radiotóxico evaluado de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos excepto áreas de alopecia en el volumen del tratamiento y mucositis reversible y babeo aproximadamente 9 días post-BNCT. Los síntomas clínicos asociados a la mucositis revirtieron aproximadamente 15 días post-BNCT. A lo largo del primer mes post-BNCT el seguimiento macroscópico periódico reveló control tumoral parcial en términos de una detención del crecimiento tumoral. El estado clínico del animal mejoró en términos de actividad y apetito. Veintidós días post-BNCT se observaron áreas de epitelio normal revistiendo el área del tumor (Fig. 8 B). El crecimiento de epitelio normal indica que hay un cierto grado de control tumoral. El análisis histopatológico de una biopsia tomada del área tumoral 1 mes post-BNCT mostró focos necróticos, daño celular y vacuolización citoplasmática (Fig. 8 D). La lesión se revistió parcialmente con epitelio normal. Dos meses y medio post-BNCT se observó sangrado del tumor. El tumor comenzó a crecer nuevamente aproximadamente a los 4 meses y medio post-BNCT. Se observó un crecimiento tumoral progresivo y un desmejoramiento clínico. El animal se eutanasió 7 meses y medio post-BNCT. La necropsia no mostró diseminación metastásica. No se observaron lesiones en el tejido normal atribuibles a toxicidad radioinducidas. El análisis histopatológico del área del tumor de la necropsia reveló la presencia de núcleos viables, focos necróticos y signos de daño radioinducido tales como núcleos bizarros e hiper cromáticos.



**Figura 8:** Paciente 6 (A) Vista macroscópica del área del tumor pre-BNCT. (B) Vista macroscópica del área del tumor 22 días post-BNCT. (C) Microscopía óptica representativa pre-BNCT (H & E, magnificación 400x). (D) Microscopía óptica representativa 1 mes post-BNCT (H & E, magnificación 400x).

## DISCUSIÓN

Este fue el primer estudio de BNCT en cáncer de cabeza y cuello espontáneo en felinos domésticos en el mundo.

El estudio mostró que el BPA entrega cantidades terapéuticamente útiles de boro a los tumores de cabeza y cuello espontáneos en felinos domésticos en forma similar a lo demostrado en cáncer oral en hámster con el mismo compuesto borado (Kreimann EL y col., 2001<sup>a</sup>). Sin embargo el valor absoluto de boro en tumor fue particularmente bajo en el caso de la paciente 6 (Michi). Como ya mencionamos previamente el BPA se transporta a través de la membrana celular por medio de un sistema de transporte activo de aminoácidos L (Wittig A., 2000). Por lo tanto, la incorporación de BPA depende del estado metabólico y de la viabilidad de las células (Coderre JA y col., 1998; Kreimann EL y col., 2001<sup>a</sup>), lo que lleva a una biodistribución heterogénea de boro dentro de tumores heterogéneos y redunda en variaciones considerables en el contenido de boro entre tumores (Kreimann EL y col., 2001<sup>a</sup>). Dentro de este contexto no es sorprendente que diferentes tumores incorporen diferentes cantidades de boro utilizando como compuesto borado el BPA. Sería interesante estudiar cómo influyen aspectos tales como la diferenciación tumoral sobre la captación de BPA.

Aquí mostramos que es factible tratar carcinomas de cabeza y cuello espontáneos en pacientes felinos con BNCT, tanto con el haz térmico del reactor RA-1 como con el haz epitérmico termalizado del reactor RA-6, alcanzando un efecto terapéutico sin un daño significativo a los tejidos normales. Los pacientes 2 a 6 resultaron de especial interés por tratarse de tumores del mismo tipo que el que inducimos experimentalmente en la bolsa de la mejilla del hámster. Cabe mencionar que se observó una mucositis reversible en los pacientes 5 y 6 (pero no en el paciente 4) que se habían tratado en el RA-6. El desarrollo de mucositis reversible una o dos semanas post-BNCT mediado por BPA ya había sido reportado previamente por nuestro grupo en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster (Kreimann EL y col., 2001b). Los tres animales tratados en el RA-6 (pacientes 4 a 6) recibieron dosis de irradiación estimadas similares en tejido normal (7.5-8.4 Gy-Eq.) lo que revela que la diferencia en la respuesta del tejido normal no se podría atribuir a una diferencia en la dosis de irradiación. Diferencias potenciales y a veces inesperadas en la radiosensibilidad entre animales requiere ser cauteloso en no llegar a la máxima tolerancia del tejido normal. Hasta el momento no es posible determinar la concentración de boro “on line” en forma no invasiva en el tejido durante el BNCT. En consecuencia la componente de dosis de irradiación boro solo se puede estimar en base a estudios de biodistribución previos que impiden cálculos dosimétricos exactos.

Dado que la fluencia térmica en el RA-1 fue baja (10 min. de irradiación) y teniendo en cuenta que se exponía el cuerpo entero del animal, sin blindaje, el principal “end point” que quisimos determinar fue la seguridad. En este sentido no se observaron efectos radiotóxicos como se pudo evaluar en términos de síntomas clínicos, observación macroscópica, análisis de laboratorio y estudios histopatológicos del material de autopsia. Fue sorprendente que con dosis físicas al tumor de alrededor de 1 Gy, fue posible alcanzar un control tumoral parcial en términos de disminución del crecimiento y necrosis parcial. Dentro de este contexto podríamos especular que este efecto sobre el tumor se debería a la diferente composición de neutrones rápidos en el RA-1 en comparación con la composición del RA-6 (ANESS, 2004; Calzetta O y col., 2002), ya que se sabe que los CCE son especialmente sensibles a los neutrones rápidos (Mardynskii y col., 1997). A pesar que ambos reactores tienen un flujo de neutrones rápidos similar y un 15-20 % de neutrones rápidos como componente del haz, cabe destacar que de acuerdo con una caracterización preliminar del RA-1 habría una

proporción de neutrones rápidos de muy alta energía (más de 1.33 MeV) que estaría aportando un mayor efecto sobre el tumor.

El hecho que el BNCT mejoró la condición clínica de los animales y prolongó su supervivencia más allá de su condición terminal en el momento de incluirlos en el estudio fue claramente un logro. Sin embargo, el pequeño número de muestras, solo nos permite interpretar este hallazgo como una tendencia. También fue posible demostrar dentro de estas condiciones la posibilidad de realizar dos tratamientos de BNCT con baja dosis, separados entre sí 7.5 meses, sin efectos radiotóxicos significativos sobre el animal.

En todos los casos hemos podido demostrar que el BNCT mediado por BPA es capaz de inducir un control tumoral parcial en términos de una detención del crecimiento tumoral y una significativa reducción en el volumen tumoral, el desarrollo de focos necróticos y la inducción de daño celular en el tejido tumoral sin radiotoxicidad significativa en el tejido normal. El control tumoral fue claramente más marcado en los pacientes 2 y 4 que en los otros gatos. Esta diferencia podría estar asociada al mayor contenido de boro en el tumor en estos pacientes, ambos con CCE muy avanzados. Si estudios futuros confirman que tumores menos avanzados incorporan bajas cantidades de boro al administrar BPA, entonces el BNCT-BPA podría no ser una opción adecuada para CCE en un estadio temprano. También sería importante, estudiar la biodistribución de combinaciones de compuestos con diferentes mecanismos de incorporación para lograr mayores concentraciones absolutas de boro en el tumor así como también una distribución más homogénea.

