

Tesis Doctoral

Estudios radiobiológicos de la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) para el tratamiento de cáncer bucal y metástasis hepáticas a nivel experimental

Pozzi, Emiliano César Cayetano

2016-04-22

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

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

Cita tipo APA:

Pozzi, Emiliano César Cayetano. (2016-04-22). Estudios radiobiológicos de la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) para el tratamiento de cáncer bucal y metástasis hepáticas a nivel experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pozzi, Emiliano César Cayetano. "Estudios radiobiológicos de la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) para el tratamiento de cáncer bucal y metástasis hepáticas a nivel experimental". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-04-22.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudios radiobiológicos de la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) para el tratamiento de cáncer bucal y metástasis hepáticas a nivel experimental

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Emiliano César Cayetano Pozzi

Director de Tesis: Dra. Amanda E. Schwint
Director Asistente: Dra. Veronica A. Trivillin
Consejero de Estudios: Dr. Dante Paz

Lugar de trabajo: Departamento de Radiobiología, División Patología de la Radiación y Gerencia de Reactores de Investigación y Producción, Reactor Nuclear RA-3, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2016

Estudios radiobiológicos de la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) para el tratamiento de cáncer bucal y metástasis hepáticas a nivel experimental

Resumen

La Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) es una aplicación de la tecnología nuclear al área biomédica, que se basa en la acumulación selectiva de compuestos borados dentro del tumor y la subsiguiente irradiación con neutrones, generando una reacción de captura neutrónica que libera radiación de partículas de alta transferencia lineal de energía (LET) y corto alcance que resultan letales para la célula. De esta manera BNCT dañaría preferencialmente el tumor sin causar daño significativo al tejido normal.

Nuestro grupo demostró la eficacia terapéutica de la aplicación a nivel experimental de distintos protocolos de BNCT in vivo, utilizando las fuentes de neutrones disponibles inicialmente, es decir los reactores nucleares de experimentación RA-1 (San Martín, Buenos Aires) y RA-6 (Bariloche, Río Negro). Luego, en 2005, la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) construyó una fuente de neutrones térmicos para aplicaciones biomédicas de BNCT en el reactor nuclear RA-3 (Ezeiza, Buenos Aires). Entre los objetivos del presente trabajo se planteó **realizar una adaptación y caracterización dosimétrica de la nueva fuente que permitiera realizar estudios radiobiológicos de BNCT en el modelo experimental de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster**. Se evaluaron las respuestas del tumor, tejido precanceroso y tejido normal en forma comparativa con las otras fuentes utilizadas anteriormente. Los conocimientos obtenidos en estos estudios se emplearon para llevar adelante líneas de investigación para optimizar los protocolos de BNCT, maximizando su eficacia terapéutica, minimizando su radiotoxicidad y evaluando su potencial aplicación a otras patologías.

En este contexto y dado el interés de la comunidad internacional de explorar el potencial terapéutico de BNCT para el tratamiento de metástasis hepáticas, otro objetivo principal de esta tesis doctoral fue **realizar una evaluación sistemática de la eficacia terapéutica del BNCT en un modelo experimental de metástasis hepática, y considerar la potencial radiotoxicidad del tratamiento sobre el hígado**.

Se realizó la puesta a punto de un modelo *in vivo* en ratas, se desarrolló y caracterizó dosimétricamente un sistema adecuado de blindaje para luego realizar los estudios de BNCT *in vivo* en la fuente del reactor RA-3. Se evaluó la respuesta del tumor y aspectos de la radiotoxicidad en hígado para contribuir al conocimiento de la radiobiología de BNCT en el tratamiento de esta enfermedad.

Los conocimientos de la radiobiología de BNCT obtenidos en modelos experimentales permitirían optimizar BNCT para distintas patologías.

Palabras clave: *Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT); reactor RA-3; modelo experimental; cáncer bucal; metástasis hepáticas; BPA; GB-10*

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)

radiobiological studies in experimental models for the treatment of oral cancer and liver metastasis

Abstract

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) applies nuclear technology to biomedicine. BNCT is based on the selective accumulation of boron compounds in tumor cells, followed by irradiation with neutrons. The capture reaction between a thermal neutron and a ^{10}B atom gives rise to short range particles with high linear energy transfer (LET) that are lethal for the cell. Thus BNCT would damage tumor without causing significant damage to normal tissue.

Our group demonstrated the therapeutic efficacy of the application of different experimental BNCT protocols *in vivo* employing the neutron sources initially available, i.e. the experimental nuclear reactors RA-1 (San Martín, Buenos Aires) and RA-6 (Bariloche, Río Negro). After that, in 2005, the National Atomic Energy Commission of Argentina (CNEA) built a neutron source for BNCT biomedical applications at the nuclear reactor RA-3 (Ezeiza, Buenos Aires). The first aim of the present PhD thesis was to **adapt and dosimetrically characterize the new source to be able to perform BNCT radiobiological studies in the hamster cheek pouch oral cancer model**. We evaluated the response of tumor, precancerous tissue and normal tissue, as compared to studies performed previously at other neutron sources. The knowledge contributed by these studies made it possible to undertake research projects devoted to optimize BNCT protocols, maximizing their therapeutic efficacy and minimizing their toxicity, and examining their potential for the treatment of other pathologies.

Within this context, and based on the interest of the international community to explore the therapeutic potential of BNCT for liver metastasis, the next major aim of this PhD thesis was to **perform a systematic evaluation of the therapeutic efficacy of BNCT in an experimental model of liver metastasis, considering the potential toxicity in liver**.

The *in vivo* experimental model in rats was adapted and characterized. Subsequently, a shielding device to perform the *in vivo* BNCT studies at the RA-3

facility was designed, constructed and characterized dosimetrically. Tumor response and potential liver toxicity were evaluated to contribute to the knowledge of BNCT radiobiology for the treatment of this pathology.

The knowledge of BNCT radiobiology derived from experimental models would allow for the optimization of BNCT for different pathologies.

Key words: Boron Neutron Capture Therapy (BNCT); nuclear reactor RA-3; experimental model; oral cancer; liver metastasis; BPA; GB-10

La presente Tesis Doctoral dio origen a las siguientes publicaciones en revistas internacionales, con referato de pares:

1. DOSIMETRY AND RADIOBIOLOGY AT THE NEW RA-3 REACTOR BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY (BNCT) FACILITY: APPLICATION TO THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL ORAL CANCER. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl):S309-12, (2009). **Pozzi E**, Nigg DW, Miller M, Thorp SI, Heber EM, Zarza L, Estryk G, Monti Hughes A, Molinari AJ, Garabalino M, Itoiz ME, Aromando RF, Quintana J, Trivillin VA, Schwint AE.
2. INTERCALIBRATION OF PHYSICAL NEUTRON DOSIMETRY FOR THE RA-3 AND MURR THERMAL NEUTRON SOURCES FOR BNCT SMALL-ANIMAL RESEARCH. *Applied Radiation and Isotopes* 69(12):1921-1923, (2011). **Pozzi ECC**, Thorp S, Brockman J, Miller M, Nigg DW, Hawthorne MF.
3. BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY (BNCT) FOR LIVER METASTASIS: THERAPEUTIC EFFICACY IN AN EXPERIMENTAL MODEL. *Radiation and Environmental Biophysics* 51(3):331-9, (2012). **Pozzi ECC**, Cardoso JE, Colombo LL, Thorp S, Monti Hughes A, Molinari AJ, Garabalino MA, Heber EM, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Quintana J, Trivillin VA, Schwint AE.
4. BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY (BNCT) FOR LIVER METASTASIS IN AN EXPERIMENTAL MODEL: DOSE-RESPONSE AT FIVE-WEEK FOLLOW-UP BASED ON RETROSPECTIVE DOSE ASSESSMENT IN INDIVIDUAL RATS. *Radiation and Environmental Biophysics* 52(4):481-91, (2013). **Pozzi ECC**, Trivillin VA, Colombo LL, Monti Hughes A, Thorp S, Cardoso JE, Garabalino MA, Molinari AJ, Heber EM, Curotto P, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Schwint AE.

A Clau y nuestros hijos Santi, Viole y Fede.

*A mi hermana Daniela y a quienes, como ella, no pierden la esperanza
y siguen luchando incansablemente.*

Ellos le dan verdadero sentido a nuestros esfuerzos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco formalmente a la CNEA, la ANPCyT y el CONICET, por los recursos asignados a nuestros proyectos que sirvieron para realizar esta tesis.

Luego de trabajar tantos años en este proyecto, siento que no me van a alcanzar las expresiones de agradecimiento para tantas personas que me acompañaron y ayudaron de alguna manera a transitar este camino. Si mi memoria me falla, o no hago mención especial de algunos, les pido disculpas y les agradezco sinceramente.

A mi grandiosa directora Mandy... siempre me pregunto qué hubiese pasado si no caía en tus manos... creo que sin tu guía no llegaba hasta acá, no lo terminaba o simplemente no lo empezaba! Gracias por enseñarme a crecer en mi carrera profesional y, por encima de todo, desde lo humano. Por la paciencia para escucharme discutir hasta lo indiscutible!! Expresado de la forma más fácil que alguna vez escuché, gracias por ser tan "Mandy".

A mi genial co-directora Vero!, gracias por todas las horas de mesada juntos, la dedicación y aliento constante para con mi trabajo. Aprendí y, sobretodo, disfruté muchísimo trabajando a tu lado. Gracias por prestarme tu mano experta!, creo que sin tu criterio en el manejo de los animales todavía estaría probando un montón de cosas!

A todo el "team", gracias por hacerme sentir siempre cerca incluso a la distancia, por la buena onda y el trabajo en equipo que compartimos.

Lisien, gracias en especial por toda la ayuda en mis inicios con el modelo de hámster y por las discusiones y dudas que siempre compartimos!

Marce, siempre valoro ese empuje y voluntad que tenés para sacar las cosas adelante, un gracias súper especial por todas las mediciones de boro!

Andreita, gracias por toda esa energía que irradias siempre, por bancarme en los cursos de doctorado que compartimos (sobre todo prestándome todos tus apuntes!) y por las discusiones sobre mucositis.

Silvia! Gracias por el enorme apoyo constante e incondicional para empujarme a avanzar en este trabajo. Por todas las "clases particulares" sobre tantos temas que me ayudaron en la tesis, la ayuda que me brindaste con las interminables mediciones de flujo y los cálculos de dosis. Por tu profesionalismo y el ejemplo que trasmitís.

Al grupo de "refugiados" Paula, Ariel, Lucila, por el entusiasmo, el interés y el apoyo para con este proyecto y mi trabajo de tesis.

A Pau y Sil, también por bancarme con las irradiaciones, es un verdadero gusto formar parte del equipo de la FCCT!

A mis jefes, Jorge Quintana y Marcelo Otero, por la confianza y la libertad que me dieron desde que me recibí para poder encarar este doctorado. A Jorge un agradecimiento especial: por haberme presentado y recomendado con Mandy!!

Al grupo de Operación del RA-3, los Operadores y Jefes de Turno, por bancarme tantos cambios de turnos y por la paciencia durante tantas experiencias!

Al grupo de Radioprotección del RA-3, por la paciencia que me tuvieron tantas veces y por prestarme las cadenas de espectrometría para realizar las mediciones de flujo.

Al grupo de Mantenimiento y el resto del personal del reactor, porque con su laburo hacen que este tipo de trabajos sea posible.

A Marcelo Miller, por creer y promover que en el RA-3 se podían hacer otras cosas, y por confiar tanto en mí desde el comienzo en este tema.

A David Nigg, por todo el apoyo, y por el asesoramiento y la donación del material para construir los blindajes que aquí presento. Porque es un verdadero honor haber tenido la oportunidad de trabajar contigo.

A Mariel y Romi, por toda la ayuda con la interpretación histológica. A Mariel, gracias en especial por todo lo que nos inspira y enseña, siempre es un gran placer y un honor compartir momentos con usted.

Gracias a la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología (UBA) por el procesamiento de tantas muestras.

A la gente del post-grado y doctorado del DBEE de la FCEN, por la ayuda para cumplir con todas las cuestiones administrativas.

A todos los integrantes del proyecto BNCT de la CNEA, por formar un grupo de excelencia que sirve de ejemplo de trabajo interdisciplinario.

A los jefes del Proyecto BNCT en estos años, Sara Liberman y Gustavo Santa Cruz, por el apoyo y estímulo constante al grupo del RA-3.

A Gustavo y Sarita, por tantas enseñanzas sobre dosimetría y por el apoyo constante a mi trabajo, es un gran placer poder colaborar con ustedes.

Al hermoso grupo de chicas que almuerzan juntas en radiobiología con mi grupo, Moni, Betty, Gisele, Agus, Euge, Johana, es un placer que siempre me inviten a compartir momentos con ustedes!

A Silva Bortolussi y a Saverio Altieri, por todo el apoyo que me dieron en el corto tiempo que estuve trabajando en Italia.

A Mario, Manuel, Silva, Rubén y Agustina por el interés en mi tesis y las interesantes discusiones sobre diferentes temas que aportaron a mi trabajo. A Rubén, un agradecimiento especial por las simulaciones del blindaje de rata.

A Ana Molinari, por toda tu ayuda cuando trabajamos juntos en el labo, en particular cuando pusimos a punto el modelo de metástasis en hígado.

A Jorge Cardoso, por su tiempo y todo lo que nos enseñó sobre el modelo de rata y las cirugías en particular, parte fundamental de esta tesis.

A Lucas Colombo, por toda la ayuda con el cultivo de las células y lo que me enseñaste sobre el tema, y por contagiarme con tu inagotable entusiasmo y dedicación a la investigación.

A Ramón Pizarro, por todo su apoyo e interés por mi trabajo, y los "empujones" de pasillo para apurarme a terminar con la tesis.

Al Dr. Cabrini, por la inspiración que trasmite con su incansable entusiasmo por el trabajo.

A mis amigos Juan y María José, por estar siempre ahí.

A mi compadre Pablo, por apoyarme siempre y darme una mano para concretar este tipo de proyectos.

A todos mis amigos, por compartir su amistad conmigo y tantos lindos momentos durante estos años.

A mi Mamá, por el amor incondicional y por todo el estímulo que hizo posible que yo llegue hasta acá. Te quiero mucho ma.

Al resto de la familia, mi abuela, mis hermanas y mi sobrina, por el cariño y por creer siempre en lo que hago aunque muchas veces no entiendan de qué se trata!

A mi hermana Dani, por entenderme en momentos que tal vez no podías y me necesitabas un poco más.

A mis suegros y mis cuñadas, por apoyarnos siempre a Clau y a mí en nuestros proyectos, y por ayudarnos con los chicos!

A mis tres amores, Santi, Viole y Fede... realmente son las estrellas que me guían en la vida, por hacerme feliz y estimularme a seguir por este camino.

Y a Clau! el logro de terminar esta tesis lo compartimos de punta a punta, me bancaste y estimulaste para alcanzarlo, siempre juntos a la par! GRACIAS por acompañarme y por elegirme para compartir tu vida cada día. Te AMO!

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	2
Abstract	4
Capítulo 1	17
1 Introducción general	17
1.1 El cáncer	17
1.1.1 Etiología.....	17
1.1.2 La complejidad del cáncer	18
1.1.3 Los rasgos distintivos del cáncer (“Hallmarks of Cáncer”).....	19
1.2 Estadísticas sobre el cáncer	22
1.2.1 Incidencia y mortalidad por tipo de cáncer.....	22
1.2.2 Proyección a futuro.....	24
1.2.3 Casos de mayor interés para esta tesis.....	25
1.2.3.1 Cáncer bucal	25
1.2.3.2 Cáncer colorrectal	27
1.2.3.3 Metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorrectal (MHCR)	28
1.3 Tratamientos para el cáncer	28
1.4 Radioterapia	30
1.5 La importancia de la radiobiología	31
1.5.1 Tiempos involucrados en los procesos radiobiológicos	31
1.5.2 Propiedades de las radiaciones ionizantes al atravesar un sistema biológico.....	33
1.5.3 Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes	36
1.5.3.1 Influencia del oxígeno en la acción biológica de la radiación	37
1.5.3.2 Eficacia Biológica Relativa	40
1.6 Terapias binarias: en busca de un tratamiento selectivo	42
1.7 La Terapia por Captura Neutrónica en Boro	43

1.7.1	La reacción $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$	45
1.7.2	Los compuestos borados.....	46
1.7.2.1	Optimización de protocolos empleando compuestos borados aprobados para el uso en humanos	49
1.7.2.2	BPA (borofenilalanina)	51
1.7.2.3	BSH (sodio mercaptoundecahidro-closo-dodecaborato).....	53
1.7.2.4	GB-10 (decahidrodecaborato de sodio)	53
1.7.3	Fuentes de neutrones usadas en BNCT.....	54
1.7.4	Dosimetría en BNCT.....	58
1.7.4.1	Consideraciones básicas para la estimación de dosis equivalente .	60
1.7.4.2	Requisitos futuros para una mejor comparación de dosis.....	61
1.7.5	Resumen sobre ensayos clínicos de BNCT en el mundo	63
1.7.6	Proyecto BNCT en Argentina.....	65
1.8	Antecedentes de nuestro laboratorio	67
1.9	Reactor RA-3.....	68
1.9.1	Columna Térmica del reactor RA-3	69
1.9.2	Facilidad de irradiación Central de Columna Térmica	70
1.10	Hipótesis de trabajo	73
Capítulo 2		74
2 Aplicación de BNCT al tratamiento de cáncer bucal experimental en la facilidad de irradiación central de la columna térmica del reactor RA-3.....		74
2.1	Tratamiento clínico de tumores de cabeza y cuello por BNCT	74
2.2	Antecedentes del trabajo.....	76
2.3	Consideraciones generales sobre el modelo biológico a estudiar.....	77
2.3.1	Ventajas y desventajas del modelo	79
2.3.2	Carcinogénesis química en la bolsa de la mejilla del hámster	80
2.4	Objetivos.....	84

2.5	Evaluación dosimétrica de la FCCT del reactor RA-3 para realizar experimentos <i>in vivo</i>: estudio piloto en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster	85
2.5.1	Materiales y métodos	85
2.5.1.1	Caracterización del espectro de flujo neutrónico de la FCCT: mediciones en campo libre	85
2.5.1.2	Distribución de flujo dentro del cuerpo del animal	89
2.5.1.3	Análisis por activación neutrónica	90
2.5.1.4	Medición de tasa de dosis gamma	91
2.5.1.5	Inducción de tumores en el MCBH	91
2.5.1.6	Manejo de los animales	92
2.5.1.7	Preparación de compuestos borados	92
2.5.1.8	Estudio piloto de BPA-BNCT <i>in vivo</i>	93
2.5.1.9	Prescripción y cálculo de dosis	93
2.5.1.9.1	Medición de flujo para las experiencias de BNCT <i>in vivo</i>	95
2.5.1.9.2	Dosis gamma, D_γ	96
2.5.1.9.3	Dosis de neutrones rápidos, D_n	97
2.5.1.9.4	Dosis de protones de la reacción de captura con nitrógeno, D_N	97
2.5.1.9.5	Dosis boro, D_B	98
2.5.1.10	Evaluación de la respuesta tumoral	98
2.5.2	Resultados y Discusión	99
2.5.3	Discusión	104
2.5.4	Conclusiones preliminares	105
2.6	Desarrollo y caracterización de un blindaje neutrónico en la FFCT del reactor RA-3, para la aplicación de BNCT en el modelo experimental de cáncer bucal	106
2.6.1	Materiales y métodos	106
2.6.1.1	Elección del material para el blindaje	106
2.6.1.2	Diseño del blindaje de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$	107
2.6.1.3	Caracterización dosimétrica del blindaje	110
2.6.2	Resultados	111
2.6.3	Discusión y conclusiones	113

2.7 Evaluación de la eficacia terapéutica y radioxicidad del tratamiento con BNCT en el modelo de cáncer bucal de la mejilla del hámster en el reactor RA-3	115
2.7.1 Introducción	115
2.7.2 Materiales y métodos	115
2.7.2.1 Inducción de los tumores y manejo de los animales	115
2.7.2.2 In vivo BNCT	116
2.7.2.3 Dosimetría	117
2.7.2.4 Seguimiento de los animales	118
2.7.3 Resultados	119
2.7.4 Discusión	123

Capítulo 3 129

3 Aplicación de BNCT al tratamiento de un modelo experimental de metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorrectal en la facilidad de irradiación central de la columna térmica del reactor RA-3 129

3.1 Metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorrectal	129
3.2 BNCT como alternativa de tratamiento de MHCR	130
3.3 Antecedentes clínicos recientes	131
3.4 Antecedentes de estudios experimentales	134
3.5 Objetivo específico y resumen referido a este capítulo	137
3.6 Elección del modelo experimental	138
3.7 Puesta a punto del modelo experimental de metástasis hepáticas de cáncer colorectal	141
3.7.1 Cultivo de células	141
3.7.2 Método de inoculación de células en forma sub-capsular	141
3.7.3 Ensayos de puesta a punto del modelo	145
3.7.4 Resultados de la puesta a punto del modelo	146
3.7.5 Conclusión de la puesta a punto del modelo	150

3.8	Desarrollo de un blindaje de neutrones para realizar estudios de BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de metástasis hepáticas seleccionado	151
3.8.1	Diseño del blindaje	151
3.8.2	Caracterización dosimétrica del blindaje	153
3.8.3	Conclusiones relativas al desarrollo del blindaje	160
3.9	Estudios de BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de metástasis hepáticas en el reactor nuclear RA-3	161
3.9.1	Primera etapa: evaluación de la eficacia terapéutica.....	161
3.9.1.1	Materiales y métodos	161
3.9.1.2	Resultados	170
3.9.1.3	Discusión.....	177
3.9.1.4	Conclusión	180
3.9.2	Segunda etapa: Control tumoral en función de la dosis de BNCT luego de 5 semanas de seguimiento	181
3.9.2.1	Materiales y Métodos	181
3.9.2.2	Resultados	187
3.9.2.3	Discusión.....	198
3.9.2.4	Conclusión	204
4	Discusión final	205
5	Referencias	209
	ANEXO I: Técnica de Activación Neutrónica para determinación de flujos térmicos (Knoll, 1989).....	236
	ANEXO II: Consideraciones sobre la generación de tritio en el blindaje de Li ₂ CO ₃	240
	ANEXO III Activación post-irradiación	245
	ANEXO IV: Determinación del espesor de blindaje.....	247
	ANEXO V	250

Capítulo 1

1 Introducción general

1.1 El cáncer

El término “cáncer” no se refiere a una sola patología, sino que designa a un amplio grupo de enfermedades que comienzan en las células, componentes básicos del organismo. Para entender por qué se produce esta patología es necesario referirse a lo que sucede cuando las células normales se hacen cancerosas (<http://www.msal.gov.ar/> 2013).

El cuerpo está compuesto por muchos tipos de células que, normalmente, crecen y se dividen para producir nuevas células que son indispensables para mantener sano al organismo. Algunas veces este proceso ordenado se descontrola. Nuevas células se siguen formando cuando el cuerpo no las necesita y otras viejas no mueren cuando deberían morir, formando una masa de tejido que se denomina tumor.

Los tumores benignos no se consideran cancerosos ya que las células de este tipo de tumores no se diseminan a otras partes del cuerpo, crecen en el lugar, generalmente se pueden extirpar quirúrgicamente y en la mayoría de los casos no reaparecen.

Los tumores malignos son cancerosos, dado que sus células tienen anomalías, se dividen sin control y sin orden, pueden invadir y destruir el tejido a su alrededor, entrar al torrente sanguíneo o al sistema linfático y diseminarse a otros órganos. Al proceso por el cual el cáncer puede diseminarse desde el sitio primario y formar nuevos tumores en otros órganos se lo denomina metástasis (<http://www.msal.gov.ar/> 2013).