El paciente 4 (Rulito) presentó una marcada reducción en el volumen tumoral después de lo cual el tumor siguió creciendo, por lo cual no se vio una remisión completa del tumor. Este hallazgo se podría atribuir al hecho que la dosis de irradiación en profundidad fue insuficiente en este tumor muy grande. Esto coincide con lo observado por Kato y colaboradores (2004), que realizaron 2 y hasta 3 aplicaciones de BNCT en tumores de cabeza y cuello recurrentes debido a una insuficiente dosis en profundidad en tumores grandes.

## CONCLUSIONES

De este estudio podemos concluir que el BNCT mediado por BPA es capaz de inducir un control tumoral parcial en tumores de cabeza y cuello espontáneos en pacientes felinos sin significativa radiotoxicidad en el tejido normal. Sin embargo, indudablemente sería necesario incrementar la eficacia terapéutica del BNCT. El presente estudio sugiere que es necesario optimizar el tratamiento en términos de incrementar la dosis de irradiación en profundidad en tumores grandes y mejorar la llegada de boro al tumor. La dosis de irradiación en profundidad se podría mejorar aplicando más de un tratamiento de BNCT (Kato y col., 2004), o mejorando el flujo de neutrones térmicos en profundidad (Nievaart y col., 2006). El éxito del BNCT se basa en minimizar la dosis al tejido normal y maximizar la dosis al tejido tumoral. Sin embargo, para que el BNCT sea terapéuticamente óptimo, debe actuar en todas las poblaciones tumorales dentro de un tumor heterogéneo. En este sentido, se ha postulado (por ejemplo Ono y col., 1999) que la administración combinada de diferentes compuestos borados con diferentes propiedades y mecanismos de captación complementarios pueden incrementar el efecto terapéutico del BNCT. Dentro de este contexto, reportamos un notable/marcado control tumoral sin aparente radiotoxicidad en tejido normal en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster con BNCT mediado por BPA+GB-10, administrados en forma combinada. Se justifican estudios futuros para evaluar la potencial eficacia en un escenario preclínico de este protocolo de llegada de modo dual a nivel celular (componente de dosis de irradiación de boro del BPA) y a nivel vascular (componente de dosis de irradiación de boro del GB-10), que ha sido muy efectivo en nuestro modelo experimental de CCE.

## REFERENCIAS

- Alam F, Soloway AH, Barth RF. Boronation of antibodies with mercaptoundecahydro-closo-dodecarborate (2-) anion for potential use in boron neutron capture therapy. *Int. Radiat. Appl. Instrum. Part A.* 38: 503-506, 1987.
- Allen DA, Beynon TD. A design stuffy 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.
- Asbury AK, Ojeman RG, Nielsen SL, Sweet WH. 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.
- Barth RF, Alam F, Soloway AH, Adams DM, Steplewski Z. Boronated monoclonal antibody 17-1A for potential neutron capture therapy of colorectal cancer. *Hybridoma.* Jul;5 Suppl 1:S43-50, 1986.
- Barth RF, Coderre JA, Vicente MGH and Blue TE. Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects. *Clinical Cancer Research* Vol. 11, 3987-4002, June 1, 2005. Review
- Barth RF, Matalka KZ, Bailey MQ, Staubus AE, Soloway AH, Moeschberger ML, Coderre JA, Rofstad EK. A nude rat model for neutron capture therapy of human intracerebral melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Mar 30;28(5):1079-88 1994.
- Barth RF, Soloway AH and Fairchild RG. Boron Neutron Capture Therapy for Cancer. *Scientific American* pp68-73, October 1990.
- Barth RF, Wu G, Yang W, et al. Neutron capture therapy of epidermal growth factor positive gliomas using boronated cetuximab (IMC-C225) as a delivery agent. *Appl Radiat Isot;*61:899-903. 2004.
- Barth RF, Yang W, Bartus RT, Rotaru JH, Ferketich AK, Moeschberger M, Nawrocky MM, Coderre JA, Rofstad EK. Neutron capture therapy of intracerebral melanoma: enhanced survival and cure after blood-brain barrier opening to improve delivery of boronophenylalanine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Mar 1;52(3):858-68. 2002
- Barth RF. 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.
- Bennet BD Munford-Zisk J, Coderre JA and Morrison GM. Subcellular localization of p-boronophenylalanine-delivered boron-10 in the rat 9L gliosarcoma, Cryogenic preparation in vitro and in vivo. *Radit. Res.* 140: 72-78, 1994.

- Bennet BD, Zha XH, Gay I and Morrison GM. 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;.
- Berger MS. Malignant astrocytomas: surgical aspects. *Semin Oncol*;21:172–85 1994.
- Bergland R, Elowitz E, Coderre JA, Joel D, Chadha M. A phase 1 trial of intravenous boronophenylalanine-fructose complex in patients with glioblastoma multiforme. In: Mishima Y, editor. *Cancer neutron capture therapy*. New York: Plenum Press; p. 739–46 1996.
- Blaumann HR, González SJ, Longhino J, Santa Cruz GA, Calzetta Larriou OA, Bonomi MR, Roth BMC. Boron Neutron capture therapy of skin melanomas at the RA-6 reactor: a procedural approach to beam set up and performance evaluation for upcoming clinical trials. *Medical physics*, 31 (1), pp. 70-80, 2004. (Gustavo 10)
- Boss CB y Fredeen KJ. Concepts, instrumentation, and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Second ed. Perkin Elmer, 1999.
- Boutwell RK. Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Prog Exp Tumor Res*; 4: 207–50. 1964.
- Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff, RH. A Genetic Explanation of Slaughter’s concept of Field Cancerization. *Cancer Research* 63, 1727-1730. 2003
- Buchholz TA, Laramore GE, Stelzer KJ, Risler R, Wootton P, Griffin TW. Boron neutron capture enhanced fast neutron radiotherapy for malignant gliomas and other tumors. *J Neurooncol.* May;33(1-2):171-8. 1997 Review.
- Burian J, Marek M, Rataj J, Flibor S, Rejchrt J, Viererbl L, Sus F, Honova H, Petruzalka L, Prokes K, Tovarys F, Dbaly V, Benes V, Kozler P, Honzatko J, Tomandl I, Mares V, Marek J, Syrucek M. Report on the first patient group of the phase I BNCT trial at the LVR-15 reactor. In: Sauerwein W, Moss R Wittig A, editors. *Research and Development in Neutron Capture Therapy*, Bologna: Monduzzi Editore; p. 1107–12. 2002.
- Burlon AA, Kreiner AJ, Valda AA, Minsky D, Somacal H, Debray M, Stoliar P. “Optimization of a neutron production target and beam shaping assembly based on the  ${}^7\text{Li}(p,n){}^7\text{Be}$  reaction.” *Nuclear Instr.& Methods B229/1*. 144-156.2005.
- Burlon AA, Kreiner AJ, Valda AA, Minsky DM. An optimized neutron-beam shaping assembly for accelerator-based BNCT. *Appl Radiat Isot.* Nov;61(5):811-5. 2004
- Burlón AA, Kreiner AJ, White S, Blackburn B, Gierga DP, and Yanch JC. In-phantom dosimetry for the  ${}^{13}\text{C}(d,n){}^{14}\text{N}$  reaction as a source for accelerator-based BNCT. *Med Phys.* May;28(5):796-803. 2001.