1.1.1 Etiología

El cáncer es causado por anomalías en el material genético de las células. Es una enfermedad multigénica y multicelular que puede originarse en todos los tipos celulares y órganos con una etiología multifactorial.

Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos, a saber:

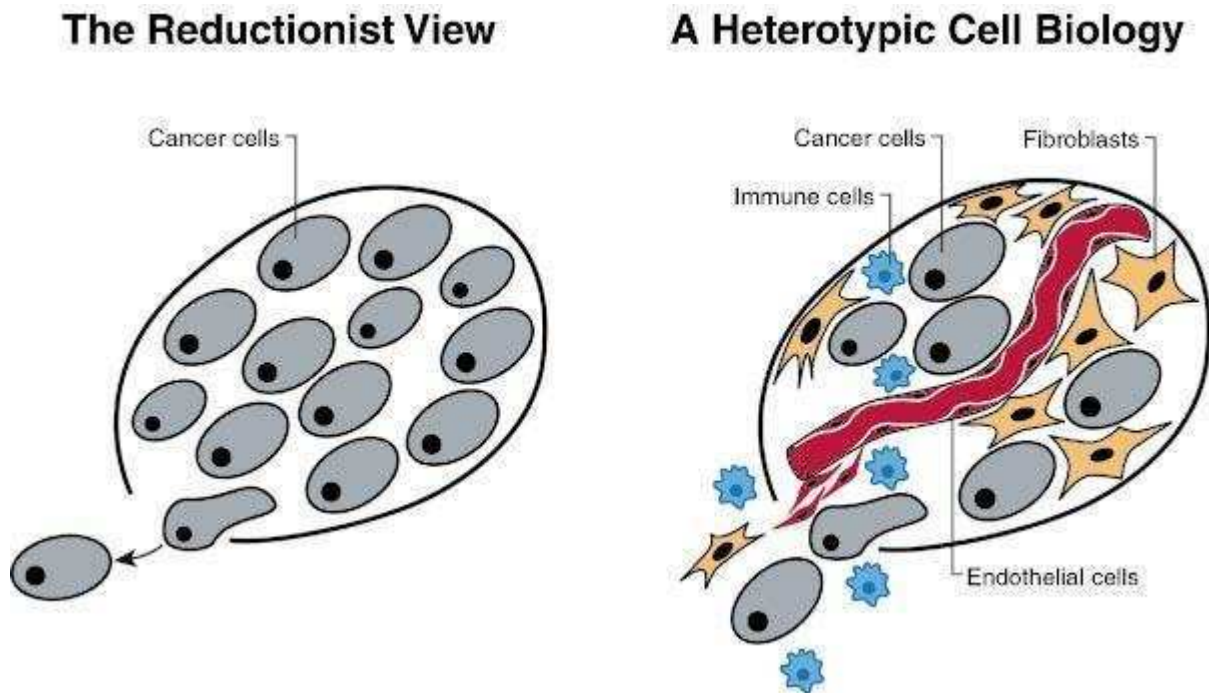
- carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizante;
- carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida), etc.;
- carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta muchísimo con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> 2015).

1.1.2 La complejidad del cáncer

El campo de la investigación sobre el cáncer ha sido en gran parte guiado por un enfoque reduccionista de las células cancerosas y los genes dentro de ellas (Figura 1.1), que ha producido un extraordinario avance en el conocimiento de esta enfermedad (Hanahan y Weinberg 2000). Según esta visión se podría llegar a entender la biología completa del cáncer a partir del descubrimiento de las características propias de estas células-autónomas (Hanahan y Weinberg 2011). Sin embargo, en las últimas décadas este enfoque fue cambiando y hoy los tumores son considerados como tejidos complejos, donde las células cancerosas mutadas reclutan diferentes tipos de células normales que sirven como colaboradores activos en su desarrollo neoplásico (Figura 1.1, Hanahan y Weinberg 2000). Desde esta perspectiva, la biología de un tumor puede ser solo entendida estudiando los tipos de células individuales especializadas dentro de él, tanto como el “microambiente tumoral” que se establece entre ellas a partir de su interacción (Hanahan y Weinberg 2011).

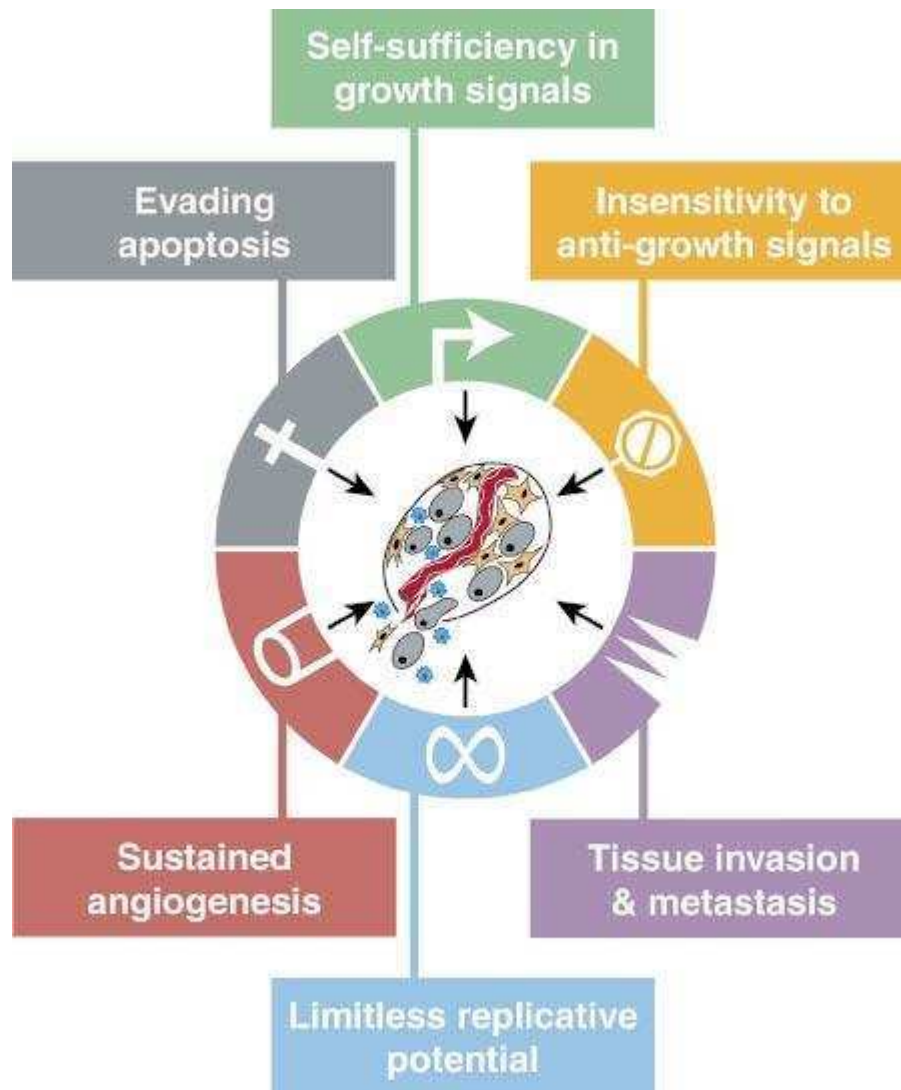
Figura 1.1 El enfoque reduccionista ha guiado por mucho tiempo la investigación sobre el cáncer aportando en forma extraordinaria al conocimiento de esta patología (panel izquierdo). Sin embargo, se ha comprobado que las interacciones entre las células malignas genéticamente alteradas y las células de soporte, son críticas para el entendimiento de la biología del cáncer y para el desarrollo de terapias nuevas y más efectivas (panel derecho) (extraído de Hanahan y Weinberg 2000).



1.1.3 Los rasgos distintivos del cáncer (“Hallmarks of Cáncer”)

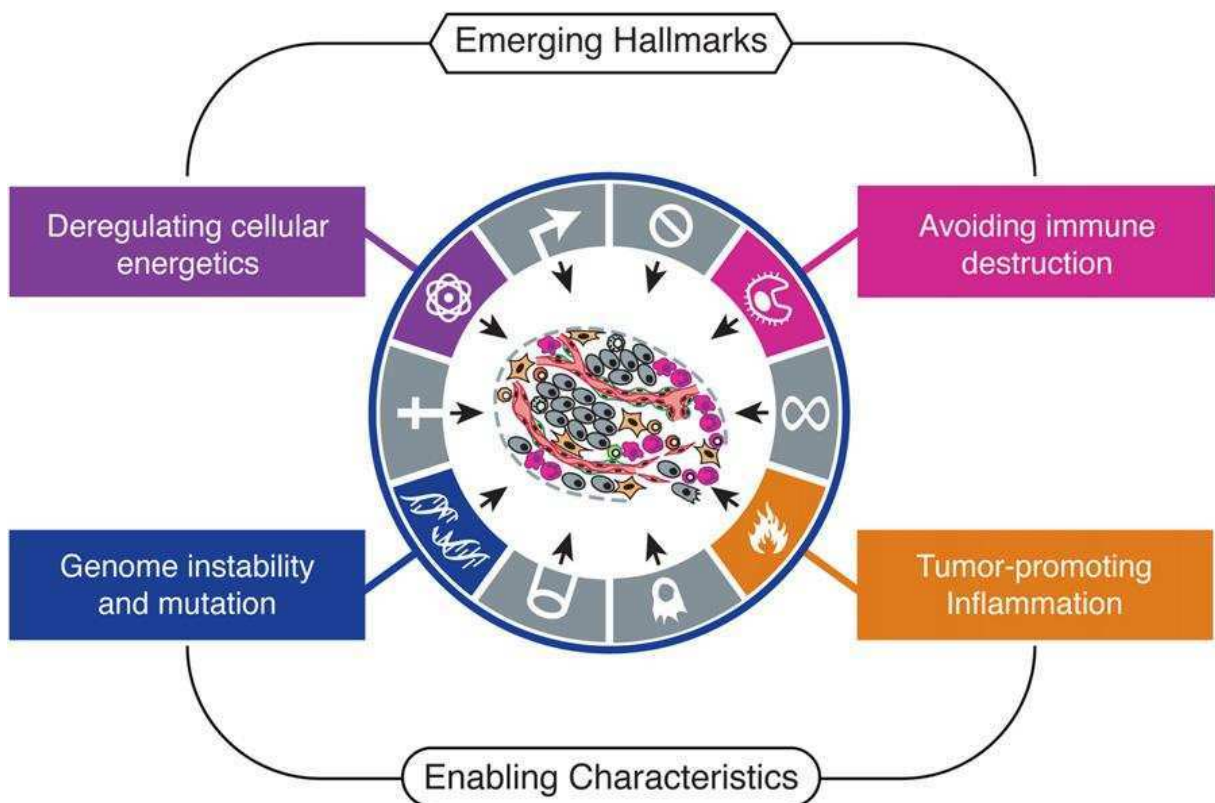
Hanahan y Weinberg, en el año 2000, sugirieron la existencia de 6 “rasgos de identidad” característicos del cáncer: células autosuficientes en cuanto a señales de crecimiento; con potencial proliferativo ilimitado; con capacidad de evadir los factores supresores de crecimiento; de evadir la apoptosis; de inducir angiogenesis; y de invadir y metastatizar a diferentes partes del cuerpo (Figura 1.2, Hanahan y Weinberg 2000).

Figura 1.2 Rasgos de identidad adquiridos del cáncer. Más de una década atrás Hanahan y Weinberg sugieren que la mayoría de los cánceres adquieren el mismo set de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque a través de diferentes mecanismos (extraído de Hanahan y Weinberg 2000).



En el año 2011, estos mismos autores plantearon agregar, a estas 6 características, la capacidad de reprogramar el metabolismo celular para favorecer la proliferación y la capacidad de evadir el sistema inmune. A su vez plantearon que la mutación, la inestabilidad genómica, la promoción tumoral por parte de la inflamación y la constitución del microambiente tumoral son elementos cruciales para la adquisición de estos rasgos distintivos (Figura 1.3, Hanahan y Weinberg 2011).

Figura 1.3 Las investigaciones más recientes sugieren que dos rasgos adicionales del cáncer están involucrados en la patogénesis de algunos y quizás todos los cánceres. Uno involucra la capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo celular para lograr un soporte neoplásico más eficiente. El segundo permite a las células tumorales evadir la destrucción inmunológica, en particular, mediada por linfocitos T y B, macrófagos y células NK (natural killers). Debido a que todavía ninguna de estas capacidades se encuentra completamente validada y generalizada, los autores las han denominado “rasgos emergentes” (“Emerging Hallmarks”). Adicionalmente, dos características asociadas a la neoplasia facilitan la adquisición de los rasgos de identidad (incluyendo los rasgos aceptados como emergentes). La inestabilidad genómica dota a las células cancerosas de alteraciones genéticas que conducen a la progresión tumoral. La inflamación mediada por las células inmunes innatas asociada a la lucha contra infecciones y la cicatrización de heridas, puede dar lugar a la tan ampliamente descrita promoción tumoral como consecuencia de las respuestas inflamatorias (extraído de Hanahan y Weinberg 2011).



1.2 Estadísticas sobre el cáncer

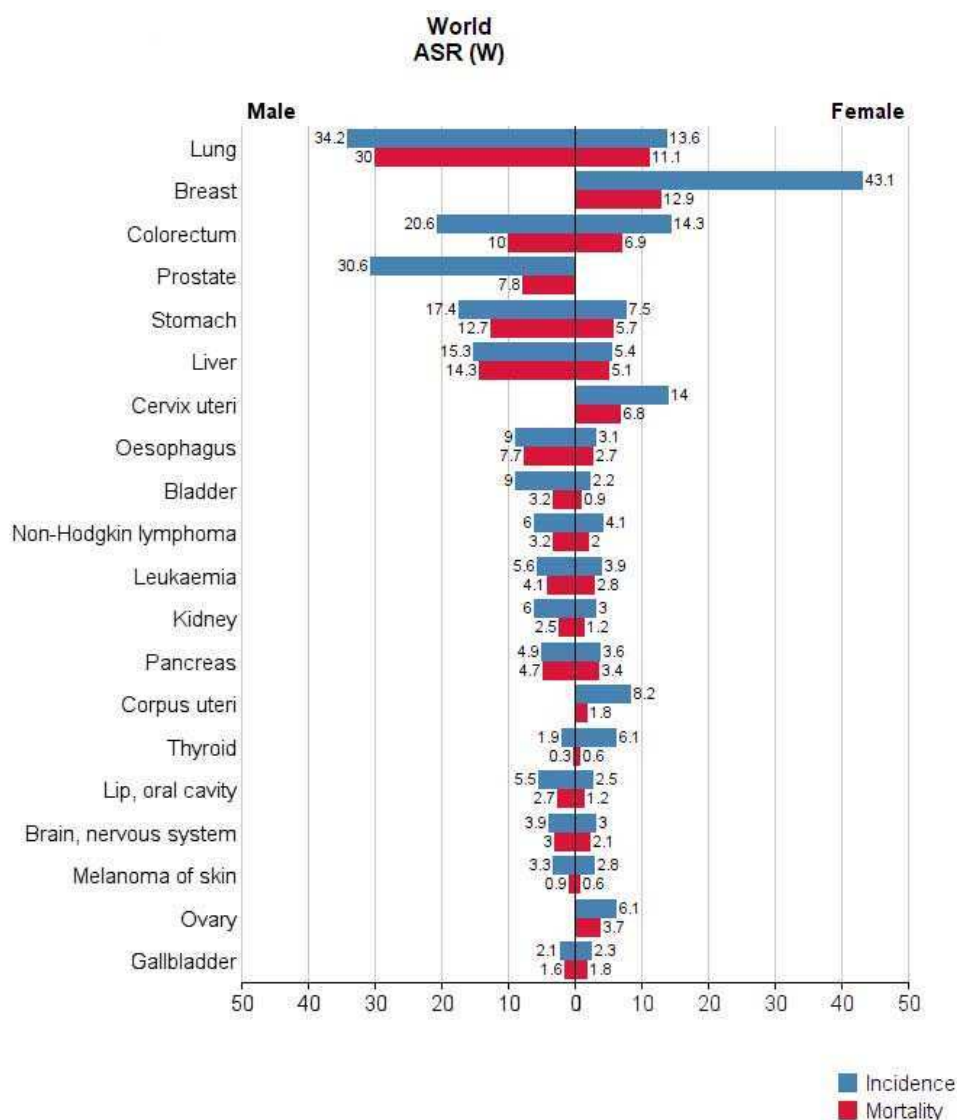
El cáncer continúa siendo una de las principales causas de muerte a nivel global. Según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC), durante el año 2012, se produjeron a nivel mundial 14,1 millones de nuevos casos de cáncer, 8,2 millones de muertes por cáncer y 32,6 millones de personas viviendo con la enfermedad (dentro de los 5 años de diagnóstico). De estas cifras, el 57% (8 millones) de los nuevos casos de cáncer, 65% (5,3 millones) de las muertes por cáncer y 48% (15,6 millones) de los casos de cáncer prevalentes a 5 años, ocurrieron en las regiones menos desarrolladas (Baskar et al. 2012; GLOBOCAN, IARC, WHO 2012a). Al respecto, cabe mencionar las disparidades que existen en los patrones de incidencia y mortalidad entre los países desarrollados y en desarrollo, que reflejan diferencias regionales en la prevalencia, la distribución de los principales factores de riesgo, las prácticas de detección y/o la disponibilidad y accesibilidad a los servicios de tratamiento (Gualdrini y Iummato 2011).

1.2.1 Incidencia y mortalidad por tipo de cáncer

En el mundo, los cinco cánceres más frecuentes en mujeres son el de mama, en primer término, y luego, el colorrectal, de cuello uterino, de pulmón y de estómago, en ese orden. Aquellos que provocan la mayor mortalidad, de mayor a menor, son el cáncer de mama, de pulmón, el colorrectal, de cuello uterino y de estómago (Figura 1.4, GLOBOCAN, IARC, WHO 2012b).

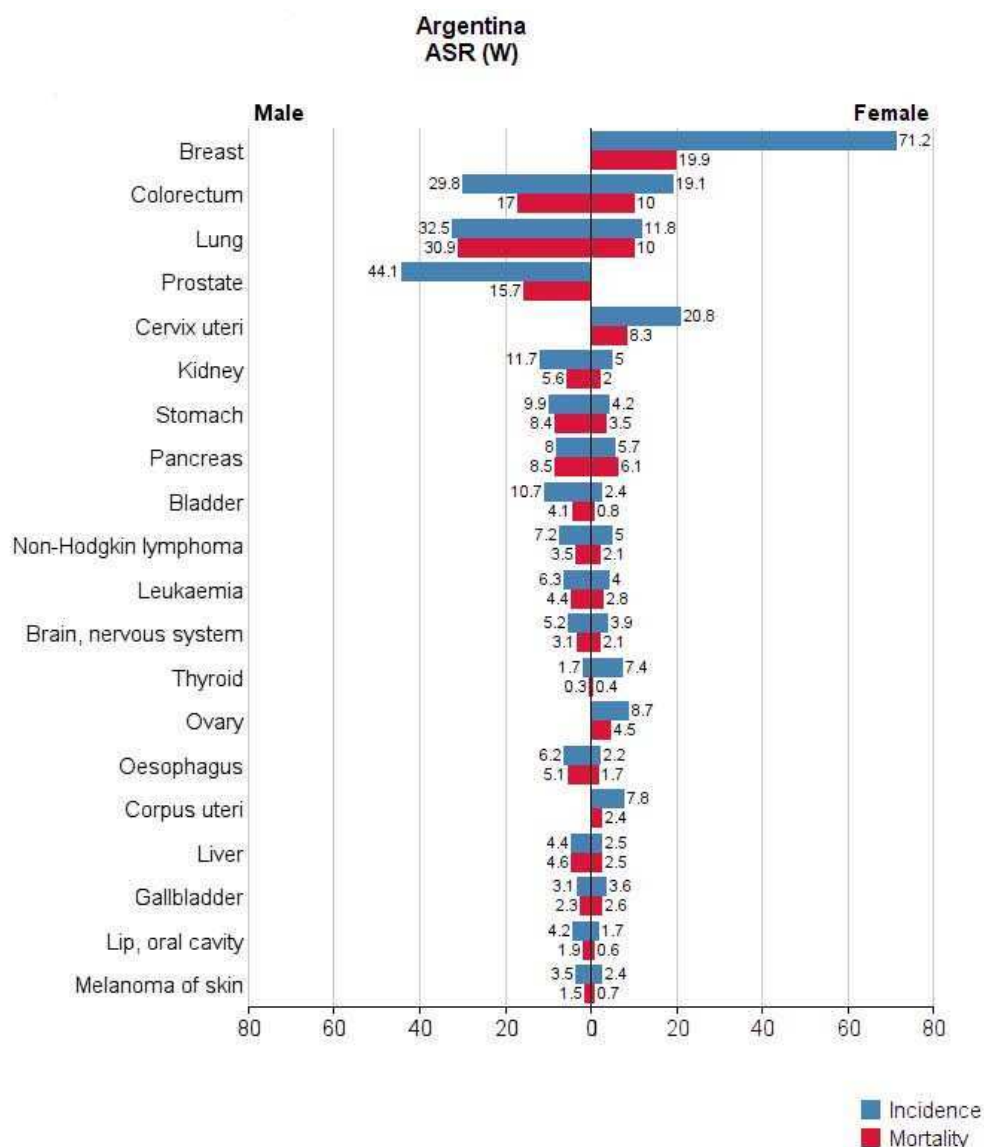
En la población masculina, los cinco cánceres de mayor incidencia a nivel mundial son los de pulmón, de próstata, el colorrectal, de estómago y de hígado, en ese orden; mientras que los de mayor mortalidad en orden decreciente son los de pulmón, de hígado, de estómago, el colorrectal y de próstata (Figura 1.4, GLOBOCAN, IARC, WHO 2012b).

Figura 1.4 Valores de incidencia y mortalidad por tipo de cáncer registrados según la IARC para ambos sexos en el mundo (GLOBOCAN, IARC, WHO 2012b). ASR (age-standardised rate): tasa de incidencia estandarizada por edad por cada 100.000 habitantes, es una medida de la tasa de incidencia/mortalidad que una población debería tener si esa población tuviera una estructura de edad estándar. La estandarización es necesaria cuando se quiere comparar poblaciones que difieren con respecto a la estructura etaria, debido a que la edad posee una gran influencia sobre el riesgo de padecer cáncer.



Los datos de incidencia de cáncer en la Argentina, según esta misma fuente, muestran que el cáncer de mayor incidencia en mujeres sería el de mama, seguido por el de cuello uterino y el colorrectal; y en los hombres, el cáncer de próstata seguido por el de pulmón y el colorrectal (Figura 1.5, GLOBOCAN, IARC, WHO 2012b).

Figura 1.5 Valores de incidencia y mortalidad por tipo de cáncer registrados según la IARC para ambos sexos en la Argentina (GLOBOCAN, IARC, WHO 2012b).



1.2.2 Proyección a futuro

Según un informe reciente de la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), el siglo XX en América Latina y el Caribe estuvo caracterizado, en términos demográficos, por el crecimiento de la población; mientras que el siglo XXI estará marcado por su envejecimiento, debido principalmente a la reducción de la fecundidad y al aumento de la esperanza de vida (Miller et al. 2014).

Entre 2010 y 2050, la población mundial de 65 años o más se multiplicará más de tres veces pasando de 500 a 1.600 millones, y la mayor parte de ese

aumento se producirá en países en desarrollo, (U.S. Census Bureau 2011, <http://www.census.gov/population/international>).