- Busse P, Harling O, Palmer MR, Kaplan I, Newton TH Jr., Kaplan J, Chuang CF, Kiger III WS, Riley KJ, Goorley JT, Zamenhof RG. 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, Harling O, Palmer MR, Kiger III WS, Kaplan J, Kaplan I, Chuang CF, Goorley JT, Riley KJ, Newton TH, Santa Cruz GA, Lu XQ, Zamenhof RG. A critical examination of the results from the Harvard-MIT NCT program phase I clinical trial of neutron capture therapy for intracranial disease. *J Neurooncol.* Mar-Apr;62(1-2):111-21. 2003.
- Busse P, Zamenhof R, Harling O, Kaplan I, Kaplan J, Chuang CF, Goorley JT, Kiger III WS, Riley KJ, Palmer MR. The Harvard-MIT BNCT program: overview of the clinical trials and translational research. In: Hawthorne MF, Shelly K, Wiersema RJ, editors. *Frontiers in neutron capture therapy.* Vol. 1. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; p. 37–60. 2001.
- Busse PM, Zamenhof RG, Madoc-Jones H, Solares G, Kiger S, Riley K, Chuang C, Rogers G, Harling O. Clinical follow-up of patients with melanoma of extremity treated in phase I boron neutron capture therapy protocol. In: Larson B, Crawford J, Weinreich R, (Eds.), *Advances in Neutron Capture Therapy, Vol. I.* Elsevier, Amsterdam, pp 60-64, 1997.
- Cabrini RL, Itoiz ME, Mayo JJ, Smolko EE, Klein-Szanto AJP. Microspectrophotometric study of histoenzymic reactions in rat epidermis subjected to 0,5 Mrad of deuteron irradiation. *Int. J Radiat: Biol.* 18: 415-421, 1970.
- Cahan WG, Multiple primary cancers of the lung, esophagus and other sites. *Cancer (Phila.)* 40, 1954-1960. 1977.
- Callahan DE, Forte TM, Afzal SM, Deen DF, Bauer WF, Blakely EA. Boronated protoporphyrin (BOPP): localization in the human glioma cell line SF-767 with uptake modulated by lipoprotein levels. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 45(3): 761-71, 1999.
- Calzetta O, Blaumann H, Longhino J. RA-6 reactor mixed beam design and performance for NCT trials. In *Research and Development in Neutron Capture Therapy. Proceedings of the 10<sup>th</sup>. International Congress on Neutron Capture Therapy (E. Monduzzi, Ed.). Litosei-Rastignano, Rome, 2002.*
- Capala J, Barth RF, Bendayan M, Lauzon M, Adams DM, Soloway AH, Fenstermaker RA, Carlsson J. Boronated epidermal growth factor as a potential targeting agent for boron neutron capture therapy of brain tumors. *Bioconjug Chem.* 1996 Jan-Feb;7(1):7-15. y col., 1996
- Capala J, H.-Stenstam B, Sköld K, Munck af Rosenschöld P, Giusti V, Persson C, Wallin E, Brun A, Franzen L, Carlsson J, Salford L, Ceberg C, Persson B, Pellettieri L and Henriksson R. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: clinical

- studies in Sweden. *J Neurooncol*; 62:135–44. 2003.
- Cardoso JE, Trivillin VA, Heber EM, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Itoiz ME, Bumashny E, Pozzi E, Schwint AE. Effect of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) on Normal Liver Regeneration: Towards a Novel Therapy for Liver Metastases. *International Journal of Radiation Biology* (en prensa).
- Carmeliet P y Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. Sep 14;407(6801):249-57. Review. 2000.
- Caruso M. Gene therapy against and HIV infection using the gene encoding herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Med. Today May 5*: 212-217, 1996. Review
- Chadha M, Capala J, Coderre JA, Elowitz EH, Iwai J, Joel DD, Liu HB, Wielopolski L, Chanana AD. Boron neutron-capture therapy (BNCT) for glioblastoma multiforme (GBM) using the epithermal neutron beam at the Brookhaven National Laboratory. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Mar 1;40(4):829-34. 1998
- Chanana D, Capala J, Chadha M, Coderre JA, Diaz AZ, Elowitz EH, Iwai J, Joel DD, Liu BB, Ma R, Pendzick N, Peress NS, Shady MS, Slatkin DN, Tyson GW, 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 DR, Lessig SL, Smith DR, Morrison GH. 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* (Larson B, Cranford J and Weinreich R, Eds.) pp. 315-320. Elsevier, Lausanne, 1997.
- Chen B, Pogue BW, Hoopes PJ, Hasan T. Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61, 1216-1226. 2005.
- Choy ATK, van Hasselt CA, Chisholm EM, Williams SR, King WWK, Li ARC. Multiple primary cancers in Hong Kong Chinese patients with squamous cell cancer of the head or neck. *Cancer*. Aug 15;70(4):815-20. 1992.
- Coderre JA, Chanana AD, Joel DD, Elowitz EH, Micca PL, Nawrocky MM, Cada M, Gebbers JO, Shady M, Pérez NS, Slatkin DN. Biodistribution of boronophenylalanine in patients with glioblastoma multiforme: boron concentration correlates with tumor cellularity. *Radiat Res*; 149:163–70. 1998.
- Coderre JA, Elowitz EH 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 JA, Glass JD, Fairchild RG, Micca PL, Fand I, Joel DD. Selective delivery of boron by the melanin precursor analog *p*-boronophenylalanine to tumors other than

- melanoma. *Cancer Res*;50:138–41. 1990.
- Coderre JA, Glass JD, Fairchild RG, Roy U, Cohen S, Frand I. Selective targeting of boronophenylalanine to melanoma in BALB/c mice for boron neutron capture therapy. *Cancer Res.* 47(23): 6377-83, 1987.
- Coderre JA, Joel DD, Micca PL, Nawrocky MM, Slatkin DN. Control of intracerebral gliosarcomas in rats by boron neutron capture therapy with p-boronophenylalanine. *Radiat Res.* Mar; 129(3):290-6. 1992.
- Coderre JA, Makar MS, Micca PL, Nawrocky MM, Liu HB, Joel DD, Slatkin DN and Amols HI. 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 JA, Morris GM, Kalef-Ezra J, Micca PL, Ma R, Youngs K, Gordon CR. The effects of boron neutron capture irradiation on oral mucosa: evaluation using a rat tongue model. *Radiat Res.* Aug; 152(2):113-8. 1999.
- Coderre JA, Morris GM, Micca PL, Fisher CD, Ross GA. Comparative assessment of single-dose and fractionated boron neutron capture therapy. *Radiat. Res.* 144: 310-317, 1995.
- Coderre JA, Morris GM, Micca PL, Nawrocky MM, Fisher CD, Bywaters A and Hopewell JW. *Cancer Neutron Capture Therapy*; Mishima Y., Eds.; Plenum Press: New York: 757-762, 1996.
- Coderre JA, Morris GM. The radiation biology of boron neutron capture therapy. *Radiat Res*; 151:1–18. 1999.
- Coderre JA, Slatkin DN, Micca PL, Ciallella JR. Boron neutron capture therapy of a murine melanoma with p-boronophenylalanine: dose-response analysis using a morbidity index. *Radiat Res.* Nov;128(2):177-85. 1991.
- Coderre JA, Turcotte JC, Riley KJ, Binns PJ, Harling OK, Kiger III WS. Boron neutron capture therapy: cellular targeting of high linear energy transfer radiation. *Technol Cancer Res Treat*;2:1–21. 2003.
- Collet AM, Mendez AE, Schwint AE, Itoiz ME. Activity of vascular ATPase and desmoplastic induction in the early stages of experimental carcinogenesis (Abstract). *J. Dent. Res.* 74 (3): 741. 1995.
- Curran WJ, Jr, Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, Krisch RE, Nelson DF. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three radiation oncology group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst*;85:704–10. 1993.

- Dagrosa MA, Viaggi M, Longhino J, Calzetta O, Cabrini RL, Edreira M, Juvenal G, Pisarev MA. Experimental application of boron neutron capture therapy to undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Nov 15;57(4):1084-92. 2003.
- Diamond I, Granelli SG, McDonagh AF, Nielsen S, Wilson CB, Jaenicke R. Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet*. Dec 2;2(7788):1175-7. 1972.
- Diaz A, Stelzer K, Laramore G, Wiersema R. Pharmacology studies of  $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$  (GB-10) in human tumor patients. In: M.W. Sauerwein, R. Moss and A. Wittig, editors. *Research and Development in Neutron Capture Therapy*, Bologna: Monduzzi Editore, International Proceedings Division; p. 993-9 . 2002.
- Diaz AZ. Assessment of the results from the phase I/II boron neutron capture therapy trials at the Brookhaven National Laboratory from a clinician's point of view. *J Neurooncol*;62:101-9. 2003.
- Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg*. Feb; 20(1):3-7. Review. 2002.
- Fairchild RG, Bond VP. Current status of  $^{10}\text{B}$  boron neutron capture therapy: enhancement of tumor dose via beam filtration and dose rate, and the effects of these parameters on minimum boron content: a theoretical evaluation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*;11:831-840. 1985.
- Fairchild RG, Kahl SB, Laster BH, Kalef-Ezra J, Popenoe EA. 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 LE, Robretson JS, Stickley EE. Physics and physiology of neutron capture therapy. *Pro. Nat. Acad. Sci. US* 40: 1087-1093, 1954a
- Farr LE, Sweet WH, Locksley HB, Robertson JS. Neutron capture therapy of glioma using boron-10. *Transact. Amer. Neurol. Ass*. 79: 110-113, 1954b;
- Farr LE, Sweet WH, Robertson JS, Foster CG, Sutherland DL, Mendelshon ML. Neutron capture therapy with boron in the treatment of glioblastoma multiforme. *Am J Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med*. 71:279-91. 1954c
- Fingar VH. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg*. Oct;14(5):323-8. Review. 1996.
- Flickinger JC, Kondziolka D, Lunsford LD, Kassam A, Phuong LK, Liscak R, Pollock B. Development of a model to predict permanent symptomatic postradiosurgery injury for arteriovenous malformation patients. Arteriovenous Malformation Radiosurgery Study Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*;46:1143-8. 2000.