Si bien esta tendencia a nivel mundial puede considerarse en parte un éxito de las políticas de salud pública y del desarrollo socioeconómico, también constituirá un reto para la sociedad y la salud pública que deberá adaptarse a ello (Loria et al. 2010).

Dentro de Latinoamérica, Cuba y Uruguay lideran el nivel de envejecimiento regional seguidos por Argentina y Chile (Gualdrini y Iummato 2011).

En nuestro país se estima que habrá, para el 2030, un total de 6.800.000 personas de 65 ó más años, lo que representa un crecimiento del 50% con respecto a 2010 (U.S. Census Bureau 2011, <http://www.census.gov/population/international>).

Estas tendencias actuales indican que la carga de la enfermedad en las regiones menos desarrolladas del mundo puede ser aún mayor en 2030, si estos países continúan con su tendencia hacia un estilo de vida más occidental, con aumento de la obesidad, un alto consumo de carnes rojas, un menor consumo de frutas y verduras y menos actividad física (Huxley et al. 2009).

1.2.3 Casos de mayor interés para esta tesis

Este trabajo doctoral se basa en estudios a nivel experimental *in vivo* utilizando un modelo de cáncer bucal y un modelo de metástasis en hígado, orientados a evaluar la eficacia terapéutica u optimizar protocolos de Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, y metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorrectal. A continuación se abordan aspectos generales sobre estos dos casos de interés, que luego se profundizan en los siguientes capítulos.

1.2.3.1 Cáncer bucal

El término “cáncer de cabeza y cuello” incluye tumores malignos en diferentes sitios anatómicos, tales como labio, cavidad bucal, nariz y sinusoides para-nasales, nasofaringe, oro faringe, laringo-faringe, laringe, esófago, glándulas salivales, y partes blandas de cuello y oreja (Syrjänen 2005).

Se estima que a nivel mundial durante el año 2008, ocurrieron 263.900 nuevos casos y 128.000 muertes por cáncer de la cavidad bucal (incluyendo cáncer de labio). Las tasas de cáncer bucal y orofaríngeo son más del doble en los hombres que en las mujeres.

Los consumidores de tabaco en cualquier forma comúnmente disponible (cigarrillos, cigarros, pipas y tabaco sin humo), o de grandes cantidades de alcohol, tienen un riesgo elevado de contraer cáncer de boca y un riesgo particularmente alto si consumen ambos. Las personas que mastican nuez de areca (comúnmente conocida como "nuez de betel", debido a que la nuez de areca se masca junto con hojas de la palma de betel), una práctica frecuente en Asia central y Melanesia, también tienen un alto riesgo de contraer cáncer de boca (aunque no mastiquen la nuez de areca mezclada con tabaco). Aquellas personas con infecciones bucales persistentes por cepas carcinogénicas del virus del papiloma humano (VPH) también tienen un riesgo aumentado de transformación maligna. Las personas con exposición solar crónica tienen un riesgo elevado de cáncer de labio, en particular, del labio inferior.

El consumo de tabaco y alcohol causa "cancerización de campo", lo que produce una propensión al desarrollo de segundos tumores primarios en los pacientes de cáncer de boca (<http://www.cancer.gov> 2015).

El carcinoma de células escamosas (OSCC) del epitelio de la mucosa bucal corresponde a más del 90% de las lesiones malignas bucales y orofaríngeas. Algunos reportes lo ubican como el décimoprimer cáncer más común a nivel global, el 3% de todos los casos de cáncer recientemente diagnosticados y el octavo cáncer más predominante en los hombres (Chen y Lin 2010; WHO 2005). En países del sudeste y centro de Asia, debido a la alta prevalencia de la masticación de la nuez de betel y/o tabaco, el carcinoma bucal de células escamosas es el carcinoma más común, comprendiendo aproximadamente un tercio de todos los canceres en esos países.

A pesar de toda la investigación desarrollada, las tasas de mortalidad y morbilidad en pacientes con este carcinoma se mantuvieron relativamente altas e inalteradas (Chen y Lin 2010).

En el presente trabajo, el estudio relacionado a esta problemática se aborda en el capítulo 2.

1.2.3.2 Cáncer colorectal

Excluyendo los tumores de piel no melanóticos, la suma de los cánceres de colon y recto (cáncer colorrectal (CCR)) representa uno de los tumores con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, con una proyección y preocupación crecientes para las próximas décadas (Gualdrini y Iummato 2011).

Al igual que muchos otros tipos de cáncer, el CCR se produce en más del 90% de los casos en personas mayores de 50 años, razón por la cual el envejecimiento que se observa en la población representa un factor primordial a tener en cuenta para analizar las estrategias de control de la enfermedad en los próximos años (Curado et al. 2007).

En nuestro país no hay un registro nacional de tumores, aunque existen datos de incidencia a partir de datos suministrados por los registros provinciales de Córdoba (Capital), Mendoza, Santa Fe, Bahía Blanca, Entre Ríos, la Pampa, Río Negro y Tierra del Fuego (Gualdrini y Iummato 2011). Al igual que se observa en los datos de incidencia de otras regiones del mundo, existe una mayor tasa de incidencia de CCR en hombres que en mujeres en todos los registros.

Según estimaciones de la IARC, en la Argentina se produjeron 13558 nuevos casos del CCR en 2012, de los cuales 7237 fueron en hombres y 6321 fueron en mujeres, con una tasa ajustada de 33/100.000 habitantes (ambos sexos) y un riesgo acumulativo de 2,8 (0 a 74 años). La tasa ajustada de incidencia en mujeres se ubica en el 30,1/100.000 habitantes y en hombres en 36/100.000 habitantes (GLOBOCAN, IARC, WHO 2012a).

De acuerdo con los datos de estadísticas vitales publicados por la Dirección de Estadísticas e Información de Salud (DEIS) de nuestro país, el cáncer colorrectal causó en la Argentina 6.613 muertes en el año 2009, el 11,5% del total de muertes por tumores malignos, de las cuales 3.545 (53%) fueron de hombres. Se ubica en el segundo lugar dentro de las principales causas de muerte por cáncer en el año 2009, luego del cáncer de pulmón con 8.992 muertes (15,6%) y precediendo al cáncer de mama, que produjo 5.466 defunciones (9,5%) (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1 Distribución de las 10 principales localizaciones tumorales registradas en la mortalidad por cáncer en ambos sexos. Argentina, 2009.

Sitio tumoral	Mortalidad		
	Número de casos	Porcentaje (%)	Acumulado (%)
Pulmón	8992	15,6	15,6
Colon-recto	6613	11,5	27,1
Mama	5466	9,5	36,6
Páncreas	3824	6,6	43,2
Próstata	3717	6,5	49,7
Estómago	2836	4,9	54,6
Cuello de útero	2092	3,6	58,2
Leucemia	1826	3,2	61,4
Esófago	1779	3,1	64,5
Hígado y vías biliares	1673	2,9	67,4
Otros	18772	32,6	100

Fuente: Abriata, M. G. SIVER-INC. Ministerio de Salud de la Nación, con base en datos de la DEIS. Argentina, 2011.

1.2.3.3 Metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorrectal (MHCR)

Las metástasis hepáticas son la primera causa de tumores malignos en el hígado y constituyen la segunda localización secundaria más frecuente de las enfermedades neoplásicas malignas, sólo precedida por la localización linfonodal (Martínez et al. 2008).

En particular, 50% de los pacientes con cáncer colorrectal desarrollan metástasis en el hígado, las cuales son responsables de dos tercios de las muertes debidas a esta enfermedad. Contrariamente a otras localizaciones a distancia, las metástasis hepáticas son consideradas una enfermedad locoregional, ya que un tratamiento local puede mejorar la sobrevida global en este grupo de pacientes (Cardoso et al. 2009).

Este caso se retomará con mayor profundidad en el capítulo 3, junto con el estudio experimental relacionado con el tema.

1.3 Tratamientos para el cáncer

Dado el gran número de casos sin tratamiento o con poca expectativa de vida, la investigación orientada hacia nuevos tratamientos que puedan prevenir y curar el cáncer resulta de gran interés clínico.

La radioterapia ha permanecido en los últimos tiempos como uno de los tres tratamientos más eficaces contra el cáncer. Se estima que más de la mitad de todos los pacientes reciben radioterapia en algún punto de su tratamiento (Joiner y van der Kogel 2009).

La cirugía es la primera forma de tratamiento en la mayoría de diferentes tipos de tumores y alcanza muy buenos resultados en un rango de tumores tempranos no metastásicos. La radioterapia es una buena alternativa a la cirugía para el control a largo plazo de varios tumores de cabeza y cuello, pulmón, cérvix, vejiga, próstata y piel, en los cuales a menudo se alcanza una probabilidad de control tumoral razonable junto con buenos resultados cosméticos. Sumado a estos ejemplos sobre el rol curativo de la radioterapia, muchos pacientes obtienen un valioso paliativo con la aplicación de radiaciones. La quimioterapia, es la tercera modalidad de tratamiento más importante. Muchos pacientes reciben quimioterapia en algún punto de su tratamiento, obteniendo un útil alivio de los síntomas y un arresto de la enfermedad. (Joiner y van der Kogel 2009).

Actualmente se están dedicando considerables esfuerzos a la mejora de la radioterapia y la quimioterapia. Incluso existen tratamientos basados en la extirpación quirúrgica combinada con radioterapia convencional y/o quimioterapia.

Sin embargo, en general todas las terapias presentan limitaciones. La extirpación quirúrgica de un tumor no siempre permite la remoción total de las células tumorales implicadas en el desarrollo de la enfermedad, las cuales originarían lo que se denomina “focos de recidiva tumoral” (Ruiz Esquide et al. 2011). Además, aunque estas células podrían ser combatidas con la radioterapia y la quimioterapia, la gran desventaja es la falta de selectividad de daño, que afecta tanto a las células tumorales como a las normales, provocando importantes efectos tóxicos. En el caso de la radioterapia y algunos quimioterapéuticos se busca bloquear la proliferación y, dada su falta de especificidad, es frecuente observar daño a tejidos que en condiciones fisiológicas tienen altas tasas de replicación celular, como la mucosa bucal y la gastrointestinal (Ruiz Esquide et al. 2011).

1.4 Radioterapia

Las primeras utilizaciones de la radiación con fines terapéuticos comenzaron poco después de que Roentgen descubriera los rayos X, en 1895. A la par de brindar información anatómica de las partes internas del cuerpo de manera no invasiva, esta radiación rápidamente mostró ser útil para el tratamiento de lesiones malignas. El primer caso reportado es un tratamiento de cáncer avanzado de mama, en enero de 1896. Por su parte, Marie y Pierre Curie descubrieron el Radio en 1898 y ya en 1904 este isótopo era usado para tratar cáncer de cuello uterino y lesiones de piel (Escobar 2007).

Hoy día se conoce como radioterapia al uso de la radiación ionizante como agente terapéutico para el tratamiento de tumores malignos. Se denomina radiación ionizante a aquellas radiaciones con energía suficiente para lograr, a través de algún mecanismo de interacción, la ionización de la materia que atraviesa (la ionización es la remoción de un electrón de la órbita de un átomo). En el caso de la radioterapia, la radiación ionizante aplicada deposita energía y origina iones en las células que atraviesa. Esta energía puede destruir células cancerosas o causar cambios genéticos que, si no son reparados, resultan en la muerte celular (Jham y da Silva Freire 2006, Baskar et al. 2012). Además la radiación se utiliza a menudo como tratamiento paliativo de enfermedades malignas brindando al paciente una mejor calidad de vida (Escobar 2007).

En la práctica clínica, la mayoría de los tratamientos radioterapéuticos son realizados mediante el uso de fotones (Jham y da Silva Freire 2006).

La radiación puede provenir de una máquina colocada fuera del cuerpo (radioterapia externa), puede colocarse una fuente sellada dentro del cuerpo (braquiterapia) o pueden usarse materiales radiactivos no sellados que viajan por el cuerpo de forma dirigida (radioterapia mediante el uso de radiofármacos).

La radiación puede dañar tanto a las células normales como a las cancerosas que hayan sido expuestas (Baskar et al. 2012). Por lo tanto, el objetivo de cualquier tipo de radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano circundante. Es por esto que el desarrollo de terapias radiantes basadas en la destrucción selectiva de las células tumorales, preservando las células normales, resulta un campo de gran interés.

1.5 La importancia de la radiobiología

La radiobiología es la ciencia que estudia los fenómenos que se producen en los sistemas biológicos tras la absorción de energía procedente de las radiaciones. Los estudios experimentales y teóricos en radiobiología contribuyen al desarrollo de la radioterapia en tres niveles diferentes, desde el más general hasta el más específico (Joiner y van der Kogel 2009):

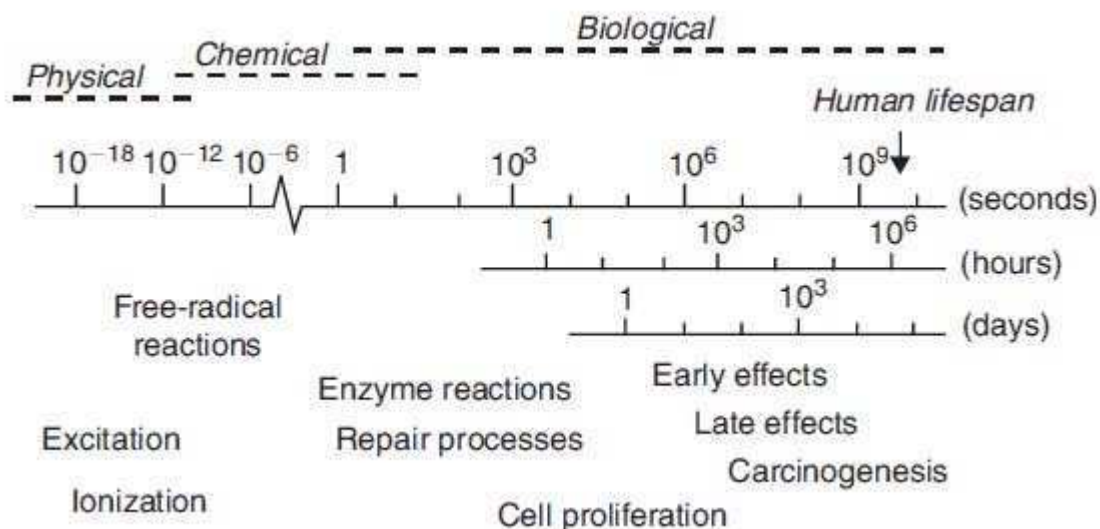
- Promoviendo una base conceptual, identificando los mecanismos y procesos involucrados en la respuesta de los tumores y tejidos normales a la radiación que pueden explicar los fenómenos observados.
- En la elaboración de mejores estrategias de tratamiento y/o desarrollo de nuevos enfoques en radioterapia.
- En la preparación de protocolos, contribuyendo a la elección de esquemas de tratamiento clínico seguros y eficaces.

Así, la radiobiología puede ser muy útil en la generación de nuevas ideas, en la identificación de mecanismos potencialmente aprovechables para la terapia y en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. Sin embargo, la potencial capacidad de un laboratorio de ciencia para guiar a un radioterapeuta en la elección de protocolos específicos, en general tiene las limitaciones inherentes a los modelos teóricos y experimentales, y se requiere siempre contar con ensayos clínicos para la toma de decisiones clínicas (Joiner y van der Kogel 2009). En este sentido, actualmente es importante lograr la articulación de grupos de trabajo interdisciplinarios, donde la radiobiología pueda acercar su conocimiento a la práctica clínica, potenciando esfuerzos en pos de resolver los mismos problemas y superar limitaciones.

1.5.1 Tiempos involucrados en los procesos radiobiológicos

La irradiación de un sistema biológico genera una sucesión de procesos que difieren enormemente en escalas de tiempo. En la Figura 1.6 se ilustran estos procesos, que se pueden dividir en tres fases: física, química y biológica (Joiner y van der Kogel 2009).

Figura 1.6 Escala de tiempo de los efectos de la radiación al exponer un sistema biológico (Joiner y van der Kogel 2009).



La **fase física** consiste en la interacción de la radiación con los átomos que componen el tejido. Por ejemplo, un electrón de alta energía tarda alrededor de 10^{-18} segundos en atravesar la molécula de ADN y aproximadamente 10^{-14} segundos en pasar a través de una célula de mamífero. Cuando esto ocurre, interactúa con los electrones orbitales, pudiendo eyectarlos de sus átomos (ionización), o llevándolos a un estado energético superior dentro del átomo (excitación). Si los electrones secundarios son suficientemente energéticos pueden excitar o ionizar otros átomos cercanos, dando origen a una cascada de eventos de ionización (Joiner y van der Kogel 2009).

La **fase química** describe el período en el cual los átomos y moléculas dañadas reaccionan rápidamente con otros componentes celulares produciendo la rotura de enlaces químicos y la formación de radicales libres. Estos últimos son altamente reactivos y generan una sucesión de reacciones que finalmente conducen a la restauración del equilibrio de cargas. Estas reacciones de los radicales libres se completan aproximadamente 1 milisegundo luego de la exposición a la radiación.

Una característica importante de la fase química es la competencia que ocurre entre las reacciones de barrido, que inactivan los radicales libres, y reacciones de fijación, que llevan a los cambios químicos estables en moléculas biológicamente importantes (Joiner y van der Kogel 2009).

La **fase biológica** incluye todos los procesos posteriores. Estos comienzan con reacciones enzimáticas que actúan sobre las moléculas dañadas. La gran mayoría de las lesiones, por ejemplo en el ADN, son reparadas con éxito. Algunas lesiones no se reparan y son las que finalmente conducen a la muerte celular. Las células no mueren inmediatamente, de hecho después de pequeñas dosis de radiación pueden experimentar una serie de divisiones mitóticas antes de morir. Es la muerte de las células madre y la pérdida posterior de las células de su linaje, lo que da lugar a las primeras manifestaciones de daño de los tejidos normales durante las primeras semanas y meses después de la exposición a la radiación (por ejemplo, la ulceración de la piel o mucosa, la denudación de la mucosa del intestino y el daño hematopoyético). Un efecto secundario de la muerte celular es la proliferación compensatoria de células, que se produce tanto en tejidos normales como en tumores. A mayores tiempos luego de una irradiación de tejidos normales, se manifiestan los llamados “efectos tardíos”, que incluyen fibrosis y telangiectasia de la piel, daño en la médula espinal y daño en los vasos sanguíneos. Incluso a tiempos posteriores otra posible manifestación del daño por radiación es la aparición de segundos tumores (carcinogénesis radioinducida). Por lo tanto, la escala de tiempo de los efectos observables de la radiación ionizante puede extenderse hasta muchos años después de la exposición.

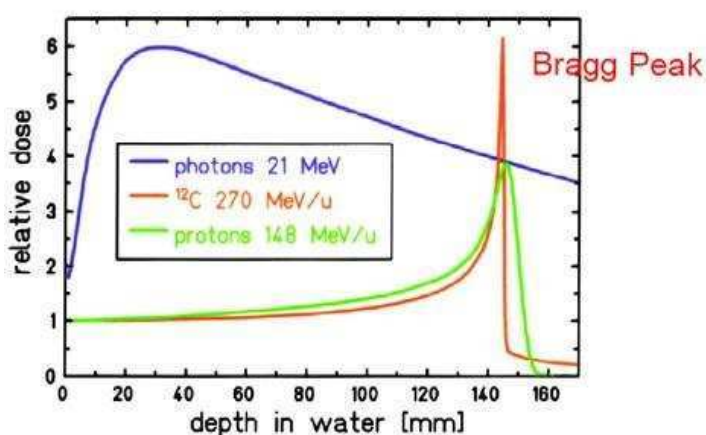
1.5.2 Propiedades de las radiaciones ionizantes al atravesar un sistema biológico

El conocimiento de las propiedades biofísicas de las radiaciones al atravesar un sistema vivo es esencial para tratar de entender los mecanismos de acción del proceso de deposición de energía y producción de un efecto (Fokas et al. 2009). Los haces de fotones se caracterizan por poseer un efecto de “build-up” en los primeros centímetros de tejido, es decir que la dosis aumenta hasta que se establece el llamado “equilibrio electrónico”^a en el punto de mayor dosis, seguido de una disminución exponencial en su deposición de energía con la profundidad (Figura 1.7).

^a El equilibrio electrónico se describe como la situación en la cual la energía cinética de los electrones (u otras partículas cargadas) que entran a un volumen infinitesimal en un material sometido a la acción de las radiaciones, excluyendo la energía de reposo, iguala la energía cinética de los electrones (u otras partículas cargadas) que emergen de dicho volumen.

Por el contrario, en los haces de partículas cargadas de protones o de iones de carbono, la energía depositada a cierta profundidad de penetración es inversamente proporcional a la energía del ion, formando una región de alta dosis al final del recorrido de la partícula conocido como el pico de Bragg (Figura 1.7).

Figura 1.7 Distribución de dosis en profundidad para fotones y curvas monoenergéticas de Bragg para iones de carbono y protones. El pico de Bragg fue medido para partículas α por William Bragg en 1904 y está caracterizado por un incremento estrecho y agudo en la dosis al final del rango de la partícula seguido por una caída abrupta de la dosis a corta distancia del punto final del recorrido (Fokas et al. 2009).



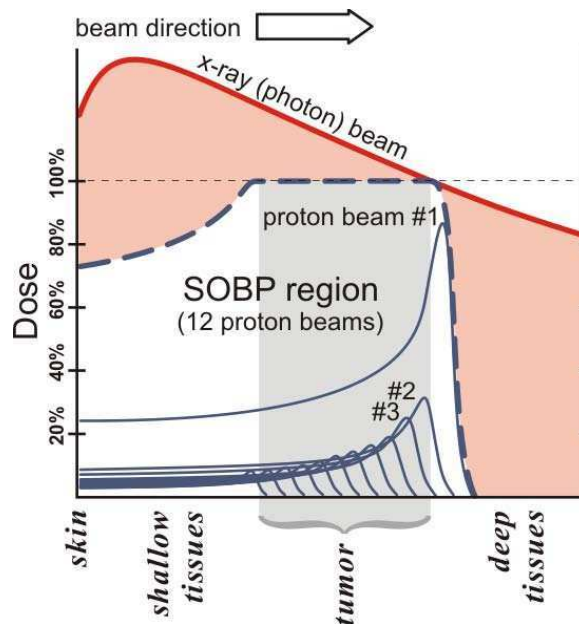
Esta particularidad de los protones, partículas alfa e iones permitiría una localización altamente precisa de la dosis en un protocolo de terapia tumoral (Fokas et al. 2009, Levin et al. 2005). Como se ilustra en la Figura 1.8, esto se logra variando la energía e intensidad de los haces de partículas, sumándose los picos de Bragg generados (Buchsbaum 2013).

En el caso de haces de neutrones la deposición de dosis en un medio dependerá fundamentalmente de las interacciones que ocurran entre los neutrones y los átomos de ese medio (tejido en este caso). La cantidad de interacciones con cada nucleído (elemento de Z protones y N neutrones presente en el medio) queda definida por el número de neutrones que inciden (flujo de neutrones), por el número de átomos de ese nucleído, y por la sección eficaz microscópica (σ) para cada tipo de interacción posible (la σ es un factor experimental asociado con la probabilidad de ocurrencia de determinado tipo de interacción para cada energía del neutrón incidente). En este trabajo se abordarán en detalle solo las reacciones nucleares de mayor interés con neutrones de baja energía (lentos o “térmicos”). Los neutrones

térmicos tienen asociada una sección eficaz de absorción diferente y a menudo mucho mayor para un determinado nucleído que los neutrones epitérmicos o rápidos.

Sin embargo, existen modalidades de terapia con neutrones de diferentes energías a la térmica. En general se basan en la muy buena penetración que tiene un neutrón de energía elevada, la generación de reacciones nucleares que liberan partículas de alta transferencia lineal de energía (LET),^b y en la radiosensibilidad diferencial de ciertos tumores a estas radiaciones. Tal vez la mayor limitación de esta modalidad se encuentra en los efectos adversos que se observan en el tejido circundante normal que se quiere preservar del tratamiento.

Figura 1.8 En un esquema típico de tratamiento, la extensión de picos de Bragg (spread out Bragg peak (SOBP), línea de puntos azul), conforma la distribución terapéutica de radiación. Así, la SOBP es la suma de varios picos de Bragg individuales (líneas azules) a distintas profundidades. En forma comparativa se muestra la distribución de dosis en profundidad de un haz de rayos-x (línea roja). El área en color rosa representa la dosis adicional del esquema de radioterapia con rayos-x, la cual puede afectar a tejidos normales (Buchsbaum JC, 2013; Adaptado de Levin et al. 2005).



^b Transferencia Lineal de Energía (LET), es un término que se utiliza para expresar la cantidad de energía media cedida por unidad de distancia (KeV/μm), que ocurre en la materia cuando ésta es atravesada por la radiación ionizante. Los diferentes tipos de radiación poseen diferente LET. Las radiaciones de bajo LET, por ejemplo rayos X o fotones, producen bajo número de ionizaciones por unidad de recorrido en la materia, mientras que las radiaciones de alto LET, por ejemplo partículas alfa, provocan una alta densidad de ionizaciones al atravesar la materia. La LET también varía con la energía inicial de la radiación ionizante.

1.5.3 Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes

Existe un consenso general de que el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el principal blanco de los efectos biológicos de la radiación ionizante sobre las células, ocasionando la muerte celular o la pérdida de su capacidad reproductiva (Jham y da Silva Freire 2006).

Se producen diferentes tipos de lesiones sobre el ADN: rupturas simple-cadena (RSC), rupturas doble-cadena (RDC), daño en las bases que forman la molécula, uniones cruzadas del ADN con proteínas, y sitios de daño múltiple (SDM). Estas lesiones pueden ser producidas por ionización directa del DNA (**efecto directo**) o por interacción de radicales libres con el ADN, principalmente radicales hidroxilo producidos en las moléculas de agua que difunden unos pocos nanómetros (**efecto indirecto**) (Kassis y Adelstein 2005). Considerando que las células contienen más de un 70% de agua, la mayor parte de la energía depositada en ellas produce radicales libres los cuales se combinan para formar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es el agente oxidante considerado como el mayor responsable del daño inducido en el ADN (Escobar 2007).

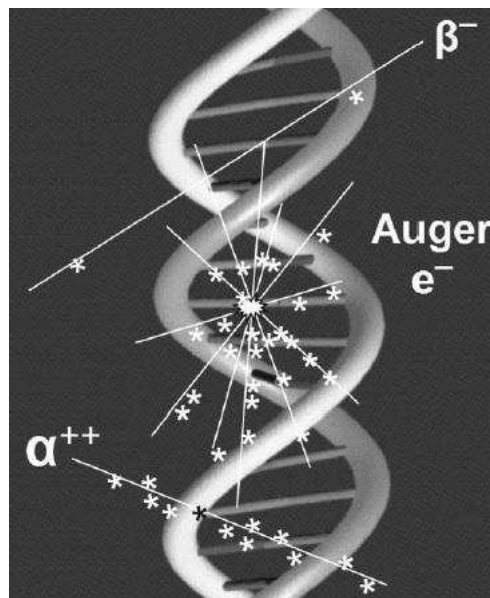
Dado que el ADN se duplica previamente a cada mitosis, aquellas células con alto grado de actividad mitótica son más radiosensibles que aquellas de menor tasa mitótica (Jham y da Silva Freire 2006). Así, tejidos con células en continua proliferación, como por ejemplo aquellas del sistema hematopoyético y epitelio intestinal, se encuentran entre los más sensibles a la radiación (Hashibe et al. 2005). Generalmente, los daños doble cadena sobre el ADN resultan irreparables y responsables de la muerte celular, tanto de células cancerosas como normales. Las principales formas de muerte son la apoptosis y la catástrofe mitótica. También pueden ocurrir necrosis y autofagia, o la célula puede entrar en estado de senescencia. El mecanismo preciso por el cual se induce uno u otro tipo de muerte celular no ha podido ser dilucidado (Baskar et al. 2012). Además del ADN, la radiación también puede afectar y destruir otras bio-moléculas como ARN (ácido ribonucleico) y proteínas. Esto podría explicar por qué también se vería afectada la maquinaria de reparación de daño al ADN (Barth et al. 1990).

La distribución de las ionizaciones dentro del ADN y el tipo de lesiones generadas dependerán de la naturaleza de la partícula incidente y de su energía, en línea con lo que se describió anteriormente sobre las propiedades biofísicas de las

radiaciones ionizantes. Para las partículas α , se producen altas densidades de ionización a lo largo de una trayectoria lineal (Figura 1.9), mientras que para partículas β^- energéticas las ionizaciones a lo largo de la trayectoria lineal son menos frecuentes (Figura 1.9). Los electrones de baja energía (por ejemplo electrones Auger) generan grupos de alta densidad de ionización a lo largo de un camino irregular (Figura 1.9, Kassis y Adelstein 2005).

Las radiaciones sin carga, como los rayos gamma o los neutrones, interactúan con el medio biológico transfiriendo su energía a partículas cargadas del mismo medio, y luego estas partículas cargadas (secundarias) ceden su energía a la materia.

Figura 1.9 Densidad local de ionizaciones (*), producidas a lo largo de una trayectoria (-) de partículas α , electrones Auger y partículas β^- (Kassis y Adelstein 2005).



1.5.3.1 Influencia del oxígeno en la acción biológica de la radiación

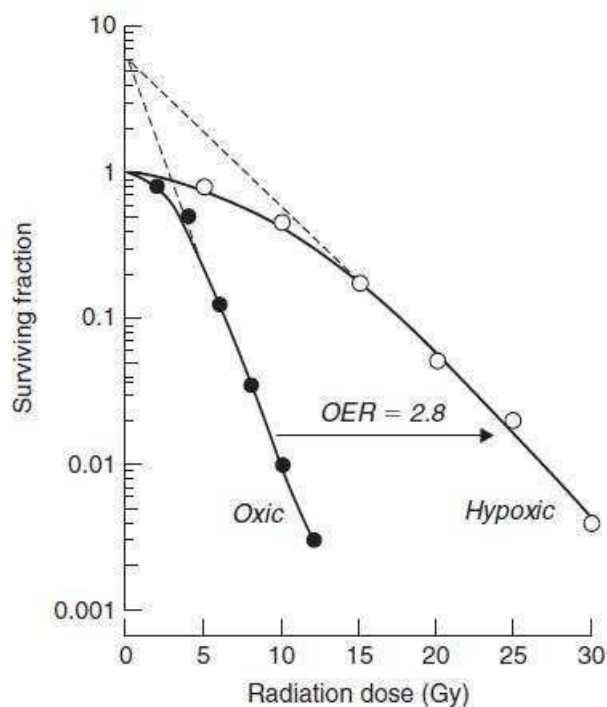
La respuesta de las células a la radiación ionizante es fuertemente dependiente del oxígeno (Gray et al. 1953).

La hipoxia o falta de oxígeno es un factor conocido que afecta a la progresión tumoral, la angiogénesis y la inestabilidad genética. Adicionalmente, se sabe que la hipoxia confiere resistencia a la radiación conllevando al fracaso terapéutico. Dada su relevancia, el efecto de la hipoxia ha sido extensamente estudiado en la radioterapia con fotones. Se ha demostrado que con radiación de bajo LET, las

células tumorales son 2,5 a 3 veces más radiosensibles bajo condiciones de normoxia que de hipoxia (Figura 1.10, Joiner y van del Kogel 2009).

Inmediatamente después de la exposición a la radiación de bajo LET, se produce el daño al ADN que conduce a una proporción pequeña de las células a morir rápidamente. Pero, la mayoría de las que sobreviven, inician una cascada de eventos biológicos mediados por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS; p/ej. anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales libres hidroxilo) (Sonis 2004).

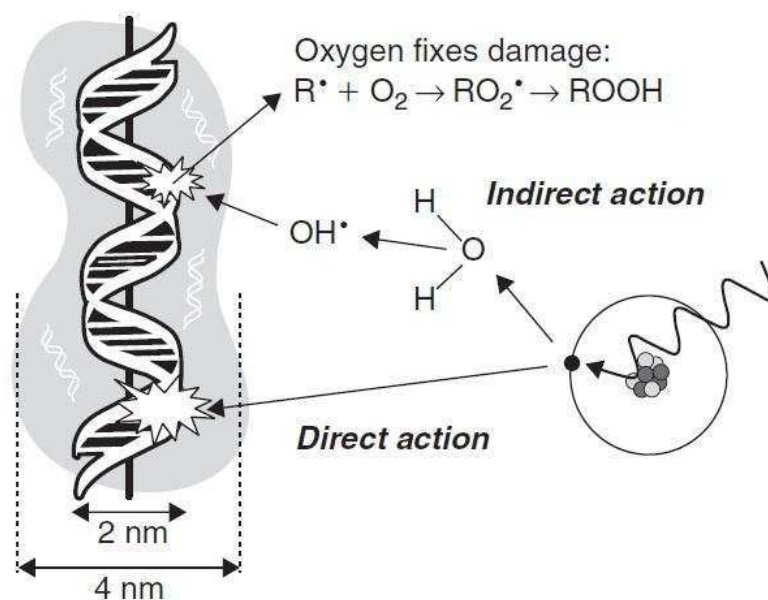
Figura 1.10 Efecto del oxígeno sobre la respuesta a la dosis de radiación. Curvas de sobrevivencia para cultivos de células de mamífero expuestas a rayos X bajo condiciones de hipoxia o en presencia de oxígeno. El OER (efecto potenciador del oxígeno (oxygen enhancement ratio en inglés)), es la relación entre la dosis en condiciones de hipoxia y la dosis con oxígeno necesarias para producir un mismo efecto (Joiner y van der Kogel 2009).



El mecanismo responsable del potenciamiento del daño por radiación a través del oxígeno se conoce como "**hipótesis de fijación por oxígeno**" (Figura 1.11). Cuando la radiación es absorbida en un material biológico, se producen los radicales libres. Los radicales libres son moléculas altamente reactivas y son los que producen rupturas en los enlaces químicos, producen cambios químicos e inician la cadena de eventos que resultan en el daño biológico. Los radicales libres se pueden producir tanto en forma directa sobre la molécula blanco (usualmente el ADN), o

indirectamente en otras moléculas celulares y difundir lo suficiente para alcanzar y dañar otros blancos críticos. La mayoría de los efectos indirectos ocurren por radicales libres producidos en agua (70-80% de la composición de las células en mamíferos), que luego terminan generando radicales en moléculas críticas designadas como R^* en la Figura 1.11. Estas moléculas R^* son inestables y reaccionan rápidamente en presencia de oxígeno produciendo especies RO_2^* , que luego sufren una reacción adicional generando ROOH en la molécula blanco. De esta forma, se llega a un cambio químico estable en la molécula y se dice que el daño se encuentra químicamente "fijado". En ausencia de oxígeno, o en presencia de especies reductoras, las moléculas R^* inestables poseen una vida media más larga y pueden reaccionar con H^+ , recuperando así su forma química original sin la necesidad de la intervención de los mecanismos biológicos de reparación de la célula.

Figura 1.11 La hipótesis de fijación por oxígeno. Los radicales libres se producen en el ADN por acción directa e indirecta de la radiación. Los errores o daños en la molécula pueden ser reparados en condiciones de hipoxia pero se fijan en presencia de oxígeno (Joiner y van der Kogel 2009).



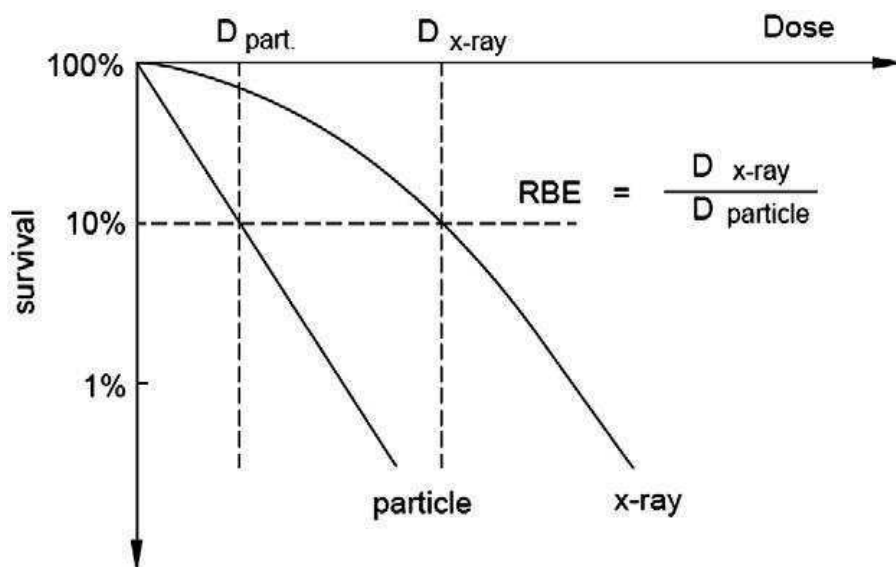
Sin embargo, la radiación de alto LET induce un daño al ADN densamente localizado, que es menos dependiente de la formación de ROS para producir la muerte celular. La evidencia de que la radiación de alto LET es menos dependiente del estado de oxigenación ha sido derivada de la experiencia *in vitro* e *in vivo* a nivel

pre-clínico, e incluso de estudios de tratamiento a nivel clínico con pacientes (Fokas et al. 2009).

1.5.3.2 Eficacia Biológica Relativa

Una aproximación muy extendida para tratar de comparar la respuesta a diferentes tipos de radiación se basa en el concepto de la eficacia biológica relativa. La **eficacia biológica relativa** (relative biological effectiveness, **RBE**), se define como la relación entre la dosis requerida para producir un efecto biológico determinado con una radiación de referencia de fotones (rayos-X o gamma), y la dosis absorbida para producir el mismo efecto con la radiación que se quiere evaluar (Hopewell et al. 2012). La respuesta biológica puede ser evaluada en un sistema *in vitro* o *in vivo* (Figura 1.12). Luego, los factores RBE obtenidos, pueden servir para tratar de convertir las dosis absorbidas con dichos tratamientos radiantes a dosis equivalentes a fotones, en un intento de comparar diferentes protocolos de terapia radiante. Sin embargo, este tipo de método de comparación se ve limitado al sistema biológico y el nivel de respuesta definido para obtener un determinado factor RBE, y no se debería utilizar de forma general ya que puede llevar a inconsistencias al considerar dosis equivalentes incorrectas (González y Santa Cruz 2012).

Figura 1.12 Definición de eficacia biológica relativa (RBE), ilustrada para curvas de supervivencia celular (Fokas et al. 2009). En el ejemplo se define el RBE considerando como nivel de respuesta (end-point) una supervivencia celular del 10%. Nótese que si se considera otro end-point en la curva el valor de RBE obtenido será diferente.

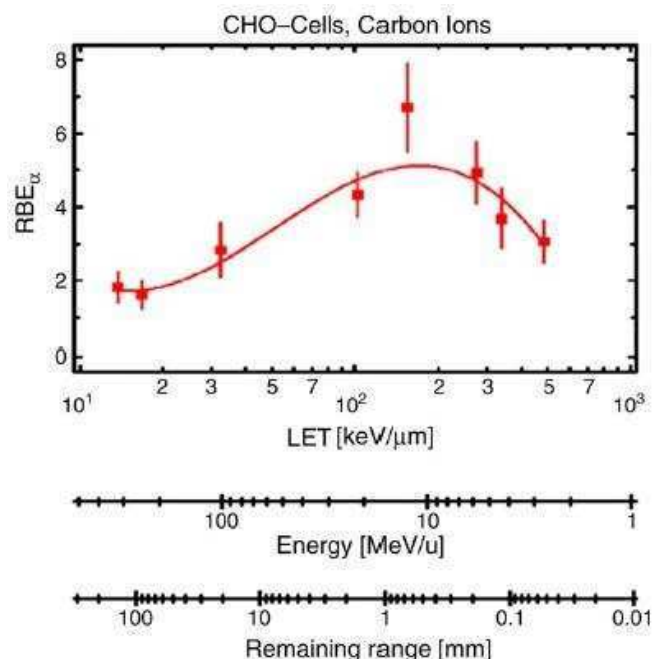


En el rango de energía de los rayos X utilizados con fines terapéuticos, típicamente entre 100 kV y 25 MV, es necesaria aproximadamente la misma dosis física a diferentes energías, para alcanzar una determinada respuesta biológica, resultando entonces en similares RBEs.

Como la severidad del daño al ADN depende de la proximidad de las lesiones sobre la molécula, la respuesta biológica dependerá de la densidad de ionizaciones locales que puede producir la radiación sobre el medio biológico que atraviesa. Las radiaciones de alto LET (partículas alfa, iones) producen un daño biológico que generalmente es mucho mayor por unidad de dosis que los rayos X, resultando en un elevado RBE. De esta forma, se requiere una dosis menor para obtener un efecto equivalente (IAEA-TECDOC-1223 2001).

Si tomamos como ejemplo la irradiación con iones de carbono, el RBE resulta máximo a un LET de aproximadamente 200 keV/μm (Figura 1.13), y la localización de este valor máximo de LET es fuertemente dependiente del número atómico. El RBE máximo es desplazado a 100 keV/μm para partículas alfa/helio y a 25 keV/μm para protones. Adicionalmente, se han notado efectos de saturación a mayores LET (menor energía de los iones), ya que llegado a un punto se produce un daño local mayor al necesario para matar a la célula (Fokas et al. 2009).

Figura 1.13 RBE vs LET para la línea celular CHO irradiada con iones de carbono. El RBE es máximo a un valor de LET cercano a 200 keV/μm. Notar el efecto de saturación a altos valores de LET (menor energía de los iones) (Fokas et al. 2009).



La Terapia con Neutrones Rápidos (FNT, Fast Neutron Therapy) y, como veremos a continuación, la **Terapia por Captura Neutrónica en Boro** (**Boron Neutron Capture Therapy, (BNCT)**), utilizan el efecto de partículas secundarias que poseen una transferencia lineal de energía (LET) 5 a 50 veces superior a la radiación de aceleradores de electrones o protones utilizados en hospitales (Wagner et al. 2011). La alta densidad de ionizaciones que se produce cuando se irradia con este tipo de partículas, permitiría una localización de la dosis más precisa sin incrementar los efectos adversos en tejido normal, por lo que resultan altamente atractivas para el tratamiento de tumores radioresistentes y/o anatómicamente complejos.

1.6 Terapias binarias: en busca de un tratamiento selectivo

La naturaleza de la interacción de la radiación con las células es un **proceso aleatorio**, es decir, se asocia a una función de probabilidad y tiene lugar al azar. Un fotón o partícula puede alcanzar a una célula o a otra, dañarla o no, y si la daña, no muestra predilección por ninguna parte de la célula o bio-molécula, es decir, **la interacción per se no es selectiva**. La deposición de energía en la célula se produce en un tiempo muy corto, aunque el efecto no es inmediato y la aparición del mismo dependerá principalmente del tipo de tejido, de la dosis y del tiempo de exposición.

Como se mencionó más arriba, el objetivo de cualquier tipo de radioterapia es destruir el mayor número posible de células cancerosas, evitando el daño que sufre el tejido sano circundante. Entonces, resulta de interés el desarrollo de nuevas terapias que logren un **control tumoral específico**, basadas en la **destrucción selectiva** de las células tumorales preservando las células normales. En línea con esta idea, desde hace décadas se encuentran en desarrollo diversas **terapias**, en particular aquellas que son denominadas "**binarias**", definidas por el hecho que el resultado terapéutico se obtiene al combinar dos componentes que, por separado, no causan daño significativo. Existen diversos sistemas binarios: terapia de activación por fotones (Orecchia et al. 2009), terapia fotodinámica (Agostinis et al., 2011), terapia génica (Pulkkanen y Yla-Herttuala, 2005) y **Terapia por Captura**

Neutrónica en Boro (BNCT). A continuación, se abordan los detalles de la técnica de **BNCT**, tema principal de este trabajo de tesis.

1.7 La Terapia por Captura Neutrónica en Boro

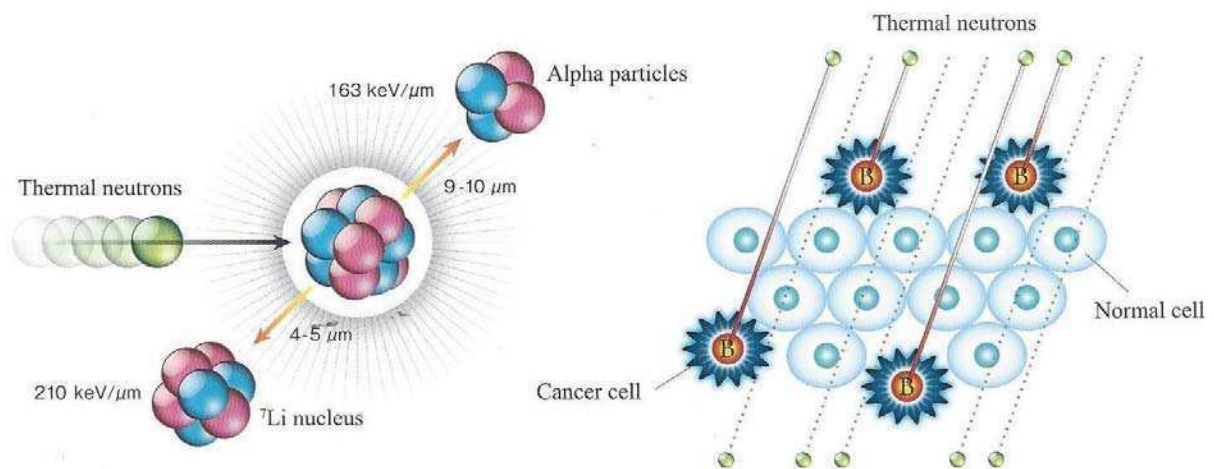
La **Terapia por Captura Neutrónica en Boro (Boron Neutron Capture Therapy, (BNCT))** es una aplicación de la tecnología nuclear al área biomédica, diseñada para entregar selectivamente radiación de partículas pesadas cargadas de alto LET en los tumores tratados.

La técnica se basa en la elevada sección eficaz (σ)^c de captura de neutrones térmicos que posee el isótopo natural ^{10}B . Este núcleo interactúa con neutrones lentos o “térmicos” (energía $<0,4$ eV) desencadenando una reacción de captura que da lugar a la formación de un núcleo compuesto de ^{11}B , que inmediatamente se desintegra en una partícula alfa de 1,47 MeV y un núcleo de ^7Li de 0,84 MeV. Estas partículas cargadas, que se liberan en la misma dirección y sentidos opuestos, poseen un alcance combinado en tejido de 12-13 micrómetros (comparable con las dimensiones de una célula) Figura 1.14.