- Friedlander G, Kennedy JW, Macias ES, Miller JM. In nuclear and radiochemistry, 3: John Wiley & Sons: New York, p610, 1981.
- Frigerio NA, Gruen DM. Abstracts of papers; San Francisco; April, 133<sup>rd</sup> National Meeting of the American Chemical society, Inorganic Chemistry Paper N° 82, 1958.
- Fukuda H, Mishima Y, Hiratsuka J, Honda C, Wadabayayashi 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 (Mishima Y, Ed.), pp663-671. Plenum Press, New York, 1996.
- Fukuda H, Mishima Y, Hiratsuta J, Kobayashi T, Karashima H, Yoshino K, Tsuru K, Araki K, Ichilashi 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.
- Gabel D, Fairchild RG, 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 RG. 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*. Jul;111(1):14-25. 1987.
- Gavin PR, Kraft SL, Huiskamp R, Coderre JA. A review: CNS effects and normal tissue tolerance in dogs. *J Neurooncol*. May;33(1-2):71-80. 1997 Review.
- Gibson CR, Staubus AE, Barth RF, Yang W, Ferketich AK, Moeschberger M. Pharmacokinetics of sodium borocaptate: a critical assessment of dosing paradigms for boron neutron capture therapy. *J Neurooncol*. Mar-Apr; 62(1-2):157-69. 2003
- Gonzalez SJ, Bonomi MR, Santa Cruz GA, Blaumann HR, Calzetta Larrieu OA, Menéndez P, Jiménez Rebagliati R, Longhino J, Feld DB, Dagrosa MA, Argerich C, Castiglia SG, Batistoni DA, Liberman SJ and Roth BMC. First BNCT treatment of a skin melanoma in Argentina: dosimetric analysis and clinical outcome. *Appl Radiat Isot*;61:1101–5. 2004.
- González SJ, Carondo DG, Bonomi MR. A new approach to determine tumor-to-blood  $^{10}\text{B}$  concentration ratios from the clinical outcome of a BNCT treatment. *Appl. Radiat. Isotopes* 61, 923-928 (2004).
- Gutin PH, Posner JB. Neuro-oncology: diagnosis and management of cerebral gliomas—past, present, and future. *Neurosurgery*;47:1–8 2000.
- Haritz D, Gabel D, Huiskamp R. Clinical phase-I study of  $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$  (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. Radiation dose heterogeneity in receptor and antigen mediated boron neutron capture therapy. *Radiother Oncol*. Apr;31(1):61-75. 1994.
- Haselsberger K, Radner H, Gossler W, Schlagenhaufen C, Pendl G. Subcellular boron-10 localization in glioblastoma for boron neutron capture therapy with Na<sup>2</sup>B<sup>12</sup>H<sup>11</sup>SH. *J Neurosurg*. Nov;81(5):741-4. 1994.
- Hatanaka H & 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.
- Hatanaka H. Boron neutron capture for brain tumors. In *Glioma*. Springer verlog, Berlin, pp233-249, 1991.
- Hawthorne MF y LEE MW A critical assessment of boron target compounds for boron neutron capture therapy. *J Neuro-Oncol*. 62:33-45, 2003
- Hawthorne MF, Shelly K. Liposomes as drug delivery vehicles for boron agents. *J Neuro-Oncol*. May; 33(1-2):53-8, 1997
- Hill JS, Kahl SB, Kaye AH, Stylli SS, Koo MS, Gonzales MF, Vardaxis NJ, Johnson CI. Selective tumor uptake of a boronated porphyrin in an animal model of cerebral glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 1;89(5):1785-9. 1992
- Hiratsuka J, Fukuda H, Kobayashi T, Karashima H, Yoshino K, Imajo Y, Mishima Y. The relative biological effectiveness of <sup>10</sup>B-neutron capture therapy for early skin reaction in the hamster. *Rad Res* 128:186-191. 1991.
- Holley JL, Mather A, Wheelhouse RT, Cullis PM, Hartley JA, Bingham JP, Cohen GM. Targeting of tumor cells and DNA by a chlorambucil-spermidine conjugate. *Cancer Res*. Aug 1;52(15):4190-5. 1992.
- Horn Y, Levij IS and Polliack A. Short and Long-Term Responses of DMBA-Induced Hamster Cheek Pouch Carcinoma to a High Dose of Radiation. *J. Dent. Res.* **50**, 1352. 1971.
- Huiskamp R, Gavin PR, Coderre JA, phillip KHI and Wheeler FJ. Brain tolerance in dogs to boron neutron capture therapy with borocaptate sodium (BSH) or boronophenylalanine (BPA). In *Cancer Neutron Capture Therapy* (Mishima Y), 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, p3, Osaka, 2000.
- Itoiz ME, Conti CJ, Gimenez IB, Lanfranchi HE, Fernandez-Alonso GI, Klein-Szanto AJ. Immunodetection of involucrin in lesions of the oral mucosa. *J Oral Pathol.* Apr;15(4):205-8. 1986
- Itoiz ME, Frasch AC. Variations in the enzymatic behaviour of irradiated epidermis as function of age and lesion localization. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* May;31(5):499-502. 1977.
- Itoiz ME, Lanfranchi HE, Jiménez-Conti IB, Conti CJ. Immunohistochemical demonstration of keratins in oral mucosa lesions. *Acta Odontol Latinoam.*;1(1):47-51. 1984
- Iwatsuki S, Starzl TE, Sheahan DG, Yokoyama I, Demetris AJ, Todo S, Tzakis AG, Van Thiel DH, Carr B, Selby R, *et al.* Hepatic resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg*; 214:221–8. 1991.
- Javid M, Brownell GL, Sweet WH. The possible use of neutron-capturing isotopes such as boron 10 in the treatment of neoplasms. II. Computation of the radiation energies and estimates of effects in normal and neoplastic brain. *J Clin Invest.* Jun;31(6):604-10. 1952.
- Joel DD, Coderre JA, Micca PL, Nawrocky MM. Effect of dose and infusion time on the delivery of *p*-boronophenylalanine for neutron capture therapy. *J Neurooncol*;41:213–21. 1999.
- Joensuu H, Kankaanranta L, Seppälä T, Auterinen I, Kallio M, Kulvik M, Laakso J, vähätalo J, Kortesianiemi M, Kotiluoto P, Serén T, Karila J, Brander A, Järviluoma E, Ryyänen P, Paetau A, Ruokonen I, Minn H, Tenhunen M, Jääskeläinen J, Färkkilä M, Savolainen S. Boron neutron capture therapy of brain tumors: clinical trials at the Finnish Facility using boronophenylalanine. *J Neurooncol*; 62:123–34. 2003.
- Kahl SB y Koo MS. Progress in Neutron Capture Therapy for cancer ; allen BJ, Moore DE, Harrington BV, Eds., Plenum Press: New York, 1992.
- Kahl SB, Joel DD, Nawrocky MM, Micca PL, Tran KP, Finkel GC, Slatkin DN. Uptake of a certain nidocarboranyl 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.
- Kastenbauer E and Wollenberg B. In search of new treatment methods for head-neck carcinoma. *Laryngol. Rhinol. Otol.* **78**, 31-35. 1999.
- Kato I, Ono K, Sakurai Y, Ohmae M, Maruhashi A, Imahori Y, Kirihata M, Nakazawa M and Yura Y. Effectiveness of BNCT for recurrent head and neck malignancies. *Appl Radiat Isot*; 61:1069–73. 2004.

- Kennedy KA. Hypoxic cells as specific drugs targets for chemotherapy. *Anticancer Drugs Des.* 2: 181-194, 1987.
- Klein-Szanto AJP, Cabrini RL, Itoiz ME, Volco HE. Letter: Enzyme variations produced in epidermis by soft x-ray collimated beams. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* Sep;26(3):285-8. 1974.
- Klein-Szanto AJP, Cabrini RL. Acute response of oxidative enzyme systems in epidermis subjected to beta-radiation. *Arch Dermatol Forsch.*;243(3):226-31. 1972.
- Klein-Szanto AJP, Cabrini RL. Microspectrophotometric study of oxidative enzymes in irradiated epidermis. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.*;18(3):235-41. 1970
- Klein-Szanto AJP, Slaga TJ. Effects of peroxides on rodent skin: epidermal hyperplasia and tumor promotion. *J Invest Dermatol*; 79: 30–4. 1982.
- Kobayashi T, Kanda K. Analytical calculation of boron-10 dosage in cells nucleus for boron neutron capture therapy. *Radit. Res.* 91: 77-94, 1982.
- Kohno N, Nakazawa E, Kusunoki M, Nishiya M. Chemotherapy of head and neck cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* Feb;23(3):277-82. Review. 1996
- Kreimann EL, Itoiz ME, Dagrosa A, Garavaglia R, Farías S, Batistoni D, Schwint AE. The Hamster Cheek Pouch as a Model of Oral Cancer for Boron Neutron Capture Therapy Studies: Selective Delivery of Boron by Boronophenylalanine. *Cancer Research*; 61:8775-8781. 2001a.
- Kreimann EL, Itoiz ME, Longhino J, Blaumann H, Calzetta O, Schwint AE. Boron Neutron Capture Therapy for the Treatment of Oral Cancer in the Hamster Cheek Pouch Model. *Cancer Research (Advances in Brief)*; 61:8638-8642. 2001b.
- Kreimann EL, Miura M, Itoiz ME, Heber E, Garavaglia RN, Batistoni D, Jiménez Rebagliati R, Roberti MJ, Micca PL, Coderre JA, Schwint AE. Biodistribution of a carborane-containing porphyrin as a targeting agent for Boron Neutron Capture Therapy of oral cancer in the hamster cheek pouch. *Archives Oral Biology*; 48(3):223-232. 2003.
- Krüger PG. Some biological effects of nuclear disintegration products on neoplastic tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 26: 181-192, 1940.
- Laramore GE, Stelzer KJ, Risler R, Schwartz JL, Douglas JJ, Einck JP, Nigg DW, Wemple CA, Hartwell JK, Harker YD, Gavin PR, Hawthorne MF. Neutron Capture Therapy (NCT) Enhancement of Fast Neutron Radiotherapy: Application to Non-Small Cell Lung Cancer. In: Duggan JL, Morgan IL, eds. *Application of accelerators in Research and Industry – Sixteenth International Conference.* American Institute of Physics: 881-884. 2001