La estrategia terapéutica de BNCT consiste en administrar compuestos borados que sean incorporados selectivamente a las células tumorales, tal que el contenido de boro en las células normales y en la sangre sea menor que en el tumor. De esta manera, al irradiar posteriormente con neutrones, las reacciones de captura que ocurren entre los neutrones térmicos y los átomos de ^{10}B se producirán mayormente en las células tumorales. Esta modalidad terapéutica permitiría dañar los tejidos tumorales sin producir daño significativo al tejido normal. Más aún, permitiría dañar selectivamente las células tumorales infiltrantes en el tejido sano y micro-metástasis no identificables por estudios de imágenes, un desafío en las terapias oncológicas actuales.

^c Físicamente, la sección eficaz microscópica (σ) expresa el área plana aparente, en términos de probabilidad, que ofrece cada nucleído para una interacción específica. La σ es un parámetro universal, en el sentido de que depende solo de la energía, el tipo de partícula incidente y el mecanismo de interacción considerado. Sus dimensiones son de área (cm^2). Debido a su orden de magnitud, el área efectiva de los núcleos se mide en barns, siendo $1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$ (Koerting Wiese y Queral Salazar, 2012).

Figura 1.14 Cuatro años después del descubrimiento del neutrón por Chadwick (1932), el físico G.L. Locher propuso por primera vez la idea de utilizar la reacción neutrónica de captura del ^{10}B , en la cual se emite un núcleo de ^4He (partícula alfa) y un núcleo de ^7Li , para destruir células cancerosas (Locher 1936). El rango de estas partículas emitidas es extremadamente corto y no excede el diámetro de una célula típica. Basado en este hecho, si se utiliza un compuesto borado (^{10}B) que se acumule en concentraciones suficientes y con un alto nivel de selectividad en las células cancerosas, al irradiar la región tumoral con neutrones térmicos, se dañaría selectivamente las células tumorales con escaso daño al tejido normal. Adaptado de una publicación de la Sociedad para la Promoción e Investigación en BNCT de Japón.



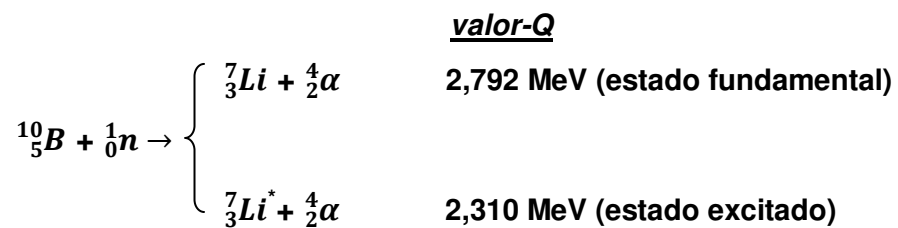
El concepto terapéutico de **NCT** (**N**eutron **C**apture **T**herapy) se basa en la observación de que ciertos nucleídos -radioactivos y no radioactivos- poseen una capacidad inusual de absorber neutrones térmicos (Locher, 1936). Existen varios nucleídos, como por ejemplo el ^6Li , ^{10}B , ^{157}Gd , ^{235}U , que poseen alta capacidad de absorber neutrones térmicos, es decir, tienen una alta sección eficaz de captura. En la mayoría de los casos, esta capacidad es de al menos dos órdenes de magnitud mayor que la de los componentes elementales normales de los tejidos, permitiendo una captura preferencial por dichos átomos (Barth et al., 1990). Además de esta característica, existen otras variables que se consideran cuando se selecciona un nucleído para su uso en NCT: su toxicidad, los productos de la reacción de captura y las propiedades de los compuestos potencialmente portadores de dicho nucleído.

De los nucleídos que tienen alta σ , el ^{10}B es el más atractivo por las siguientes razones:

- a) No es radiactivo y está fácilmente disponible (el boro tiene dos isótopos naturales estables, el ^{10}B y el ^{11}B con una abundancia de aproximadamente 19% y 81% respectivamente).
- b) Las partículas emitidas por la reacción de captura [$^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$] son de alto LET.
- c) El alcance de las partículas liberadas es de aproximadamente el diámetro de una célula, teóricamente limitando el efecto de radiación a aquellas células que incorporaron suficiente cantidad de ^{10}B .
- d) Puede ser incorporado en una gran cantidad de estructuras químicas diferentes, 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.

1.7.1 La reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$

La reacción de BNCT transcurre como se describe a continuación (Knoll 1989):



dando lugar a dos posibles productos, el ion ^7Li puede quedar en su estado fundamental (6%) o en su estado excitado (94%) que rápidamente ($T_{1/2} \approx 10^{-13}$ s) pasa al estado fundamental emitiendo un rayo gamma de 0,48 MeV (a lo largo de este trabajo no se considera el aporte a la dosis total, de este fotón inducido). En ambos casos, el valor-Q de la reacción es muy grande (2,310 o 2,792 MeV) comparado con la energía del neutrón incidente, por lo tanto, la energía impartida a los productos de la reacción (^7Li y α) es esencialmente el propio valor-Q. De esta forma, la energía cinética del neutrón incidente es despreciable frente a la energía del producto de la reacción. A su vez, el momento lineal del neutrón es

prácticamente despreciable con lo cual los productos de la reacción deberán tener también un momento prácticamente nulo, explicando la emisión de las partículas en una misma dirección con sentido opuesto. La energía siempre se distribuye de la misma forma (Knoll 1989). Las energías individuales de la partícula α y el núcleo de Li se calculan simplemente por conservación de la energía y el momento como se muestra a continuación para el caso de la reacción más probable donde se emite el núcleo de Li-7 en estado excitado:

$$E_{Li} + E_{\alpha} = Q = 2,31 \text{ MeV}$$

$$m_{Li}v_{Li} = m_{\alpha}v_{\alpha}$$

$$\sqrt{2 m_{Li}E_{Li}} = \sqrt{2 m_{\alpha}E_{\alpha}}$$

Resolviendo las ecuaciones simultáneamente:

$$E_{Li} = 0,84 \text{ MeV}$$

$$E_{\alpha} = 1,47 \text{ MeV}$$

Para que el BNCT sea exitoso, es decir, destruya las células tumorales y dañe lo menos posible a las células normales contiguas, se deben localizar un gran número de átomos de ^{10}B (aproximadamente 20 g ^{10}B /gr de tejido ó 20 ppm ^{10}B) preferencialmente en las células neoplásicas y un número suficiente de neutrones térmicos deben ser absorbidos por los átomos de ^{10}B para desencadenar la reacción $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ (Barth et al. 2012).

1.7.2 Los compuestos borados

Conceptualmente, BNCT es una modalidad de radioterapia dirigida bioquímicamente más que geoméricamente (Barth et al. 2012). Maximizar y/o mejorar la entrega de boro al tumor es la forma más eficaz para optimizar BNCT. En contraste, el aumento de la exposición a neutrones, si bien conlleva a un incremento del número de reacciones de interés, también implica un aumento de la dosis de fondo no específica, sin producir una ganancia neta en la relación terapéutica (Schwint y Trivillin 2014)^d. En este sentido, si se consideran moléculas portadoras de ^{10}B adecuadas, BNCT podría combinar los beneficios de las terapias dirigidas modernas (por ejemplo, selectividad mediante el uso de compuestos de tercera generación), con el efecto del tratamiento con radiación de alto LET.

^d La dosimetría del BNCT y la descripción de las diferentes componentes de dosis asociadas, se abordan más adelante en este mismo trabajo.

Las investigaciones en el área del desarrollo de compuestos conteniendo boro que sirvan como portadores para BNCT, comenzaron hace aproximadamente 50 años con la investigación de un gran número de compuestos borados de bajo peso molecular, de donde emergió la primera generación de compuestos (Barth et al. 2012).

Un portador de boro ideal debería ser: no tóxico a niveles de dosis terapéuticas, acumularse selectivamente en células tumorales, distribuirse de forma homogénea y entregar el ^{10}B al tumor de manera eficiente (Schwint y Trivillin 2014). La acumulación preferencial de boro en tumor contribuye a la ventaja terapéutica del BNCT en tumor frente al tejido normal. La importancia de la distribución homogénea de boro en el tumor reside en el hecho de que las células tumorales cargadas pobremente de boro, serán menos sensibles o totalmente refractarias al tratamiento y darán lugar al fracaso terapéutico. El contenido de boro absoluto en el tejido tumoral debe ser lo suficientemente alto (10^9 átomos de ^{10}B / célula) para que ocurran suficientes reacciones de captura de $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$, y lograr que el efecto sea letal. Incluso, una alta concentración absoluta de ^{10}B en tumor maximiza la componente de dosis de radiación específica en el tumor y permite tiempos de irradiación más cortos, con la reducción concomitante en la dosis de fondo que afecta a tumor y el tejido sano por igual. Un portador de boro ideal también se debería eliminar rápidamente de la sangre y los tejidos normales, pero retenerse en el tumor el tiempo suficiente para permitir la irradiación con neutrones. Finalmente, la micro-distribución de un compuesto ideal lograría ubicar los átomos de ^{10}B cerca de un objetivo terapéuticamente útil, tal como el ADN. Los cortos alcances de las partículas alfa y litio, hacen que la micro-distribución del portador de boro con respecto al objetivo sub-celular, sea crítica en cuanto al efecto radiobiológico (Schwint y Trivillin 2014).

Un compuesto de boro ideal, que cumpla con todos los requisitos enumerados arriba, es muy difícil de desarrollar.

Desde el punto de vista práctico, los requerimientos mínimos más importantes que típicamente hoy día se consideran para un agente portador de ^{10}B para BNCT son (Barth 2012):

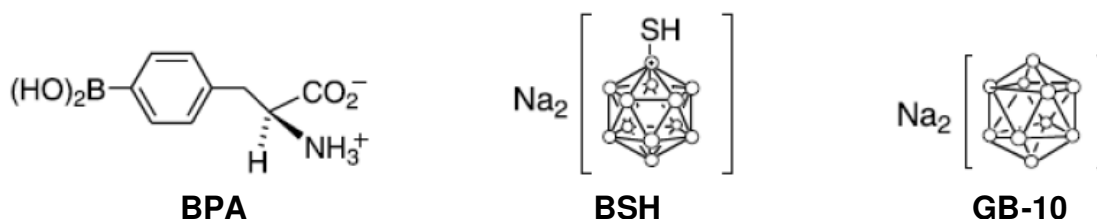
- a) baja toxicidad y escasa incorporación en tejido normal, con una relación de concentración tumor/tejido normal y tumor/sangre de aproximadamente 2-3;

- b) concentración de boro mínima de $\sim 20 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$ en tumor;
- c) una eliminación relativamente rápida de sangre y tejidos normales, y la persistencia en tumor durante la irradiación con neutrones.

Hasta el presente, solo tres compuestos han sido aprobados para su uso en pacientes: borofenilalanina (**BPA**), decahidrodecaborato de sodio (**GB-10**) y mercaptoundecahidro-closo-dodecaborato, comúnmente conocido como borocaptato de sodio (**BSH**) (Figura 1.15). De estos tres, solo el BSH y el BPA son actualmente utilizados en estudios clínicos de BNCT.

Ninguno de estos agentes cumple adecuadamente con todos los criterios expuestos anteriormente, y el principal motivo de que solo sean éstos los compuestos que se utilizan a nivel clínico es que son los únicos que se encuentran aprobados para su uso en humanos.

Figura 1.15 Fórmulas químicas de los compuestos borados aprobados para su uso en BNCT en humanos (BPA, BSH y GB-10) (Barth RF et al. 2005).



Por esta razón, la comunidad internacional continúa realizando estudios para desarrollar nuevos compuestos borados, basados en diferentes estrategias que permitan incorporar mayores cantidades de boro en las células malignas a tratar.

Ejemplos de los diversos estudios a nivel experimental orientados a la síntesis y utilización de nuevos compuestos borados incluyen: estudios de anticuerpos monoclonales borados anti-EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Barth 2009); estudios de biodistribución de liposomas borados en el modelo de cáncer bucal de la mejilla del hámster (Heber et al. 2012, 2014); síntesis de pirazolopirimidinas enriquecidas en boro (Crossley et al. 2011); estudio de aminoácidos borados cíclicos no naturales en un modelo en ratón de melanoma humano (Kabalka et al. 2011); evaluación de porfirinas boradas en células de glioma de rata (Hiramatsu et al. 2011); síntesis de poliaminas basadas en ϵ -poli-lisinas conjugadas con “clusters” de boro (Umano et al. 2011); síntesis de conjugados de compuestos borados

poliédricos con diferentes moléculas “buscadoras” de tumores como nucleósidos, carbohidratos, aminoácidos, lípidos y porfirinas (Bregadze et al. 2011), entre otros.

1.7.2.1 Optimización de protocolos empleando compuestos borados aprobados para el uso en humanos

Aunque los compuestos aprobados para el uso clínico en BNCT, administrados como agentes únicos en la forma tradicional (como una sola inyección intravenosa antes de la irradiación con neutrones), han demostrado potencial terapéutico para diferentes patologías (por ejemplo, Barth et al., 2012; Kankaanranta et al., 2012; Matsumura et al. 2009, Suzuki et al. 2014, Trivillin et al. 2006, Zonta et al. 2006), es indudable que hay margen de mejora (Schwint y Trivillin 2014).

Actualmente ningún otro compuesto borado ha llegado ni siquiera a la etapa de evaluación en un estudio de biodistribución clínico (es decir, la evaluación de la distribución del compuesto en humanos, sin la aplicación del tratamiento). Cuando un nuevo portador de ^{10}B se identifica como prometedor en estudios de cultivo celular, aún enfrenta muchos obstáculos, empezando por los estudios de biodistribución en modelos animales de tumores apropiados y la evaluación *in vivo* de toxicidad. Luego, la traslación de datos experimentales a estudios de biodistribución clínicos es muy costoso, sin ningún beneficio directo para los participantes de dicho estudio (ya que no recibirán tratamiento), y debe cumplir con los estrictos requisitos de las agencias reguladoras (Schwint y Trivillin 2014).

La optimización de la biodistribución de los compuestos borados actualmente autorizados para su uso en el hombre es una excelente estrategia a corto y medio plazo, con un menor costo para su implementación. Esto puede ayudar a reducir la brecha entre la investigación y la aplicación clínica, a la vez que se adquiere conocimiento que puede ser aplicable si a futuro, se aprueban nuevos portadores de boro más eficaces. En este sentido, se han planteado diferentes estrategias para optimizar la llegada del boro al tumor utilizando los compuestos transportadores de boro aprobados para su uso en humanos (Schwint y Trivillin 2014).

En ciertos casos, la administración combinada de compuestos borados con diferentes propiedades y mecanismos de incorporación (como por ejemplo las combinaciones (BPA + GB-10) o (BPA + BSH)), pueden llegar a contribuir a una entrega más homogénea de boro al tumor y ayudar a superar la potencial toxicidad

debido a mayores dosis de cada compuesto al administrarlos por separado (Schwint y Trivillin 2014).

La aplicación secuencial de protocolos de BNCT utilizando los diferentes compuestos borados con un intervalo de 24 ó 48 horas entre aplicaciones también ha sido estudiado como estrategia potencialmente útil (Molinari et al. 2011). El BNCT secuencial plantea el uso de más de un compuesto borado, pudiendo modular cada aplicación de acuerdo a los requerimientos de administración de cada compuesto. La ventaja de esta estrategia (además de las ventajas enunciadas previamente de emplear más de un compuesto borado) radica en poder atacar, con la segunda aplicación de BNCT, células que podrían haber sido refractarias a la primera aplicación (Schwint y Trivillin 2014).

Otra estrategia eficaz para mejorar la incorporación de los portadores de boro al tumor y aumentar la eficacia terapéutica consiste en modificar el sistema vascular de entrega defectuoso en los tumores. La estructura y función anormal de los vasos sanguíneos del tumor compromete el flujo de sangre y obstaculiza el transporte efectivo de fluido, lo que resulta en la distribución ineficiente de agentes terapéuticos transportados por la sangre. La normalización transitoria de los vasos sanguíneos busca distribuir más eficazmente los fármacos a una mayor proporción de células tumorales en lugar de incrementar la incorporación total del medicamento (Jain 2005). La normalización reversible de los vasos sanguíneos tumorales aberrantes, junto con la administración del compuesto de boro (BPA) en la "ventana de normalización", ha demostrado a nivel experimental que mejora la distribución del compuesto borado en los tumores (Molinari et al. 2012).

Además de las estrategias descritas anteriormente, se han investigado otros enfoques para mejorar la captación y distribución de los compuestos borados en el tumor. Algunos ejemplos incluyen la electroporación y sonoporación (Yamatomo et al. 2013; Garabalino et al. 2014), pre-carga con análogos estructurales (Capuaniet al. 2008) y la hipertermia a temperatura moderada para aumentar el flujo sanguíneo del tumor (Masunaga et al., 2014).

A continuación se resumen las características más importantes particulares de cada uno de los tres compuestos borados aprobados para el uso en humanos.

1.7.2.2 BPA (borofenilalanina)

El BPA ($^{10}\text{BC}_9\text{H}_{12}\text{NO}_4$) es un derivado del aminoácido fenilalanina, sintetizado a fines de 1950 (Snyder et al., 1958). Es el compuesto borado más estudiado, dada su capacidad de llevar cantidades absolutas significativas de ^{10}B al tumor con una buena relación tumor/tejido normal y tumor/sangre. Estudios toxicológicos no demostraron signos de toxicidad sistémica en ratones, hamsters, ratas y conejos (Taniyama et al. 1989, Coderre et al. 1987, Kreimann et al. 2001a, Kulvik et al. 2003). Fundamentalmente, no se observó toxicidad asociada a la administración de BPA en humanos (Lieberman et al. 2004, Wittig et al. 2008).

Este compuesto fue propuesto inicialmente para el tratamiento de melanomas dado que es un análogo de la tirosina, sustrato para la síntesis de melanina en las células normales, la cual se ve considerablemente aumentada en células tumorales (Mishima et al. 1989). Posteriormente, el BPA se utilizó como portador de boro para el tratamiento del glioblastoma multiforme (Kageji et al. 2011), cáncer de cabeza, de cuello (Kankaanranta et al. 2012) y metástasis colorectales en hígado (Zonta et al. 2006). Nuevos estudios de biodistribución en hígado con metástasis colorrectales siguen apoyando la utilización del BPA como compuesto borado para futuros ensayos clínicos (Cardoso et al. 2009). En cuanto a ensayos pre-clínicos, nuestro grupo demostró el potencial terapéutico del BPA en tumores de cabeza y cuello, en un ensayo pre-clínico en felinos domésticos (Rao et al. 2004).

A su vez, se siguen realizando diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* para estudiar y aumentar la entrada del BPA en las células tumorales (Wittig et al. 2000; Capuani et al. 2008) y analizar su potencial utilización en otros tipos de tumores no ensayados sistemáticamente a nivel clínico: osteosarcoma (Ferrari et al. 2009), tiroides (Perona et al. 2011), sarcoma de células claras (Fujimoto et al. 2011), próstata (Yasui et al. 2012) y pulmón (Bortolussi et al. 2011a, Trivillin et al. 2014). Nuestro grupo ensayó su potencial en metástasis de colon en hígado (Garabalino et al. 2011) y evaluó diversos protocolos de BNCT y su radiotoxicidad asociada en tumores de la cavidad bucal en hámster (por ejemplo, Kreimann et al. 2001b, Trivillin et al. 2006; Molinari et al. 2011, 2012).

En cuanto a la acumulación selectiva del BPA en células tumorales, podría estar asociada al sistema L de transportadores heterodiméricos, sodio-independientes, localizados a nivel de la membrana plasmática; en particular LAT-1

(sistema de transporte de aminoácidos L). Este transportador ha sido asociado con el crecimiento, proliferación y desarrollo de los tejidos y se encuentra altamente expresado en tumores malignos y líneas celulares tumorales (Detta y Cruickshank 2009). Por lo tanto, la incorporación preferencial del BPA a las células tumorales se debería a una mayor necesidad o requerimiento de aminoácidos por su mayor actividad metabólica (Coderre y Morris 1999).

En el caso de compuestos como el BPA, es importante recalcar que existe una marcada heterogeneidad relacionada con la captación de boro por las células malignas, principalmente debido a diferencias en su actividad metabólica, grado de proliferación, diferenciación y nivel de oxigenación (Coderre et al. 1998, Ono et al. 1996, Yoshida et al. 2002). Además, también existe una gran variabilidad en la vascularización de los tumores y en la proporción de necrosis espontánea de los mismos. Es por ello que ambas variables, heterogeneidad celular y vascular, relacionadas a la biodistribución del compuesto borado, pueden llevar a una variabilidad de respuesta de los tumores al tratamiento.

Respecto de su micro-localización, el BPA 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 et al. 1992, Bennet et al. 1994, Chandra et al. 1997) e *in vivo*, en tejidos de ratas inyectadas con BPA (Smith et al. 1996, Smith et al. 1997).

Actualmente, se encuentran en estudio, diferentes procedimientos orientados a potenciar la incorporación de BPA en las células malignas. Tal es el caso de la “precarga” con moléculas estructuralmente análogas al BPA como el L-DOPA y L-tirosina. Por ejemplo, el grupo de Capuani (2008) demostró que la precarga con L-DOPA indujo un aumento masivo de la concentración de BPA en células C6 de glioma *in vitro*. *In vivo*, el pre-tratamiento con L-DOPA condujo a una acumulación significativa de BPA en tejido tumoral, pero no en tejido normal ni en sangre. En cuanto a la “precarga” con L-tirosina, se demostró un aumento de la concentración de BPA en células de melanoma de ratón (Papasprou et al. 1994) así como también en células tumorales hepáticas y de colon (Iffland et al. 2011).

1.7.2.3 BSH (sodio mercaptoundecahidro-closo-dodecaborato)

El **BSH** ($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) inicialmente se asoció al tratamiento del glioblastoma multiforme. Se demostró su baja toxicidad en pacientes con glioblastoma multiforme (Haritz et al. 1994, Hideghéty et al. 2003) y su efectividad cuando se emplea como portador de boro en BNCT (Kageji et al. 2011).

Se postulaba como compuesto difusivo, justificando su selectividad en glioblastoma multiforme con la existencia de una barrera hematoencefálica (BHE) defectuosa en la zona tumoral y el hecho que el BSH no atraviesa la BHE intacta. Sin embargo, Wittig et al. (2011) demostraron que no solo se acumula en bajas concentraciones en cerebro sino también en tejido adiposo, hueso y músculo. A su vez, presenta altas concentraciones en hígado y riñón.

Esta acumulación diferencial en diferentes órganos indicaría un metabolismo mucho más complejo.

Además de utilizarse para el tratamiento de glioblastoma multiforme, se intentó ampliar su uso en la clínica a tumores de cabeza y cuello, combinado con la administración de BPA (Kato et al. 2004). A su vez, se realizaron diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* para estudiar su potencial utilización en otros tipos de tumores como melanoma (Masunaga et al. 2012); mejorar su selectividad para el tratamiento con BNCT del carcinoma hepatocelular (Yanagie et al. 2011), tumores múltiples en hígado (Fujii et al. 2011), y células de glioma (Feng et al. 2009).

1.7.2.4 GB-10 (decahidrodecaborato de sodio)

El **GB-10** ($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) es un compuesto borado difusivo, que en solución acuosa forma el anión $(\text{B}_{10}\text{H}_{10})^{2-}$ (Laramore et al. 2001).

Analogamente al BSH, el GB-10 fue propuesto para el tratamiento de tumores de cerebro ya que no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) intacta. La incorporación preferencial a tumor se debería a que los tumores de cerebro están rodeados de una BHE defectuosa que permite la incorporación de GB-10 (Heber et al. 2004).