- Laster BH, Shani G, Kahl SB, Warkentien L. The biological effects of Auger electrons compared to alpha-particles and Li ions. *Acta Oncol.*;35(7):917-23. 1996
- Laster BH, Thomlinson WC, Fairchild RG. 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 Soloway AH, Barth RF, Carpenter DE. New York, Plenum Press, pp. 197-300, 1993.
- Liu L, Barth RF, Adams dm, Soloway AH, Reisfeld RA. Bispecific antibodies as targeting agents for boron neutron capture therapy of brain tumors. *J. Hematother.* 4: 477-483, 1995.
- Locher G. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons. *Am. J. Roentgenol.* 36: 1-13, 1936.
- Locksley HB, Farr LE, Sweet WH, Robertson JS. The tolerance of large doses of sodium borate intravenously by patients receiving neutron capture therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 114: 484-489, 1955.
- Lurie AG, Rippey RM. 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. *Radiat Res*;109(2):227-37. 1987.
- Lurie AG, Tatematsu M, Nakatsuka T, Rippey RM 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.
- Mardynskii Ius, Gulidov IA, Sysoev AS, Andreev VG, Medvedev VN, Zagrebin VM. Fast neutrons in the treatment of malignant neoplasms. *Vopr Onkol.*; 43(5):515-8. Russian. 1997.
- Martin RF, Anderson RF. Pulse radiolysis studies indicate that electron transfer is involved in radioprotection by Hoechst 33342 and methylproamine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Nov 1;42(4):827-31. 1998
- Marton LJ, Pegg AE. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 55-91 y col., 1995.
- Masciopinto JE, Levin AB, Metha MP, Rhode BS. Stereotactic radiosurgery for glioblastoma: a final report of 31 patients, *J. Neurosurg.* 82: 530-535, 1995.
- Mendez AE, Schwint AE, Cabrini RL, Itoiz ME. Tnteraction between connective tissue and epithelium during experimental carcinogenesis (Abstract). *J. Dent. Res.* 72 (4): 655, 1993.

- Méndez AE, Schwint AE, Itoiz ME, Cabrini RL. Modifications induced by low doses of irradiation in experimental oral chemical carcinogenesis (Abstract). *J. Dent. Res.* 73 (4): 734, 1994.
- Mishima Y, Honda C, Ichibashi M, Obara H, Hiratsuka J, Fukuda H, Karashima H, Kand KTK, Yoshino K. Treatment of malignant melanoma by single neutron capture therapy with melanoma-seeking  $^{10}\text{B}$ -compound. *Lancet*;1:388–9. 1989.
- Mishima Y, Ichihashi M, Hatta S, Honda C, Yamamura K, Nakagawa T. New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma. Melanogenesis-seeking  $^{10}\text{B}$  molecular-melanoma cell interaction from *in vitro* to first clinical trial. *Pigment Cell Res* 1989;2:226–34
- Mishima Y. Melanoma and nonmelanoma neutron capture therapy using gene therapy: overview. In: Larsson B, Crawford J, Weinreich, editors. *Advances in neutron capture therapy*. Vol. 1. Medicine and physics. Elsevier; p. 10–25. 1997.
- Mitchel RE, Trivedi A. Chronic exposure to ionizing radiation as a tumor promoter in mouse skin. *Radiat Res.* Feb;129(2):192-201.1992.
- Miura M, Gabel D, Oenbrink G, Fairchild RG. Syntheses of boronated porphyrins for boron neutron capture therapy. *Tetrahedron Lett.* 31: 2247-2250, 1990.
- Miura M, Micca PL, Heinrichs JC, Gabel D, Fairchild RG and Alarkin DN. Biodistribution and toxicity of 2,4-divinyl-nido-o-carboranyldeuteroporphyrin IX in mice. *Biochem Pharmacol.* Feb 4;43(3):467-76. 1992.
- Miyatake SI, Kajimoto Y, Kawabata S, Yokoyama ÇK, Kuroiwa T, Masunaga SI, Sakurai Y, Maruhashi A, Imahori Y, Kirihata M, Ono K. Clinical results of modified BNCT for malignant glioma using two boron. Abstracts of the 11th World Congress on Neutron Capture Therapy; Oct 11–15; Boston, MA. p. 61. 2004.
- Morris GM, Coderre JA, Bywaters A, Whitehouse E and Hopwell JW. Boron neutron capture irradiation of the rat spinal cord: histopathological evidence of a vascular-mediated pathogenesis. *Radiat Res.* Sep;146(3):313-20. 1996.
- Morris GM, Coderre JA, Micca PL, Fisher CD, Capala J and Hopewell JW. Central nervous system tolerance to boron neutron capture therapy with p-boronophenylalanine. *Br J Cancer.*;76(12):1623-9. 1997.
- Morris GM, Coderre JA, Micca PL, Nawrocky MM, Hopewell JW, Miura M. Porphyrin-mediated boron neutron capture therapy: a preclinical evaluation of the response of the oral mucosa. *Radiat Res.* Jan;163(1):72-8. 2005.
- Morris GM, Coderre JA, Whitehouse EM, Micca PL and Hopewell JW. 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.* Mar 30;28(5):1107-12.

1994.

- Morris GM, Micca PL, Nawrocky MM, Weissfloch LE, Coderre JA. Long-term infusions of *p*-boronophenylalanine for boron neutron capture therapy: evaluation using rat brain tumor and spinal cord models. *Radiat Res*;158:743–52. 2002.
- Morris L. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J. Dent. Res.* **40**, 3-15. 1961.
- Moss RL, Aizawa O, Beynon D, Brugger R, Constantine G, Harling O, Liu HB, Watkins P. The requirements and development of neutron beams for neutron capture therapy of brain cancer. *J Neurooncol.* May;33(1-2):27-40. 1997 Review.
- Nakagawa Y and Hatanaka H. Boron neutron capture therapy. Clinical brain tumor studies. *J Neurooncol.* May;33(1-2):105-15. 1997
- Neumann M and Gabel D. Cellular and subcellular distribution of BSH in human glioblastoma multiforma. In nine International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer, Abstracts, pp 71-72, Osaka, 2000.
- Nievaart Va, Moss RL, Kloosterman JL, van der Hagen TH, van Dam H, Wittig A, Malago M, Sauerwein W. Design of a rotating facility for extracorporeal treatment of an explanted liver with disseminated metastases by boron neutron capture therapy with an epithermal neutron beam. *Radiat Res.* Jul;166(1 Pt 1):81-8. 2006
- Nigg DW, Schwint AE, Hartwell JK, Heber EM, Trivillin VA, Castillo J, Wentzeis L, Sloan P, Wemple CA. “Collaborative Physical and Biological Dosimetry Studies for Neutron Capture Therapy at RA-1 Research Reactor Facility”. Americas Nuclear Energy Symposium (ANES), Miami Beach, Florida, USA, 3-6 October, 2004
- Nigg DW, Wemple CA, Risler R, Hartwell JK, Harker YD, Laramore GE. Modification of the University of Washington neutron radiotherapy facility for optimisation of neutron capture enhanced fast-neutron therapy. *Med. Phys*; 27(2): 359-67. 2000.
- Ono K, Masunaga S, 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.*; 43:431-436. 1999.
- Ootsuyama A, Tanooka H. The tumor-initiating and -promoting effects of ionizing radiations in mouse skin. *Jpn J Cancer Res.* Nov;78(11):1203-6. 1987
- Pak RH, Primus FJ, Rickard-Dickson KJ, Ng LL, Kane RR, Hawthorne MF. Preparation and properties of nido-carborane-specific monoclonal antibodies for potential use in boron neutron capture therapy for cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 18;92(15):6986-90. 1995
- Palmer MR, Goorley JT, Kiger WS, Busse PM, Riley KJ, Harling OK, Zamenhof RG.