Se utilizó por primera vez en estudios *in vivo* en perros con cáncer de células no pequeñas de pulmón, tratados con BNCT/FNT (BNCT enhanced Fast Neutron Therapy ó terapia por neutrones rápidos potenciada por BNCT), obteniéndose

resultados alentadores en términos terapéuticos, sin toxicidad originada por el compuesto (Stelzer et al. 2001). Posteriormente, se demostró que el compuesto no era tóxico en estudios de biodistribución en 15 pacientes voluntarios con glioblastoma multiforme y cáncer de células no pequeñas de pulmón (Diaz et al. 2002).

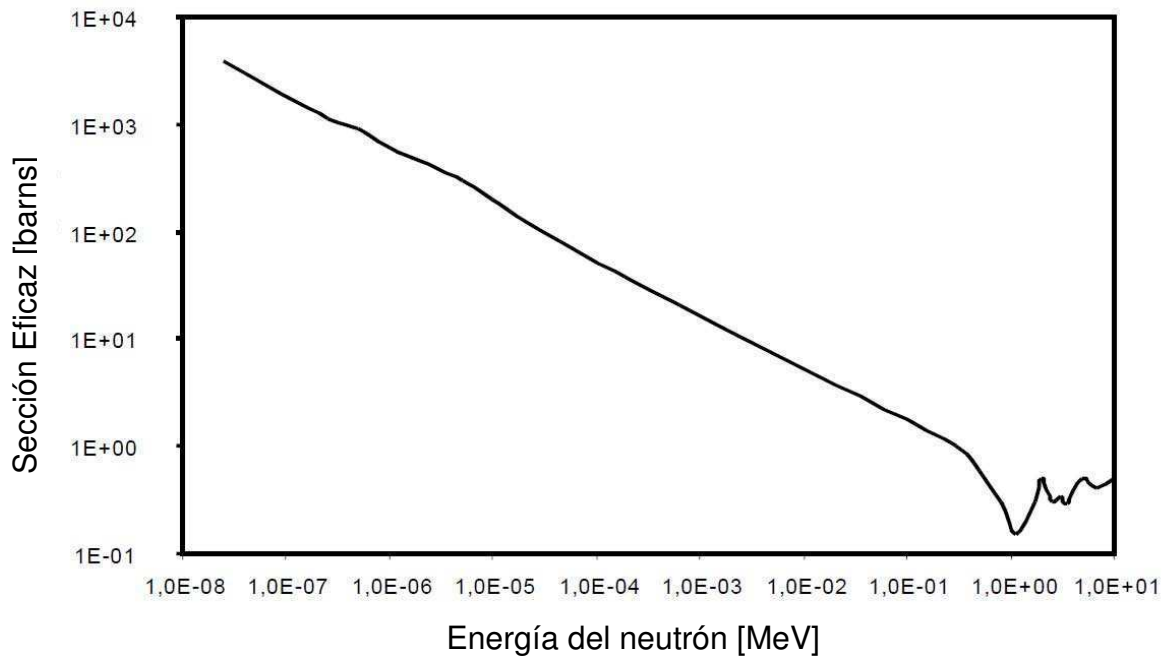
Nuestro grupo realizó diversos estudios de toxicidad y biodistribución con GB-10 y demostró su ausencia de toxicidad y su potencial terapéutico en tumores de la mucosa bucal en hamsters (por ejemplo, Heber et al. 2004, 2006, Trivillin et al. 2004a, 2006). En cuanto a su biodistribución, demostramos que se acumula de forma homogénea en diferentes áreas del tumor. Esto sería una ventaja en cuanto a la posibilidad de evitar focos refractarios a la terapia. Sin embargo, no se verificó la incorporación selectiva a tumor versus tejido normal y sangre. Estos hallazgos estarían correlacionados con su propiedad difusiva (Heber et al. 2004). En cuanto al éxito terapéutico, este resultado propuso un nuevo paradigma para BNCT ya que clásicamente se describe que el compuesto borado debe acumularse selectivamente en las células tumorales para que el BNCT sea terapéuticamente efectivo, causando daño a tumor pero preservando el tejido normal. A nivel histológico, se observó que el control tumoral selectivo por el BNCT mediado por GB-10 se debería al daño selectivo en los vasos sanguíneos tumorales aberrantes, versus los vasos en tejido normal. Esta mayor radio-sensibilidad de los vasos tumorales podría deberse a su estructura y función anormal. (Trivillin et al. 2006)

Otros estudios de biodistribución de GB-10 realizados por nuestro grupo demostraron también su posible utilización en un modelo de metástasis hepáticas en ratas (Garabalino et al. 2011), sin toxicidad asociada.

1.7.3 Fuentes de neutrones usadas en BNCT

Como se puede observar en la Figura 1.16, la sección eficaz de captura de neutrones en ^{10}B es particularmente alta para neutrones térmicos. Por este motivo, lo que se busca de una fuente para BNCT es obtener el **máximo flujo neutrónico térmico en el campo de interés** (el tejido blanco a ser tratado), que el flujo térmico sea lo más homogéneo posible dentro del volumen de tratamiento, y con la menor contribución de neutrones de mayores energías y radiación gamma de fondo proveniente de la misma fuente o de otras reacciones nucleares.

Figura 1.16 Sección eficaz de la reacción $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ como función de la energía del neutrón (extraído de Burlon 2001). En la zona térmica, $E < 1\text{eV}$, se suele observar una proporcionalidad de la sección eficaz microscópica respecto del inverso de la velocidad, que se puede expresar como una proporcionalidad respecto a la raíz del inverso de la energía cinética del neutrón ($\sigma \propto 1/v \propto 1/\sqrt{E}$). Para la energía típica de los neutrones térmicos (aproximadamente $0,025\text{ eV}$) la sección eficaz para la reacción con ^{10}B es de 3840 barns (Koerting Wiese y Queral Salazar 2012).



Para que la terapia por captura neutrónica sea exitosa se considera que se necesita una fluencia de aproximadamente 5×10^{12} neutrones cm^{-2} (Barth et al. 1990). Hasta el año 2012, las fuentes de neutrones, disponibles con esta capacidad para ensayos clínicos y experimentales en BNCT, provenían exclusivamente de reactores nucleares de investigación. En casi todos los casos, estas fuentes fueron desarrolladas a partir de la modificación y adecuación de los canales de irradiación en los reactores pre-existentes, con unos pocos proyectos de nuevos reactores que contemplan fuentes desde el diseño (IAEA-TECDOC-1223 2001). En la Tabla 1.2 se listan los reactores de investigación que cuentan con facilidades clínicas o experimentales para la aplicación de BNCT, según registro de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA). Cabe aclarar que actualmente, no todas estas instalaciones mantienen activos proyectos relacionados con BNCT.

Tabla 1.2 Listado de reactores nucleares de investigación que cuentan con fuentes de neutrones para la aplicación clínica o la investigación en BNCT (Adaptado de http://www-naweb.iaea.org/napc/physics/research_reactors/database/RR%20Data%20Base/datasets/utilization/b_neutroncap_ther_list.html).

Reactores que cuentan con facilidades para BNCT				
País	Nombre reactor	Tipo	Potencia térmica [kW]	Año criticidad
Argentina	RA-1 ENRICO FERMI	TANK	40	1958
Argentina	RA-6	POOL	1000	1982
Argentina	RA-3	POOL	10000	1968
Brazil	IEA-R1	POOL	5000	1957
CzechRepublic	LVR-15 REZ	TANK WWR	10000	1957
Finland	FIR-1	TRIGA MARK II	250	1962
Germany	BER-II	POOL	10000	1973
Germany	FRM II	POOL	20000	2004
Hungary	NUCL. TRAINING REACTOR	POOL	100	1971
Italy	LENA, TRIGA II PAVIA	TRIGA MARK II	250	1965
Italy	RSV TAPIRO	FAST SOURCE	5	1971
Japan	JRR-4	POOL	3500	1965
Japan	KUR	TANK	5000	1964
Kazakhstan	WWR-K ALMA ATA	POOL	6000	1967
Netherlands	HFR	TANK IN POOL	45000	1961
Russian Federation	IRT	POOL, IRT	2500	1967
Russian Federation	IRT-T	POOL, IRT	6000	1967
Russian Federation	RBT-10/2	POOL	7000	1984
Taiwan, China	THOR	TRIGA CONV	1000	1961
United States of America	MURR	POOL, PWR	10000	1966
United States of America	WSUR	TRIGA CONV	1000	1961
United States of America	MITR-II MASS. INST. TECH.	TANK	4900	1958

En general, los haces de neutrones disponibles basados en reactores no son mono-energéticos y contienen una mezcla de radiaciones: neutrones (térmicos, epitérmicos, rápidos) y rayos gamma. Si bien los neutrones epitérmicos no son de interés directo para producir la reacción de captura con el ^{10}B , estos se “termalizan”, es decir, disminuyen su energía a medida que penetran en el tejido irradiado, alcanzando un pico térmico a 3-6 cm de profundidad. De esta forma, pueden ser útiles para el tratamiento de tumores en profundidad, y muchas fuentes basan su diseño en esta característica. A diferencia de los neutrones epitérmicos, los

neutrones térmicos no son capaces de alcanzar gran profundidad en los tejidos. Considerando un haz de neutrones térmicos, el flujo incidente se reduce aproximadamente al 50% a los 2,5 cm (Sweet et al. 1960). Por lo tanto, un haz de neutrones térmicos puro es útil si la terapia del BNCT se aplica a lesiones superficiales o poco profundas.

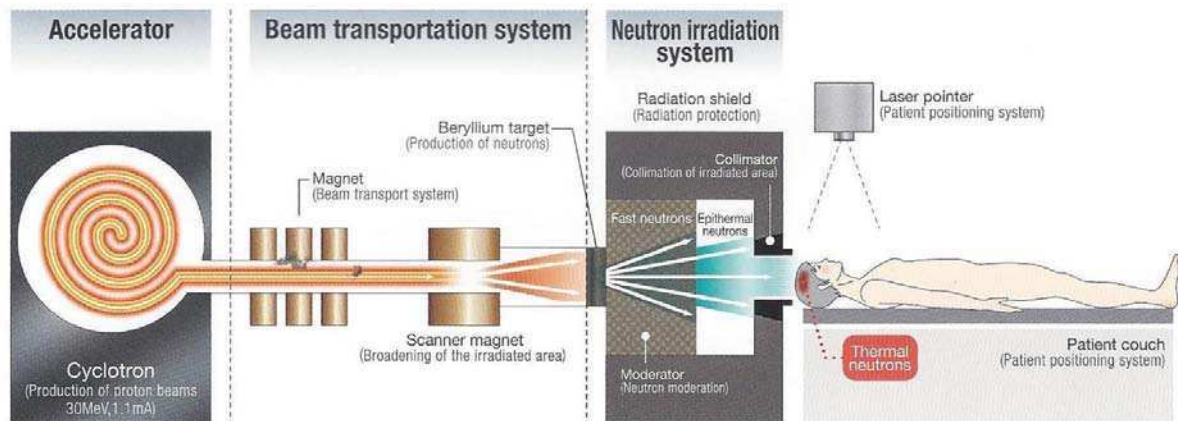
Hasta ahora se ha demostrado que las facilidades basadas en reactores, poseen fuentes de alta intensidad y calidad adecuada para la aplicación clínica del BNCT (Harling 2009). Sin embargo, el uso de reactores nucleares presenta una serie de desventajas: la mayoría de los reactores se encuentran alejados de los hospitales y, en general, fueron diseñados o son utilizados para otras aplicaciones. A su vez, son máquinas complejas, costosas y con requerimientos bajo normativas especiales para su manejo seguro, que requieren numeroso personal calificado destinado exclusivamente para su operación y mantenimiento. Cabe mencionar que hace algunos años, fue desarrollado en China un reactor diseñado específicamente para Terapia por Captura Neutrónica y está basado en un diseño seguro y de bajo costo, especialmente adecuado para ser instalado dentro de un hospital o en áreas urbanas populares (Barth 2012). Si bien el reactor se llegó a poner en marcha (Li et al. 2013), hasta el momento no se reportaron casos de aplicaciones de BNCT con esta nueva facilidad.

Debido a las limitaciones que presentan los reactores, en varios lugares del mundo se pusieron en marcha proyectos de desarrollo de fuentes de neutrones basadas en aceleradores, que a futuro puedan ser emplazadas en hospitales o sus cercanías (por ejemplo ver Kreiner et al. 2011). Los aceleradores serían fuentes más sencillas de licenciar que los reactores dentro de un hospital, y los diseños serían más compactos y menos costosos que los reactores. El mayor desafío para estos proyectos, es lograr una mayor intensidad con estas fuentes, para alcanzar el rendimiento de las mejores fuentes basadas en reactores y satisfacer las potenciales necesidades clínicas en BNCT (Harling 2009).

Actualmente, los países que se encuentran involucrados en el desarrollo de aceleradores son: Argentina (Kreiner et al. 2011, Cartelli et al. 2014), Inglaterra (Green 1998), Italia (Ceballos et al. 2010, Pisent et al. 2014), Israel (Halfon et al. 2010), Rusia (Aleynik et al. 2010, Kononov et al. 2010) y Japón (Mitsumoto et al. 2010, Kumada et al. 2011, Yoshioka et al. 2014).

En particular, en el año 2012, se puso en marcha el primer acelerador dedicado a BNCT en el centro de investigación de la Universidad de Kyoto, Japón (University Research Reactor Institute (KURRI)) (Figura 1.17). Actualmente se encuentran en marcha los primeros tratamientos clínicos con el uso de este tipo de fuente y se esperan los primeros reportes sobre los mismos. Este es un hecho de relevancia para la comunidad mundial de BNCT, ya que demuestra la factibilidad de utilización de esta nueva tecnología.

Figura 1.17 Esquema de una fuente de neutrones basada en un acelerador (tipo ciclotrón). Adaptado de una publicación de la Sociedad para la Promoción e Investigación en BNCT de Japón.



Paralelamente, en Italia se desarrolló un foto-convertidor para generar neutrones que se adaptó a un acelerador lineal de fotones (Linac) en un servicio de radioterapia convencional. Se encuentran en marcha ensayos biológicos a nivel experimental con esta fuente, llevados a cabo enteramente en un ámbito hospitalario (Vidali 2009).

Si el BNCT alcanza una aceptación general como tratamiento oncológico de rutina, será necesario disponer de facilidades de irradiación ubicadas en las cercanías de los centros hospitalarios. De acuerdo al contexto actual, las futuras fuentes de neutrones de estas facilidades estarán basadas en tecnología de aceleradores, lo que resalta la importancia de contar con proyectos propios en esta materia y la necesidad de realizar estudios radiobiológicos con aceleradores.

1.7.4 Dosimetría en BNCT

La radiación entregada en BNCT se compone de un campo mixto complejo que involucra radiación de alto y bajo LET, que depende de las características

espectrales y espaciales de la fuente de neutrones incidente, así como de la geometría y la composición elemental del blanco de interés que se irradia. Con el propósito de describir la dosimetría en BNCT, el campo de radiación generalmente se divide en cuatro componentes primarios: **componente boro, neutrones térmicos, neutrones rápidos y fotones** (Goorley et al. 2002).

La componente de principal interés es la **dosis boro** que se genera por el depósito de energía que llevan los productos de la reacción $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$, descrita anteriormente (partículas alfa de 1,47 MeV, rango 9 μm , LET: 196 keV/ μm y partículas de Litio de 0,84 MeV, rango 5 μm , LET: 162 keV/ μm).

Sin embargo, la interacción de los neutrones con los núcleos de otros elementos presentes en el tejido, inevitablemente entregarán una **dosis de fondo**^e. Cabe destacar que la dosis de fondo es una **componente no específica** que afectará tanto al tumor como a otros tejidos irradiados. Considerando las concentraciones de los diferentes elementos que componen los tejidos del organismo y las secciones eficaces para reacciones con neutrones de diferentes energías, solo contribuyen de manera significativa a la dosis de fondo las reacciones asociadas con el nitrógeno y el hidrógeno^f.

La **dosis debida a neutrones térmicos** proviene principalmente de la reacción de captura $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$, por la cual protones de alto LET depositan la energía con la que son producidos (590 keV) en el tejido donde se generan. La dosis asociada a esta componente varía según la composición de nitrógeno presente en el medio que, en general, se encuentra en un rango de entre 3 y 6 % peso en peso (% p/p), dependiendo del tipo de tejido o tumor.

La **dosis por neutrones rápidos** (de energía cinética mayor que 10 keV) se genera por la energía depositada en el tejido por protones “recoil” generados en la reacción $^1\text{H}(n,n^1)\text{p}$ de colisión elástica con los núcleos de hidrógeno. La composición de hidrógeno en los tejidos es aproximadamente del 10% p/p, salvo en algunos casos como el hueso en que es del 7% p/p.

^e Las secciones eficaces y la composición elemental de los diferentes tejidos, en general están determinadas y se encuentran disponibles en bibliografía, como por ejemplo, los reportes publicados por la Comisión Internacional de Unidades y Medidas sobre Radiación (ICRU, International Commission on Radiation Units and Measurements).

^f La contribución debida a reacciones de neutrones térmicos con otros elementos presentes en un tejido biológico en cantidades considerables (por ejemplo: ^{12}C , ^{16}O , Na, ^{31}P , S, Cl, Ca), son despreciables frente a la contribución de las reacciones con el ^{14}N y el H.

La **dosis por fotones** tiene dos contribuciones: una debida a la **componente gamma de la fuente de neutrones** (p/ ej. núcleo del reactor) y otra debida a los rayos gamma (de 2,2 MeV de energía) producidos por la **reacción de captura de neutrones térmicos en el hidrógeno** presente en los tejidos (reacción $^1\text{H}(n,\gamma) ^2\text{H}$). En este trabajo, para el cálculo dosimétrico, ambas componentes de rayos gamma se consideran juntas.

Analizando estas cuatro componentes de dosis en conjunto, 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, y/o de su micro-localización, así como de la efectividad biológica diferencial de la componente boro de alto LET, ya que las otras componentes de dosis estarán presentes en tumor y tejido normal en magnitudes similares y constituyen lo que se denomina dosis de fondo.

1.7.4.1 Consideraciones básicas para la estimación de dosis equivalente

Para la planificación de un tratamiento en BNCT habitualmente se asume que las diferentes componentes de dosis actúan de forma independiente entre sí, y en general la dosis total equivalente a fotones de referencia o dosis pesada (D_w) se describe según la ecuación:

$$D_w = D_\gamma \times DRF + D_F \times RBE_F + D_N \times RBE_N + D_B \times CBE$$

donde D_γ es la dosis absorbida debida a rayos- γ , DRF es un factor de reducción para rayos- γ que depende de la tasa de dosis asociada a esta componente⁹; D_F es la dosis absorbida debida a protones recoil generados en la reacción $^1\text{H}(n,n^1)\text{p}$ con neutrones rápidos; D_N es la dosis absorbida debida a protones por la reacción $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$ con neutrones térmicos; D_B la dosis asociada a la reacción con ^{10}B ; y RBE_F , RBE_N y CBE son los factores experimentales de eficiencia biológica relativa

⁹ El efecto de la tasa de dosis de radiación de bajo-LET es debido a la reparación en el tiempo del daño subletal sobre el ADN. Para tiempos prolongados de exposición a bajas tasas de dosis de rayos- γ , la efectividad biológica decrece en comparación con dosis de rayos- γ entregados a 1 Gy/min o más (radiación de referencia en radioterapia). Por ejemplo, considerando una supervivencia celular del 1% en un ensayo clonogénico, el DRF (Dose Reduction Factor) para un efecto equivalente sería <0.7 para tasa de dosis <0.16 Gy/min, representativa de fuentes de neutrones utilizadas en BNCT (DRF = cociente de dosis necesarias para producir el mismo efecto con rayos- γ a alta y baja tasa de dosis). Cuando los tiempos de exposición son suficientemente cortos (< 10 min), como ocurre en varios estudios radiobiológicos de BNCT con fuentes de neutrones térmicos, los efectos de la reparación del daño subletal pueden ser considerados suficientemente pequeños e ignorados (DRF = 1) (Hopewell et al. 2012).

(RBE) utilizados para convertir las dosis absorbidas [Gy] de cada componente a dosis fotón-equivalente (D_w , [Gy-eq]) (Kiger et al. 2008, Hopewell et al. 2012). En particular, los factores **CBE (compound biological effectiveness)** son utilizados como una alternativa de los factores RBE para la evaluación de la componente boro de la dosis absorbida por BNCT, debido a que diferentes compuestos borados, o incluso el mismo compuesto, pueden tener distintos efectos en diferentes tejidos, debido a variaciones en la micro-distribución de los compuestos o características morfológicas de las células blanco (Suzuki et al. 2000, 2007). El **CBE** es un factor que considera el RBE de las partículas alfa y los iones ^7Li , junto con la micro-distribución del compuesto portador de ^{10}B en un tejido particular. Dado el corto alcance de estas partículas en un tejido (9 μm y 5 μm , respectivamente), el efecto biológico de la deposición de energía depende en forma crítica tanto de la localización absoluta "integral" como de la microscópica del boro en los tejidos y células. Por ejemplo, la energía de las reacciones de captura neutrónica con el ^{10}B que ocurran en el lumen de un vaso sanguíneo puede ser disipada en el volumen sanguíneo y, de cierta forma, "desperdiciada" (Hopewell et al. 2012).

1.7.4.2 Requisitos futuros para una mejor comparación de dosis

El método de estimación de dosis equivalente descrito en el apartado anterior, tradicionalmente utilizado en la búsqueda de relacionar los efectos observados en un protocolo clínico de BNCT con los correspondientes resultados obtenidos con terapia con fotones, está siendo discutido y revisado. Los factores RBE en general son utilizados como factores fijos de conversión, independientes de la dosis y de la tasa de dosis suministrada, requisitos que no siempre se cumplen (González y Santa Cruz 2012). En general, tampoco se considera que los factores RBE pueden depender del espectro neutrónico de la fuente utilizada (Horiguchi et al. 2015). De esta forma, es fundamental resaltar que el uso correcto de factores RBE/CBE para la estimación de dosis fotón-equivalente, requiere que estos factores se establezcan bajo condiciones experimentales lo más cercanas posibles a un escenario clínico que se quiere representar (Hopewell et al. 2012). En general estos factores fijos se aceptan como simples números, derivados de diferentes estudios, sistemas biológicos y criterios de valoración (*end-points*). Muchas veces se observa el uso de factores obtenidos para un escenario de tratamiento que luego se extrapolan a un contexto completamente diferente (por ejemplo, factores RBE calculados en un

modelo de glioblastoma para un determinado compuesto borado, utilizados para el cálculo de dosis equivalente en otros tejidos tratados con el mismo compuesto). Tal vez la objeción más importante que se le atribuye al procedimiento de usar estos factores como números fijos, sea que los mismos dependen no solo de la dosis (o el end-point considerado) sino también de la tasa de dosis (González y Santa Cruz 2012). Sin embargo, es importante destacar que los valores de RBE fijos como multiplicadores se utilizan en la presentación de informes de dosis isoelectiva en terapia de haz de iones, a pesar de que cambian con la profundidad (González y Santa Cruz 2012).

Como se mencionó previamente, en la práctica de rutina de BNCT se asume que las diferentes componentes de dosis de un campo mixto de radiación actúan en forma independiente entre sí. Sin embargo, solo un incremento relativamente pequeño en la efectividad biológica de los rayos- γ , cuando son suministrados en combinación con radiación de alto-LET, y se comparan con un tratamiento con solo rayos- γ , puede reducir significativamente los aparentes RBE/CBE de las componentes de alto-LET de ese campo mixto de radiación. Aunque la potencial interacción entre radiaciones de alto- y bajo-LET resulta de considerable importancia, no ha sido estudiada extensamente, ni directamente investigada en relación a BNCT (Hopewell et al. 2012). En este sentido, la posible existencia de efectos sinérgicos se opone a la generalmente asumida acción independiente de las diferentes radiaciones. De esta forma, la aplicación sin restricciones de los factores de RBE fijos derivados de cada radiación considerada en forma independiente, puede conducir a resultados incorrectos (González y Santa Cruz, 2012).

En este contexto, González y Santa Cruz propusieron un formalismo para el cálculo de la **dosis isoelectiva (IsoE)** como alternativa diferente al tradicional cálculo de dosis "equivalente a fotones o pesada". En este trabajo, el formalismo considera la reparación de primer orden de las lesiones subletales por medio del factor generalizado de Lea-Catcheside en el modelo lineal cuadrático modificado, y también considera el sinergismo de las interacciones entre las diferentes radiaciones. La propuesta parte de conocimientos básicos ampliamente aceptados en la materia, y se presenta como un enfoque más realista que esencialmente explota toda la información experimental disponible a partir de experimentos biológicos, a la vez que se presenta como una alternativa de uso simple que puede

ser incluida en los sistemas de planificación de tratamientos utilizados comúnmente en BNCT (González y Santa Cruz, 2012).

Recientemente, Horiguchi et al. también propusieron un método para la estimación de la eficacia biológica relativa para las componentes de BNCT utilizando una función microdosimétrica acoplada a un código de simulación de transporte de partículas (PHTS, en inglés), como otra opción útil para la estimación de la dosis biológica en la planificación de tratamientos de BNCT (Horiguchi et al. 2015).

1.7.5 Resumen sobre ensayos clínicos de BNCT en el mundo

Aunque el potencial clínico de BNCT fue reconocido en la década de 1930, no fue hasta la década de 1950 que los primeros ensayos clínicos para glioblastoma multiforme fueron iniciados por Dr. Farr en el “Brookhaven National Laboratory” (BNL), y por Dr. Sweet y Dr. Brownell en el “Massachusetts General Hospital” utilizando el reactor del “Massachusetts Institute of Technology” (MIT). Los resultados de estos primeros ensayos fueron desalentadores, culminando por ende en el año 1961. Posteriormente, el Dr. Slatkin analizó cuidadosamente estos ensayos, atribuyendo los resultados negativos a una inadecuada selectividad de incorporación al tumor de los compuestos químicos borados inorgánicos que fueron utilizados como agentes de transporte (borax y pentaborato de sodio); a una insuficiente penetración de los haces de neutrones térmicos en el tejido; y a las altas concentraciones de boro en sangre que resultaron en un daño excesivo de la vasculatura normal del cerebro y del cuero cabelludo (Barth et al. 2005).

Los ensayos clínicos fueron reanudados con mayor éxito por el Dr. Hatanaka en Japón en el año 1967. El Dr. Hatanaka, discípulo del Dr. Sweet, utilizó un haz de neutrones térmicos y el compuesto borado BSH, para el tratamiento de pacientes con gliomas de alto grado. Por otro lado, el BPA fue usado clínicamente por primera vez por Mishima en 1988-9 para tratar pacientes con melanomas cutáneos (Barth et al. 2009).

Desde entonces, se realizaron y/o se encuentran en curso ensayos clínicos de BNCT en varios países (EE.UU., varios países de Europa, Argentina, Taiwan y Japón) para el tratamiento de glioblastoma multiforme, melanoma y más recientemente de cáncer de cabeza y cuello (Chanana et al. 1999, Busse et al. 2003, Diaz 2003, Gonzalez et al. 2004, Aiyama et al. 2011, Nakai et al. 2011,

Kankaanranta et al. 2011, 2012, Haapaniemi et al. 2014, Wang et al. 2014, Kageji et al. 2014, Kato et al. 2014). También se ha explorado el potencial terapéutico de BNCT para tratar “ex-situ”, metástasis de hígado multifocales, bilobulares, no resecables quirúrgicamente, seguido de autotransplante total de hígado (Zonta et al. 2006, Cardoso et al. 2009). Este último caso será abordado en mayor detalle en el capítulo 3 dada la relevancia para este trabajo de tesis.

En los últimos años se ha evaluado la posibilidad de tratamiento de tumores de pulmón y cavidad torácica. En Japón, se evaluó la factibilidad de tratamiento con BNCT de mesotelioma maligno pleural y se comenzaron los primeros ensayos clínicos (Suzuki et al. 2006, 2008, 2009). Actualmente el cáncer de pulmón constituye, en KURRI (Japón), aproximadamente un tercio de los casos tratados.

También se ha expandido la aplicación de BNCT a varios casos clínicos a nivel piloto para el tratamiento de cáncer recurrente de mama, cáncer hepático y gastrointestinal (Yanagie et al. 2014a, 2014b).

Dado el gran esfuerzo que conllevan las irradiaciones para BNCT y el número limitado de pacientes que cada centro clínico puede irradiar, sería relevante poder combinar los resultados clínicos disponibles (Harling 2009). Para ello sería necesario establecer cierta uniformidad en cuanto a los protocolos de tratamiento y los criterios de inclusión y exclusión. Si bien se reconoce la potencial ventaja de este enfoque, no es sencillo de implementar debido a las características (tanto técnicas como de contorno) propias de cada centro y de los profesionales a cargo.

A futuro, el establecimiento del BNCT como una modalidad clínica de rutina, requerirá de resultados positivos claros de estudios clínicos rigurosos con mayor número de pacientes. Es más probable que, a corto plazo, las mejoras en los resultados clínicos surjan de los avances en la optimización del direccionamiento de los compuestos borados que de mejoras en otras tecnologías relacionadas al BNCT. La disponibilidad de nuevas fuentes basadas en aceleradores ubicadas estratégicamente en las cercanías de los centros hospitalarios de atención, seguramente conllevará un impulso y aumentará el número de pacientes tratados y de ensayos clínicos activos. Se espera que de esta manera sea posible realizar los ensayos clínicos randomizados, tan necesarios para establecer fehacientemente el valor terapéutico de BNCT versus otras modalidades terapéuticas.

1.7.6 Proyecto BNCT en Argentina

Como toda terapia para el cáncer en fase de investigación clínica, el proyecto BNCT dedica una parte importante de sus actividades a la investigación aplicada y al desarrollo tecnológico. El actual proyecto BNCT en Argentina es un excelente ejemplo de un programa de investigación fuertemente interactivo, contando con capacidad en prácticamente todas las áreas específicas asociadas con la tecnología para realizar BNCT, como ser: aceleradores, reactores, aplicaciones clínicas, dosimetría computacional y planificación de tratamientos, física médica, microlocalización del boro, instrumentación nuclear, química y radiobiología.

Las diferentes áreas se articulan a través de una coordinación general, formalmente establecida en el Departamento Coordinación BNCT, Gerencia de Química Nuclear y Ciencias de la Salud, perteneciente a la Gerencia de Área de Aplicaciones de la Tecnología Nuclear, CNEA y de un comité asesor, representando a cada una de las áreas temáticas, cuyos miembros pertenecen a distintos sectores de CNEA y de otras instituciones médicas.

Históricamente, el proyecto BNCT en Argentina comenzó en el año 1999 en un trabajo en colaboración entre la CNEA y el Instituto Médico Ángel H. Roffo. El proyecto contempló el desarrollo de la tecnología, de las facilidades, y de los estudios científicos y médicos para permitir la aplicación del BNCT en seres humanos en nuestro país (Menendez et al. 2009). Considerando los estudios clínicos a nivel internacional con mayores expectativas de éxito y menor riesgo de toxicidad en órganos vitales, el primer caso que se consideró como blanco para tratamiento en Argentina fue el de melanoma maligno en extremidades. Durante los años 2003 al 2007, se comenzó con el tratamiento en fase I/II de pacientes con esta patología en la facilidad de BNCT del reactor RA-6, Centro Atómico Bariloche, demostrando la seguridad y eficacia del protocolo implementado. Los resultados obtenidos fueron comparables a los alcanzados con otras formas de radioterapia, pero con una toxicidad más baja y tolerable (Gonzalez et al. 2004, Santa Cruz 2014).

Durante los años 2008 al 2013, el reactor RA-6 fue convertido para el uso de combustibles de uranio de bajo enriquecimiento, llevándose a cabo cambios mayores en el mismo, gracias a los cuales opera hoy a una mayor potencia. Durante este periodo se mejoraron sustancialmente todas las facilidades asociadas, incluyendo la sala de tratamiento de pacientes de BNCT (Santa Cruz 2014). Luego

de realizar la caracterización experimental y computacional del nuevo haz de neutrones para tratamiento, se elaboró y presentó toda la documentación pertinente ante la Autoridad Regulatoria Nuclear y se obtuvo la renovación de la licencia de operación para usos clínicos. Recientemente, en octubre de 2015, se reinició el ensayo clínico de BNCT para melanoma de extremidades. Los resultados del tratamiento del primer paciente de esta etapa se encuentran en evaluación.

Además del melanoma, se vienen investigando a nivel experimental en el proyecto de CNEA distintas patologías para las cuales BNCT se presenta como una opción competitiva: cáncer de cabeza y cuello, recurrente o inoperable, cáncer indiferenciado de tiroides, metástasis difusas en pulmón e hígado, sarcoma de Ewing, osteosarcoma, cáncer de mama de uno de los tipos más agresivos (HER2+) y cáncer de pulmón de células no pequeñas, entre otros. Nuestro grupo está investigando la aplicación de BNCT en artritis reumatoidea además de realizar estudios experimentales en cáncer de cabeza y cuello y metástasis difusas en pulmón e hígado (Santa Cruz 2014).

En particular, basados en el trabajo realizado en la Universidad de Pavia, (Zonta et al. 2006), en el año 2004 comenzaron los estudios y el desarrollo de la facilidad de irradiación en el reactor nuclear RA-3, que permitieran el tratamiento con BNCT ex-situ de pacientes con metástasis en hígado en Argentina (Gadan et al. 2009, Miller et al. 2009, Cardoso et al. 2009). Por su complejidad y originalidad, el tratamiento de órganos mediante la irradiación BNCT ex-situ, es decir, extracorpórea, es uno de los ensayos clínicos de mayor envergadura. La misma consiste en la administración en quirófano del compuesto de boro, la extracción y transporte del órgano en condiciones de preservación para trasplante, su irradiación en un reactor nuclear y el re-implante en el paciente (Santa Cruz 2014).

Asimismo, este protocolo ex-situ comenzó su etapa pre-clínica en el año 2014, al haberse llevado a cabo en CNEA y por primera vez en el mundo la cirugía de explante de pulmón en ovejas, transporte, irradiación en el reactor RA-3 y reimplante en el animal, en colaboración con la Universidad Maimónides (Santa Cruz 2014).

La fuente de neutrones del reactor RA-3 tiene vinculación directa con este trabajo de tesis, por lo que se describe en detalle en las próximas secciones.

1.8 Antecedentes de nuestro laboratorio

En el marco del proyecto BNCT impulsado por CNEA, nuestro grupo de trabajo perteneciente a la División Patología de la Radiación del Departamento de Radiobiología trabaja desde hace años en el desarrollo de modelos animales experimentales y el estudio de la potencialidad terapéutica del BNCT en los mismos. Propuso por primera vez el modelo experimental de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster para estudios de BNCT (Kreimann et al. 2001a). Demostró la incorporación de cantidades terapéuticas de los compuestos borados borofenilalanina (BPA) (Kreimann et al. 2001a), decahidrodecaborato de sodio o GB-10 ($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) y (GB-10 + BPA) administrados en forma combinada a los tumores de la bolsa de la mejilla del hámster (Heber et al. 2004). En estudios de BNCT *in vivo* realizados en el reactor RA-6 (CAB) se demostró que el BNCT mediado por BPA, GB-10 y (GB-10 + BPA), indujo un control tumoral significativo sin inducir daño en el tejido normal. Así, se reportó por primera vez el éxito terapéutico del BNCT en el tratamiento de cáncer bucal en un modelo experimental, demostrando la posibilidad de una nueva aplicación del BNCT (Kreimann et al. 2001b, Trivillin et al. 2004a, Trivillin et al. 2006). Asimismo, el modelo ha permitido estudiar el comportamiento de la piel, de la mucosa pre-cancerosa y de los tejidos bucales normales que pueden resultar limitantes de la dosis. Como estudios pre-clínicos, se trataron 3 casos de cáncer espontáneo de cabeza y cuello en felinos con BNCT mediado por BPA con el haz térmico del RA-1 ubicado en el Centro Atómico Constituyentes (CAC) y 3 casos adicionales con el haz del RA-6 (Rao et al. 2004; Trivillin et al. 2008).

Se desarrolló un modelo de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster menos agresivo (modelo de pre-cáncer bucal), que permite el seguimiento de los animales, luego del tratamiento, por períodos muy prolongados (Heber et al, 2010). Con este modelo se estudia el desarrollo de nuevos tumores sobre el campo cancerizado luego del tratamiento con BNCT (Monti Hughes et al. 2009, Monti Hughes et al., 2011), un aspecto de gran relevancia clínica ya que el desarrollo de segundos tumores primarios en un tejido con cancerización de campo es frecuentemente la causa del fracaso terapéutico en cánceres de cabeza y cuello.

Nuestro grupo también evaluó algunos aspectos del mecanismo de acción del BNCT en los tumores (Aromando et al. 2009, 2010) y la potencialidad terapéutica de nuevos agentes portadores de boro en el modelo de cáncer bucal en la mejilla del

hámster. En cuanto a esto último, se realizaron estudios de biodistribución de una tetrafenil-profirina borada, lipofílica (Kreimann et al. 2003), y de los liposomas borados MAC y MAC-TAC (Heber et al. 2012). Asimismo, se realizaron estudios de biodistribución con el compuesto borado BSH (Garabalino et al. 2013, 2014) que al igual que el BPA y el GB-10 está aprobado para su uso en humanos.

Paralelamente, se desarrolló la **facilidad de irradiación central en la columna térmica del reactor RA-3 (FCCT)** y se estaba caracterizando el campo de radiación de esta fuente para poder estimar los parámetros dosimétricos de la misma. El modelo experimental de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster también se utilizó como referencia para llevar adelante los primeros estudios radiobiológicos *in vivo* utilizando esta fuente, trabajo que se desarrolla específicamente en el capítulo 2 de esta tesis, que contribuyó posteriormente al desarrollo de otras líneas de trabajo en el modelo de cáncer bucal en el hámster. Entre ellas se encuentran la aplicación de BNCT Secuencial (Molinari et al. 2011), el uso de agentes normalizadores de la vasculatura tumoral previo a la administración del compuesto borado (Molinari et al. 2012), la aplicación de BNCT en el modelo de pre-cáncer bucal (Monti Hughes et al. 2009, 2011, 2013) y la aplicación de BNCT utilizando liposomas borados (Heber et al. 2014).

En 2007 comenzaron los primeros estudios de BNCT sobre hígado normal de rata en el RA-6, relacionados al proyecto de tratamiento de metástasis en hígado en Argentina (Cardoso et al. 2007). La continuación de este proyecto, con la utilización de un modelo de metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon en ratas BDIX y estudios de BNCT *in vivo*, se desarrolla en el Capítulo 3 del presente trabajo.

1.9 Reactor RA-3

El Reactor RA-3 se encuentra instalado en el Centro Atómico Ezeiza (CAE), Partido de Ezeiza, Provincia de Buenos Aires, a 33 km de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

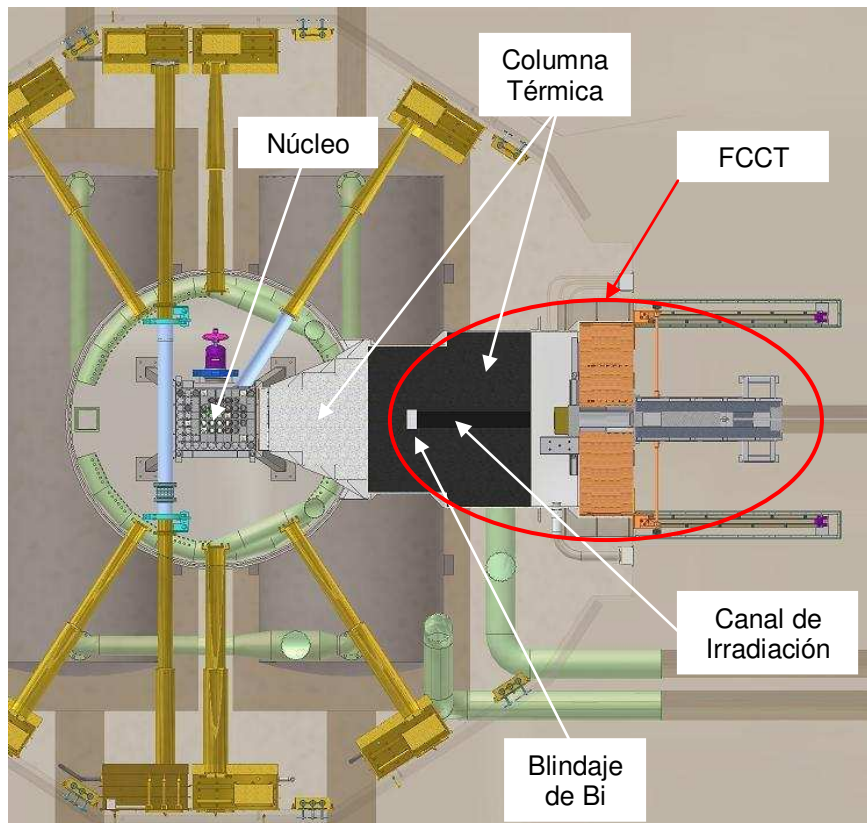
Es un reactor del tipo tanque abierto, con elementos combustibles con uranio enriquecido en U-235 al 20%. Utiliza como moderador y refrigerante agua liviana, y su núcleo se encuentra reflejado por grafito. La potencia de trabajo licenciada es de 10 MW térmicos.

La aplicación principal del RA-3 es la producción en escala comercial de radioisótopos, actividad para la cual se trabaja operando la máquina 4 días a la semana en forma ininterrumpida. Además, el reactor cuenta con cajas de irradiación, columna térmica, y tubos de haces neutrónicos, que permiten la experimentación en un amplio rango de temas vinculados con la investigación básica y con aplicaciones tecnológicas.

1.9.1 Columna Térmica del reactor RA-3

La columna térmica del reactor (CT) consiste en una estructura de bloques de grafito de pureza nuclear ubicados en un sector del blindaje de concreto del reactor, que consta de 3 secciones cuadradas escalonadas decrecientes hacia el interior del blindaje. Luego se cierra hacia el lado del tanque del reactor penetrando su pared, en una pieza de aluminio con forma de pirámide truncada escalonada (IS-RA3-04 2010). En la Figura 1.18 se muestra una vista superior en corte parcial del núcleo y la columna térmica a la altura del canal central de irradiación de la misma.

Figura 1.18 Vista superior de algunos componentes del reactor. Se muestra un corte del núcleo y la columna térmica a la altura del canal de irradiación central.



La columna térmica tiene por objeto disminuir la energía cinética de los neutrones provenientes del núcleo, con el propósito de obtener un flujo termalizado (de baja energía).

Con el objeto de permitir la entrada o salida de muestras del túnel de irradiación central de la columna térmica, con el reactor en marcha a plena potencia durante la producción de radioisótopos, se ha implementado un sistema especial de blindajes. El conjunto de este sistema de blindajes y la cavidad central de irradiación se ha denominado “Facilidad de Irradiación Central de Columna Térmica” (FCCT) (delimitado con un círculo rojo en la Figura 1.18).

1.9.2 Facilidad de irradiación Central de Columna Térmica

Como se mencionó anteriormente, la FCCT se encuentra vinculada fuertemente al proyecto de investigación sobre BNCT, y se diseñó con el objetivo principal del tratamiento clínico ex-situ de metástasis en hígado derivadas de carcinoma de colon (ver apartado 1.7.6). Una vez construida y caracterizada, se la consideró adecuada para su utilización en estudios radiobiológicos de BNCT así como para la irradiación de otro tipo de blancos. En la Figura 1.19 se muestra un dibujo en corte transversal con referencia a algunas de las partes fundamentales de la FCCT y su ubicación con respecto al núcleo del reactor.

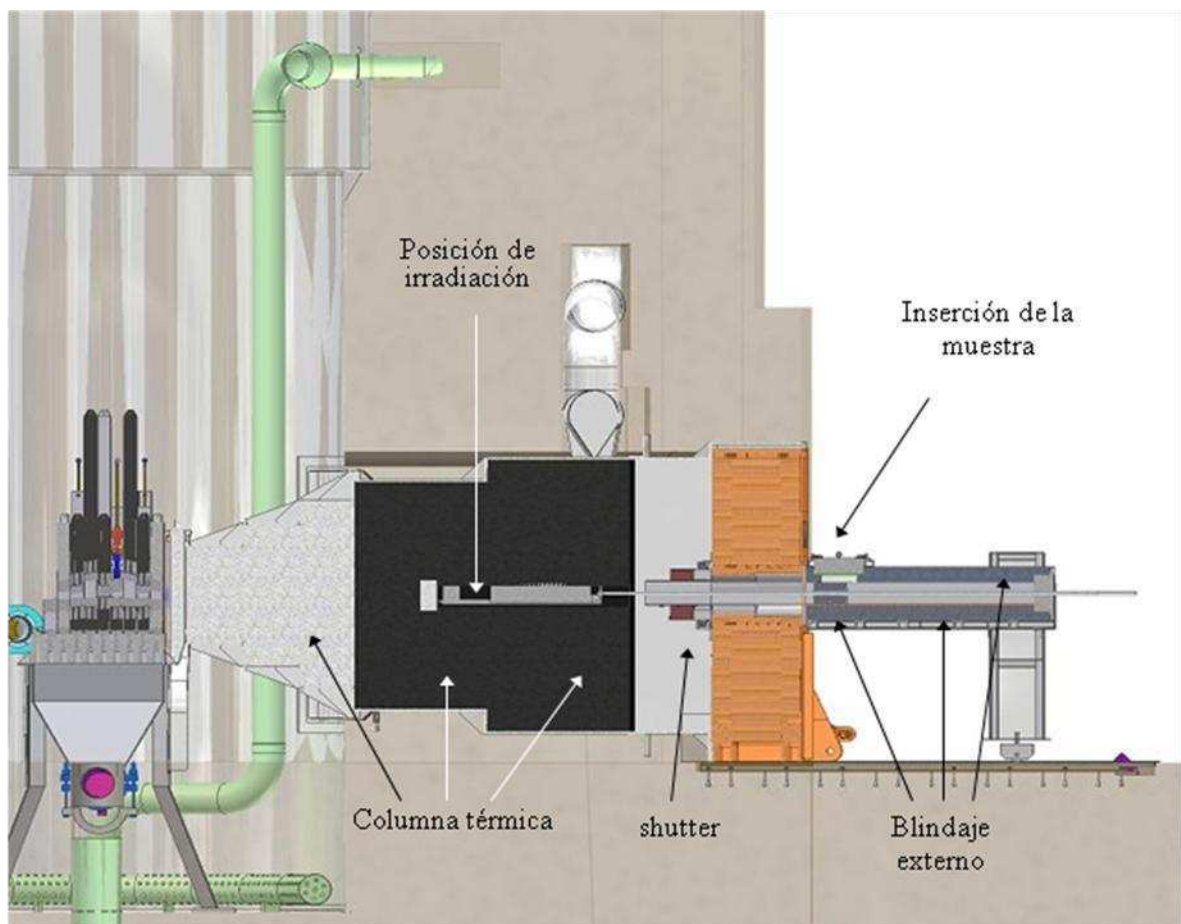
La FCCT es básicamente un sistema de irradiación que incluye el canal central de la CT y un dispositivo de blindajes fijos y móviles que permiten el ingreso y egreso de muestras en la misma con el reactor operando a plena potencia. El sistema de blindajes consiste en una estructura de hierro unida a la puerta de la columna térmica del reactor que sostiene un blindaje de plomo rodeando un tubo de sección rectangular por donde se desplaza un par de bandejas yuxtapuestas.