- Treatment planning and dosimetry for the Harvard-MIT phase I clinical trial of cranial neutron capture therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*;53:1361–79. 2002.
- Parney IF, Chang SM. Current chemotherapy for glioblastoma. In: Market J, DeVita VT, Rosenberg SA, Hellman S, editors. *Glioblastoma multiforme*. 1st ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers; p. 161–77 2005.
- Patel H, Sedgwick EM. BPA & BSH accumulation in experimental tumors. In: *Proceedings Ninth International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer*. Osaka, Japan:59-60. 2000.
- Pignol JP, Oudart H, Chauvel P, Sauerwein W, Gabel D, Prevot G. Selective delivery of <sup>10</sup>B to soft tissue sarcoma using <sup>10</sup>B-L-borophenylalanine for boron neutron capture therapy. *Br J Radiol*. Mar;71(843):320-3. 1998.
- Pinelli T, Zonta A, Altieri S, Barni S, Braghieri A, Pedroni P, Bruschi P, Chiari P, Ferrari C, Fossati F, Nano R, Ngnitejeu Tata S, Prati U, Ricevuti G, Roveda L and Zonta C. TAOOrMINA: from the first idea to the application to the human liver. In: M.W. Sauerwein, R. Moss and A. Wittig, editors. *Research and Development in Neutron Capture Therapy*, Bologna: Monduzzi Editore, International Proceedings Division; p. 1065–72. 2002.
- Pinelli T. Neutron capture therapy for liver cancer metastases. Abstracts of the 11th World Congress on Neutron Capture Therapy; Oct 11–15; Boston, MA. p. 52. 2004.
- Pogue BW, Braun RD, Lanzen JL, Erickson C, Dewhirst MW. Analysis of the heterogeneity of pO<sub>2</sub> dynamics during photodynamic therapy with verteporfin. *Photochem Photobiol*. Nov; 74 (5):700-6. 2001.
- Raaijmakers CP, Konijnenberg MW, Dewit L, Haritz D, Huiskamp R, Philipp K, Siefert A, Stecher-Rasmussen F, Mijnheer BJ. Monitoring of blood-<sup>10</sup>B concentration for boron neutron capture therapy using prompt gamma-ray analysis. *Acta Oncol*; 34(4):517-23. 1995.
- Ringe B, Pichlmayr R, Wittekind C, Tusch G. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma: experience with liver resection and transplantation in 198 patients. *World J Surg*;15:27085. 1991.
- Roberston JS and Mahoney FJ. The United States BNCT program. *Strahlenther. Onkol*. 165: 249-251 (Nr 2/3), 1989.
- Rong FG and Soloway A. Synthesis of 5 tethered carborane-containing pyrimidine nucleosides as potential agents for DNA incorporation. *Nucleosides Nucleotides* 13: 2021-2034, 1994.
- Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res*;33:253-262. 1954.

- Santis H, Shklar G. A histochemical study of human oral carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* Jan;17:84-91. 1964.
- Schulte-Herman R, Grasl-Kraupp B, Bursch W. Tumor development and apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105: 363-367, 1994.
- Schwint AE, Folco A, Morales A, Cabrini RL, Itoiz ME. AgNOR mark epithelial foci in malignant transformation in hamster cheek pouch carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 25: 20-24, 1996
- Schwint AE, Gomez E, Itoiz ME, Cabrini RL. Nucleolar organizer regions mark incipient cellular alterations in squamous epithelium. *J Dent Res* 72(8): 1233-1236, 1993.
- Schwint AE, Savino TM, Lanfranchi HE, Marschoff E, Cabrini RL, Itoiz ME. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of human oral mucosa. *Cancer* **73**, 2674-2679 (1994).
- Scobie M and Threadgill MD. Synthesis of carborane-containing nitroimidazole compounds via mild 1,3-dipolar cycloaddition. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 13: 939-941, 1992.
- Shelly K, Feakes DA, Hawthorne MF, Schmidt PG, Krisch TA, Bauer WF. Model studies directed toward the boron neutron-capture therapy of cancer: boron delivery to murine tumors with liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 1;89(19):9039-43. 1992.
- Sherman ML, Datta R, Hallahan DE, Weichselbaum RR, Kufe DW. Ionizing radiation regulates expression of the c-jun protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;87(15):5663-6. 1990.
- Shklar G, Eisenberg E, Flynn E. Immunoenhancing agents and experimental leukoplakia and carcinoma of the buccal pouch. *Prog Exp Tumor Res*;24:269-282. 1979.
- Silverman S, Griffith M. Smoking characteristics of patients with oral carcinoma and the risk for second oral primary carcinoma. *J Am Dent Assoc.* Sep;85(3):637-40. 1972.
- Sjoberg S, Carlsson J, Ghaneolhosseini H, Gedda L, Hartman T, malmquist J, Naeslund C, Olsson P, Tjarks W. Chemistry and biology of some low molecular weight boron compounds for boron neutron capture therapy. *J Neurooncol.* May;33(1-2):41-52. Review. 1997.
- Slaga TJ, Klein-Szanto AJP, Triplett L, Yotti L, TroskoJE. Skin tumor promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical generating compound. *Science*; 213: 1023-5. 1981.
- Slaga y Gimenez-Conti IB. An animal model for oral cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.*;(13):55-60. Review. 1992.
- Slatkin DN, Pate HR, Cronkite EP. Extracorporeal irradiation of blood: dosimetry

- corrected for shortened erythrocyte lifespans. *Exp Hematol.* Jan;14(1):75-9. 1986
- Slatkin DN. A history of boron neutron capture therapy of brain tumours. Postulation of a brain radiation dose tolerance limit. *Brain.* Aug;114 ( Pt 4):1609-29. 1991
- Slaughter P, Southwick HW, Smejtal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer (Phila)*;6:963-968. 1953.
- Smith BD and Haffty BG. 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 DR, Chandra S, Barth RF, Yang W, Joel DD, Coderre JA. Quantitative Imaging and Microlocalization of Boron -10 in Brain Tumors and Infiltrating Tumor Cells by SIMS Ion Microscopy: Relevance to Neutron Capture Therapy. *Cancer Research*;61:8179-8187. 2001.
- Smith DR, Chandra S, Coderre JA, Barth RF, Yang W, Liu L, Wilson JL, Micca PL, Nawrocky MM, Rotaru JH, Morrison GH. Quantitative ion microscopy imaging of boron-10 in rat tumors models for BNCT. In *advances in Neutron Capture Therapy. Volume II, Chemistry and Biology* (Larsson B, Cranford J and Weinreich R, Eds.) pp. 308-314. Elsevier, Lausanne, 1997.
- Smith DR, Chandra S, Coderre JA, Morrison GH. Ion microscopy imaging of  $^{10}\text{B}$  from *p*-boronophenylalanine in a brain tumor model for boron neutron capture therapy. *Cancer Res*; 56:4302-6. 1996.
- Smith MD, Setiawan Y, Moore DE. Optimisation of drug anchor for orthocarborane in reconstitution of low density lipoproteins for neutron capture therapy. In: *Cancer Neutron Capture Therapy*, edited by Mishima Y. New York, Plenum Press, pp 143-150, 1996.
- Snyder HR, Reedy AJ, Lennarz WJ. Síntesis of aromatic boronic acids. Aldehyde boronic acids and boronic acid analog of tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 835-838, 1958.
- Soloway AH, Hatanaka H, Daveis MA. Penetration of brain and brain tumor. VII. Tumor-binding sulfhydryl boron compounds. *J. Med. Chem.* 10: 714-717, 1967
- Spielvogel BF. Choose a new path: boron biologicals. In: *Biotechnology in the Feed Industry*, edited by TD Lyons, KA Jacques. Nottingham, UK, Nottingham University Press, pp. 303-321, 1994.
- Stelzer KJ, Gavin PR, Risler R, Kippenes H, Hawthorne MF, Nigg DW, et al. Boron Neutron Capture-Enhanced Fast Neutron Therapy (BNC/FNT) for Non-Small Cell Lung Cancer in Canine Patients. In: Hawthorne MF, ed. *Frontiers in Neutron Capture Therapy*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 735-739. 2001.

- Sweet WH, 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 WH, Soloway AH, Brownell GL. *Acta Union Int. Contre Cancer* 16:1216, 1960.
- Sweet WH, Soloway AH, Brownell GL. Boron slow neutron capture therapy of glioma. *Act Radiol. (Stockh.)* 1: 114-121, 1963.
- Sweet WH. Early history of development of boron neutron capture therapy of tumors. *J Neurooncol.* 33(1-2): pp. 19-26, 1997
- Taniyama K, Fujiwara H, Kuno T, Saito N, Shuntoh H, Sakane M, Tanaka C. Acute and subacute toxicity of  $^{10}\text{B}$ -paraboronophenylalanine. *Pigment Cell Res.* 2(4):291-6, 1989.
- Tsuji M, Ichihashi M, Mishima Y. Selective affinity of  $^{10}\text{B}$ -paraboronophenylalanine-HCl to malignant melanoma for thermal neutron capture therapy. *J Dermatol*; 93:773-8. 1983.
- Wang CK, Blue TE, Gahbauer RA. A design study of an accelerator-based epidermal neutron source for boron neutron capture therapy. *Strahlenther Onkol.* Feb-Mar;165(2-3):75-8. 1989.
- Weinstein IB, Arcoleo J, Backer J, Jeffrey A, Hsiao WL, Gattoni-Celli S, Kirschmeier P, Okin E. Molecular mechanisms of tumor promotion and multistage carcinogenesis. *Princess Takamatsu Symp.*;14:59-74. Review. 1983
- Wittig A, Hideghety K, Paquis P, Heimans J, Vos M, Goetz C, Haselsberger K, Grochulla F, Moss R, Morrissey J, Bourhis-Martin E, Rassow J, Stecher-Rasmussen F, Turowski B, Wiestler M, deVries MJ, fankhauser H, Gabel D and sauerwein W. Current clinical results of the EORTC-study 11961. In: Sauerwein W, Moss R Wittig A, editors. *Research and Development in Neutron Capture Therapy*, Bologna: Monduzzi Editore; p. 1117-22. 2002.
- Wittig A, Sauerwein WA, Coderre JA. Mechanisms of transport of *p*-boronophenylalanine through the cell membrane *in vitro*. *Radiat Res*;153:173-80. 2000.
- Woloschak GE, Chang-Liu CM, Shearin-Jones P. Regulation of protein kinase C by ionizing radiation. *Cancer Res.* Jul 1;50(13):3963-7. 1990.
- Wynder EL, Mushinski MH, spivak JC. Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. *Cancer.* Oct;40(4 Suppl):1872-8. Review. 1977.
- Wyzlic IM, Tjarks W, Soloway AH, Anisuzzaman AK, Rong FG, Bsrth RF. Strategies for the design and synthesis of boronated nucleic acid and protein components as potential delivery agents for neutron capture therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*30;28(5):1203-13, 1994.

- Yang W, Barth RF, Rotaru JH, Moeschberger M, Joel DD, Nawrocky MM, Goodman JH. Enhanced survival of glioma bearing rats following boron neutron capture therapy with blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of boronophenyl-alanine. *J. Neurooncol.* 33, 59-70. 1997.
- Yuan ZM, Egorin MJ, Rosen DM, Simon MA, Callery Ps. Cellular pharmacology of N1- and N8-aziridinyl analogues of spermidine. *Cancer Res.* Feb 1;54(3):742-8. 1994.
- Zahl PA, Cooper FS, Dunning JR. Some in vivo Effects of Localized Nuclear Disintegration Products on a Transplantable Mouse Sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 15;26(10):589-98. 1940.
- Zaider M, Wu CS. The effects of sublethal damage recovery and cell cycle progression on the survival probability of cells exposed to radioactive sources. *Br J Radiol.* Jan;68(805):58-63. 1995.
- Zha X, Ausserer WA, Morrison GH. Quantitative imaging of a radiotherapeutic drug, Na<sup>2</sup>B<sup>12</sup>H<sup>11</sup>SH, at subcellular resolution in tissue cultures using ion microscopy. *Cancer Res.* Oct 1;52(19):5219-22. 1992.
- Zonta A, Prati U, Roveda L, Ferrari C, Zonta S, Clerici AM, Zonta C, Pinelli T, Fossati F, Altieri S, Bortolussi S, Bruschi P, Nano R, Barni S, Chiari P, Mazzini G. Clinical lessons from the first applications of BNCT on unresectable liver metastases. *Journal of Physics: Conference Series* 41: 484-495. 2006.