La bandeja de adelante (stringer) es de zircaloy 4, material de baja activación neutrónica, se encuentra preparada para poder desplazar la muestra dentro del canal central de la columna térmica, y se comanda por un caño de tracción/empuje también de zircaloy 4 (Figura 1.20).

En su extremo más cercano al núcleo, la bandeja posee un primer bloque de 10 cm de espesor de bismuto con las dimensiones máximas para el ingreso en el canal, colocado con el objetivo de agregar un blindaje gamma extra en la posición de irradiación (Figura 1.20). Pegado a este bloque de bismuto se encuentra la cavidad

para contener la muestra a ser irradiada, blindada por debajo por otro bloque de bismuto de 3 cm de alto, que ocupa la superficie de la cavidad de la muestra. Esta base de bismuto posee dos funciones principales. Por un lado, blindar la radiación gamma que ingresa a la cavidad porta muestras desde el plano inferior. Por otro, mantener separado el bloque de bismuto de los bloques de grafito de manera de evitar una posible compresión de la muestra durante el movimiento de la bandeja (Crawley y Gadan 2007).

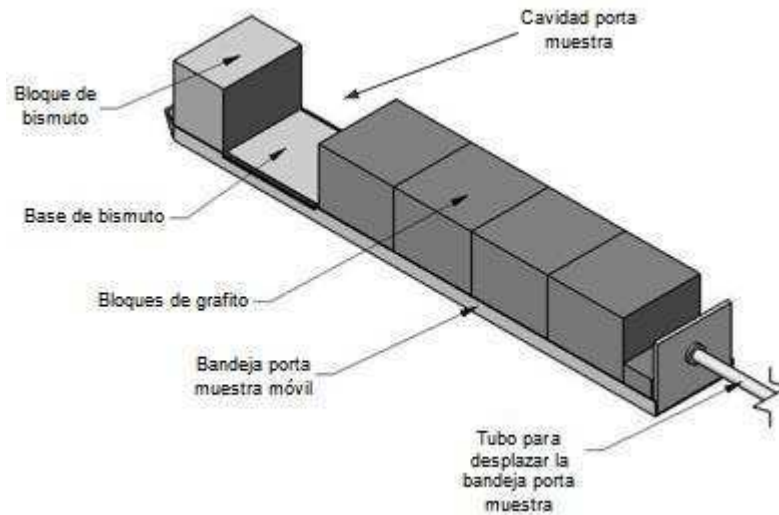
Figura 1.19 Dibujo en vista lateral de la FCCT en corte a la altura del canal de irradiación. En este esquema la bandeja porta-muestras se encuentra en posición de irradiación “a tope”, es decir, la posición más cercana al núcleo que se puede alcanzar dentro del canal.



Actualmente la FCCT permite la irradiación de muestras de diferentes geometrías, siendo el volumen máximo de la cavidad porta muestras de 200 mm de largo x 140 mm de ancho x 110 mm de alto. Detrás de la cavidad porta muestras, la bandeja está preparada para contener una serie bloques de grafito (los grafitos son removibles de acuerdo a las necesidades de cada irradiación) (Figura 1.20). Los bloques de grafito están ubicados en el otro extremo de la bandeja para que en

posición de irradiación aumente la homogeneidad y la isotropía del flujo neutrónico por reflexión de los neutrones en el grafito (Crawley y Gadan 2007).

Figura 1.20 Detalle de la bandeja porta muestras, los blindajes de bismuto adicionales y los grafitos. La configuración de bloques de grafito es variable y se define según las necesidades de cada experiencia (Langan 2006).



La colocación de la muestra a irradiar en la bandeja se realiza a través de la apertura de una puerta blindaje de plomo (Figura 1.21).

Figura 1.21 Puerta blindaje de acceso a la cavidad porta muestras. Ésta se desplaza lateralmente para introducir o extraer las muestras de dicha cavidad.



Dentro de la columna térmica las muestras se exponen a un campo cuasi isotrópico de neutrones térmicos; y a un campo de radiación gamma conformado por una componente proveniente directamente del núcleo del reactor y otra producto de la activación de los materiales estructurales de la columna o de la misma muestra que se expone al flujo de neutrones. La componente de neutrones de otras energías

es prácticamente despreciable (al menos 3 órdenes de magnitud menor) (Miller et al. 2009).

El flujo térmico medio en aire que se puede obtener para una de estas cajas colocadas en el fondo del canal (posición “a tope”), es del orden de 1×10^{10} n/cm²s (Miller et al. 2009). La tasa de dosis gamma en aire en la misma posición actualmente es del orden de 8 Gy/h (chequear valor actual).

1.10 Hipótesis de trabajo

La aplicación de la captura neutrónica en boro es una alternativa de tratamiento para ciertos tipos de cáncer bucal y metástasis de hígado, y los estudios radiobiológicos contribuyen a optimizar su eficacia terapéutica, reducir su radiotoxicidad, diseñar nuevos protocolos de tratamiento eficaces y seguros, y explorar su posible aplicación a otras patologías.

De esta idea general de trabajo se desprenden las siguientes hipótesis específicas de trabajo que se abordan en los siguientes capítulos:

- La facilidad de irradiación de la columna térmica del reactor RA-3 es una fuente de neutrones adecuada para la realización de estudios radiobiológicos de BNCT, siendo estratégicamente útil debido a su proximidad con los centros de investigación donde se llevan adelante las líneas de trabajo. La adaptación de esta facilidad para su utilización con los diferentes modelos animales de estudio que se usan actualmente y la realización de estudios comparativos en el modelo de cáncer bucal en hámster en la misma, servirían para el desarrollo y avance de nuevas líneas de investigación.
- El BPA-BNCT podría ser un tratamiento eficaz para casos de metástasis multifocales, difusas e irresecables derivadas de adenocarcinoma primario de colon. Si bien existen algunos casos de aplicación de este tratamiento para este tipo de patología, la información a nivel experimental es escasa. El estudio sistemático en un modelo experimental sería útil para obtener información que sirva para optimizar la técnica y evaluar la factibilidad de una futura aplicación clínica.

Capítulo 2

2 Aplicación de BNCT al tratamiento de cáncer bucal experimental en la facilidad de irradiación central de la columna térmica del reactor RA-3

2.1 Tratamiento clínico de tumores de cabeza y cuello por BNCT

En general, el tratamiento que se aplica al cáncer avanzado de cabeza y cuello consiste en cirugía y radiación, administrado con o sin quimioterapia. Estos tratamientos son bastante agresivos, se aplican en forma local y combinada, y se justifican debido al mal pronóstico de la enfermedad recurrente. Lamentablemente, la tasa reportada de recurrencia local seguida de este tipo de tratamiento localizado es del 20-57 % (Suzuki et al. 2014). Es decir, existen pocas opciones terapéuticas, además de la quimioterapia paliativa, para aquellos pacientes con cánceres de cabeza y cuello inoperables y que recurren post-tratamiento (Kankaanranta et al. 2007). En los últimos años se comenzaron a aplicar formas de re-irradiación mediante técnicas de radioterapia por intensidad modulada y radioterapia estereotáctica, para casos de cáncer de cabeza y cuello previamente irradiado (Suzuki et al. 2014). En el caso de tumores primarios de células escamosas de cabeza y cuello, la opción de tratamiento mediante cirugía resulta usualmente mutilante y la supervivencia a 5 años en el caso de tumores avanzados es pobre (Kastenbauer y Wollenberg 1999). En este marco, BNCT podría ofrecer una opción terapéutica con preservación de los tejidos.

El grupo de Kato, en Japón, reportó el tratamiento con BNCT de 6 pacientes de los cuales 3 tenían carcinomas de células escamosas, 2 presentaban sarcomas, y uno un tumor de parótida (Kato et al. 2004, Suzuki et al. 2014). Todos recibieron terapia estándar y desarrollaron tumores recurrentes sin opciones de tratamiento. Luego, los 6 pacientes recibieron una aplicación de BNCT utilizando una combinación de los compuestos BSH y BPA (i.v.). El paciente con tumor de parótida, que recibió un segundo tratamiento luego de 1 mes, tuvo la mejor respuesta con un 63% de reducción del volumen tumoral a 1 mes y 94% a 1 año luego del segundo

tratamiento, sin evidencia de recidivas. El resto de los 5 pacientes mostraron respuestas con un rango de 10% a 27% de reducción del volumen tumoral con una mejora en el estado clínico. En el año 2006, también en Japón, un nuevo estudio de BNCT en un paciente con un tumor glandular sub-mandibular recurrente, demostró regresión completa (Aihara et al. 2006).

En el año 2007, el grupo finlandés (Kankaanranta et al. 2007) publicó un estudio realizado en 12 pacientes, con cáncer de cabeza y cuello inoperable, recurrente y avanzado. Estos pacientes ya habían recibido tratamientos como cirugía y radioterapia. Se les administró BPA-F, 400 mg/kg i.v. y, de los 12 pacientes, 10 recibieron 2 aplicaciones de BNCT, y 2 pacientes recibieron una única aplicación. El 83% respondió a BNCT, y el 17% restante tuvo una estabilización en el crecimiento del tumor por 5,5 a 7,6 meses. La duración media de respuesta fue de 12,1 meses. Los efectos adversos más comunes fueron mucositis, fatiga y dolor local, con dos pacientes que sufrieron efectos adversos tardíos.

Recientemente, Suzuki y col. realizaron un estudio retrospectivo sobre los resultados obtenidos de tratamientos de BNCT para cáncer avanzado irresecable o recurrente de cabeza y cuello realizados en Japón entre los años 2001 y 2007 (87 procedimientos de BNCT (BPA+BSH o solo BPA) sobre una cohorte de 62 pacientes, con rango de seguimiento de 0,7- 40,8 meses (mediana 18,7 meses)). La tasa de respuesta total fue 58 % dentro de los 6 meses luego del tratamiento con BNCT y la tasa de supervivencia total a 1 y 2 años fue de 43,1% y 24,2%, respectivamente. Los mayores grados (3 ó 4) de toxicidad aguda alcanzados fueron hiperamilasemia (38,6%), fatiga (6,5%), mucositis/estomatitis (9,7%), y dolor (9,7%), siendo manejable en todos los casos observados. Se registraron 3 casos de pacientes que murieron por toxicidad relacionada con el tratamiento, con el patrón común de que se produjo hemorragia de la arteria carótida, lo que marca la sensibilidad y el cuidado particular que se debe considerar para este tejido (Suzuki et al. 2014).

Actualmente, se sigue evaluando el potencial de BNCT para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello (Kankaanranta et al. 2012). Nuevos grupos de trabajo persiguen el mismo objetivo, tal es el caso del nuevo grupo de investigación en Taiwan (Wang et al. 2011). En el marco del reciente 2º Taller Internacional sobre BNCT realizado en Kyoto, Japón (diciembre de 2014), se puso en conocimiento de

la comunidad científica, que más allá de los 235 tratamientos de distintos tipos de cáncer que se vienen realizando entre los años 2010 y 2014 en el reactor de la Universidad de Kyoto (KUR), desde el año 2012 se comenzaron los tratamientos con el acelerador para BNCT construido en la misma universidad.

De esta forma, a nivel internacional se observa un creciente interés en profundizar las investigaciones sobre la eficacia y seguridad de la aplicación BNCT para cáncer avanzado o recurrente de cabeza y cuello.

2.2 Antecedentes del trabajo

A nivel experimental, los estudios iniciales de BNCT con el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster realizados en nuestro laboratorio en el reactor RA-6 (Kreimann et al. 2001a), precedieron a los ensayos clínicos de BNCT para tumores de cabeza y cuello en Japón (Kato et al. 2004) y más recientemente en Finlandia (Kankaanranta et al. 2007, 2012). El estudio sobre sistemas experimentales es muy útil para contribuir a la comprensión de los diferentes efectos, tratando de potenciarlos o disminuirlos según sean beneficiosos o tóxicos respectivamente, principalmente en la etapa de evaluación pre-clínica de un tratamiento.

Por otro lado, si se implementa una nueva fuente de neutrones para BNCT, resulta de interés llevar adelante estudios radiobiológicos a nivel experimental con el fin de caracterizar la misma y ampliar su utilidad. En este sentido, debido a la puesta en funcionamiento de la FCCT del reactor RA-3, surge la idea de llevar adelante los primeros estudios radiobiológicos *in vivo* utilizando el modelo cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster. Los resultados obtenidos servirían de referencia y podrían ser comparados con los resultados previos de experiencias similares realizadas con otras fuentes en nuestro país. A partir de este trabajo comparativo, que forma parte de esta tesis, se iniciaron diferentes líneas de investigación en el RA-3 en este y otros modelos experimentales que actualmente siguen en marcha (Aromando et al. 2010, Molinari et al. 2011, Monti Hughes et al. 2011, Pozzi et al. 2012). Los estudios en uno de estos modelos (modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX) también forman parte de esta tesis.

Considerando que no se puede evitar la irradiación de cuerpo entero del animal dentro de la FCCT, para llevar adelante estudios en el modelo de cáncer

bucal en la bolsa de la mejilla del hámster utilizando esta fuente, era previsible la necesidad de construir un blindaje de neutrones térmicos, con el fin de irradiar la bolsa de la mejilla cancerizada evertida, minimizando las dosis en el resto del cuerpo del animal. Una aplicación similar había sido considerada para estudios anteriores de nuestro laboratorio utilizando la fuente de neutrones de la columna térmica del reactor RA-1.

2.3 Consideraciones generales sobre el modelo biológico a estudiar

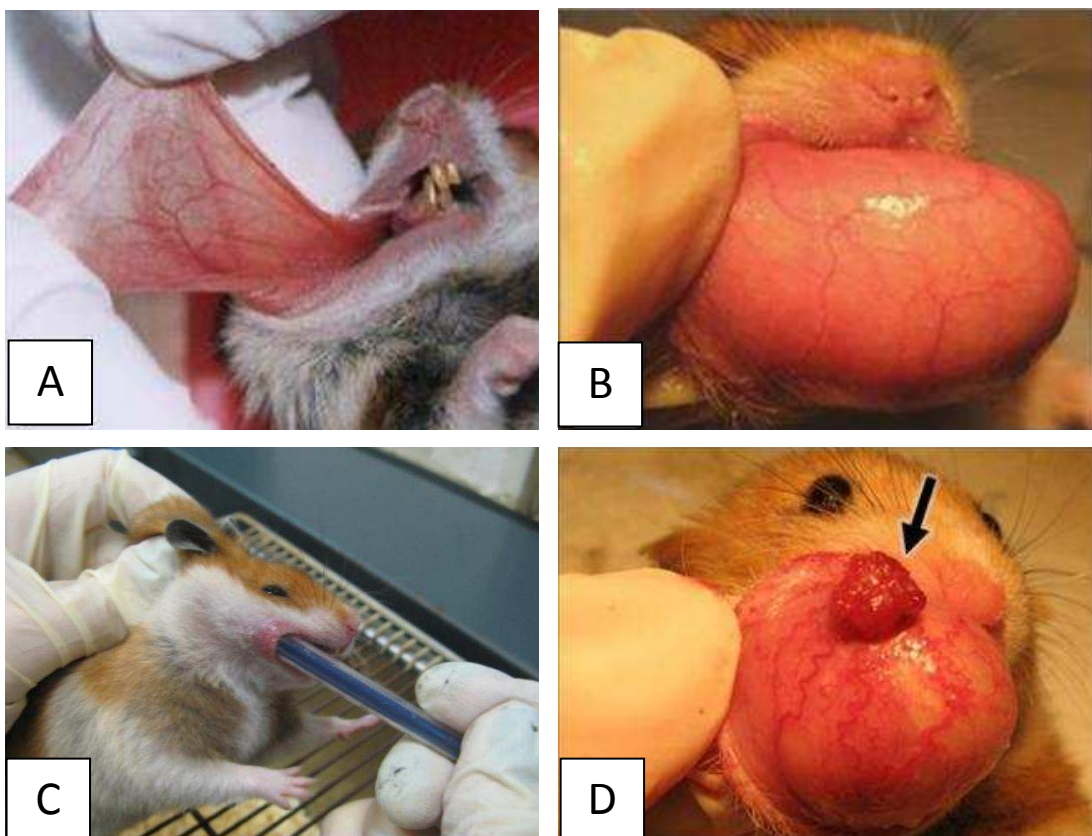
Se emplean tres tipos de modelos de cáncer bucal en investigación básica y aplicada. El primero consiste en tumores espontáneos, como los carcinomas de células escamosas auriculares en ovejas. El segundo corresponde a tumores inducidos por la topicación con carcinógenos químicos, como la inducción por topicación con 4-nitroquinolina-1-oxido en ratón o rata o el carcinoma bucal en la bolsa de la mejilla del hámster, inducido por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) (Monti Hughes 2012). El tercer modelo resulta de la inoculación de células de línea de cáncer de cabeza y cuello humano en ratones inmunodeprimidos, dando origen a tumores xeno-transplantados subcutáneos y ortotópicos (Chen y Lin 2010).

Entre los mencionados, el modelo de cáncer bucal ideal sería aquel que ocurriera espontáneamente. Sin embargo, los carcinomas de células escamosas bucales espontáneos son muy raros tanto en animales domésticos como de laboratorio (Chen y Lin 2010). El uso de modelos animales inducidos por carcinógenos, en cambio, resulta necesario dado que los agentes químicos parecen ser el factor etiológico dominante en varias áreas de la cabeza y cuello incluyendo la cavidad bucal (Vairaktaris et al. 2008). Uno de los mejores modelos caracterizados y aceptado mundialmente para el estudio del carcinoma bucal de células escamosas, es el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), dado que recapitula los eventos secuenciales principales involucrados en el desarrollo del cáncer y precancer bucal humano (Vairaktaris et al. 2008, Chen y Lin 2010).

Anatómicamente, las bolsas bilaterales (una de cada lado de la boca) se encuentran debajo de los músculos de la mejilla, abiertas hacia el interior de la boca, extendiéndose hacia atrás de la cavidad bucal, no más atrás de la faringe.

Histológicamente, están compuestas por una capa de células escamosas delgada (3-4 capas) con una leve queratinización, un tejido conectivo subyacente y capa muscular. La bolsa de la mejilla del hámster es anatómicamente similar a un “bolsillo” en el espesor de cada mejilla. Resulta de fácil acceso, permitiendo así su topicación con diferentes sustancias tales como los carcinógenos químicos, sin necesidad de anestesiarse el animal (Figura 2.1). Asimismo, las bolsas pueden ser extendidas fácilmente para ser irradiadas localmente y evertidas para realizar el seguimiento macroscópico del comportamiento de los tejidos (Figura 2.1). A su vez, se pueden correlacionar los parámetros macroscópicos de evaluación con estudios histopatológicos de tomas de biopsias o de muestras de tejido obtenidas luego del sacrificio del animal.

Figura 2.1 Bolsa normal de la mejilla del hámster extendida (A), evertida para su observación (B). (C): Topicación con carcinógeno químico. (D): Ejemplo representativo de una bolsa de la mejilla del hámster con tumor exofítico (flecha) rodeado de tejido precanceroso o tejido con lesiones potencialmente malignas (PMD), inducido por el protocolo de cancerización clásico (aplicación de DMBA en aceite mineral 0,5%, 2-3 veces por semana, durante 12 semanas). Se observa un aumento en la vascularización y vasodilatación en el tejido circundante al tumor.



2.3.1 Ventajas y desventajas del modelo

Las mayores ventajas de este modelo son la similitud entre la mucosa bucal de la bolsa del hámster y la mucosa bucal humana queratinizada, la ausencia de tumores espontáneos, la susceptibilidad a productos de síntesis tales como las hormonas, micronutrientes, entre otros (Vairaktaris et al. 2008). A su vez, permite el estudio del tejido con lesiones potencialmente malignas alrededor del tumor, tejido con alta relevancia clínica dado el fenómeno de la cancerización de campo, a diferencia de aquellos modelos de implantación de células malignas en tejido normal (Trivillin et al. 2006, Monti Hughes 2012). La localización de los tumores que se desarrollan en la bolsa correlaciona con la de los fumadores de tabaco, así como también con el lugar donde la nuez de betel se mantiene por horas prolongadas (Nagini et al. 2009). A nivel molecular, el carcinoma bucal de células escamosas en humanos y en hámster también se correlacionan, caracterizándose por un aumento en la proliferación celular y reducción en la apoptosis (Nagini et al. 2009).

En cuanto a las desventajas del modelo, resulta importante destacar la labor intensiva y extensa respecto al manejo del animal y el carcinógeno. De acuerdo con el protocolo experimental estándar, el animal necesita recibir el tratamiento con DMBA varias veces, al menos 36 a 42 veces, para inducir el desarrollo tumoral (Monti Hughes 2012). Este tratamiento con el carcinógeno podría causar desórdenes hepáticos como el aumento en la oxidación de lípidos y proteínas, asociado a deficiencias en los mecanismos de defensa antioxidante, contribuyendo al desmejoramiento del animal (Letchoumy et al. 2006). Además, las alteraciones cromosómicas de los carcinomas de la bolsa de la mejilla del hámster aparentan ser diferentes a las de los carcinomas de células escamosas de la mucosa bucal humana. Por último, la mayoría de los investigadores concuerdan que los carcinomas inducidos en el modelo de cáncer de la bolsa de la mejilla del hámster usualmente no producen metástasis en los ganglios linfáticos cervicales, y las metástasis lejanas aún son más improbables, no resultando útil para el estudio de metástasis locoregionales o distantes (Chen y Lin 2010).

2.3.2 Carcinogénesis química en la bolsa de la mejilla del hámster

Los primeros ensayos experimentales de inducción química de carcinomas en la mucosa bucal no lograron inducir el desarrollo de tumores o la incidencia de desarrollo tumoral era muy baja. Esto se debía a que la mucosa bucal resulta marcadamente más resistente a las acciones de carcinógenos químicos que la piel. El éxito se alcanzó cuando las topificaciones se realizaron con hidrocarburos aromáticos policíclicos altamente carcinogénicos como el DMBA, el 20-metilcolantreno y 3,4-benzpireno (Monti Hughes 2012). Salley, en el año 1954, logró inducir neoplasmas en la bolsa de la mejilla del hámster con DMBA disuelto en acetona o éter (Salley 1954). Topicó la bolsa tres veces por semana durante 16 semanas. Este protocolo de carcinogénesis experimental fue subsecuentemente modificado y estandarizado por Morris en 1961, utilizando una solución de DMBA al 0,5% en acetona y hámsteres jóvenes (5 semanas de edad), los cuales presentaron el mayor crecimiento tumoral con la menor latencia, sin morbilidad (Morris 1961). En las células de mamíferos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos son bioactivados a través de la formación de metabolitos reactivos diol-epóxido que subsecuentemente se unen a residuos adenina y guanina en el ADN, formando aductos (Chen y Lin 2010). Estas lesiones comprometen a la célula de tres formas diferentes: primero, la falta de replicación o de reparación de estas lesiones causa mutaciones, las cuales pueden ser iniciadoras de enfermedades genéticas, incluyendo al cáncer. Segundo, compromete el programa epigenético en el ADN. Finalmente, las lesiones pueden bloquear las ARN y ADN polimerasas y llevar directamente o indirectamente a roturas en las cadenas del ADN, lo cual resulta letal en la mayoría de las células (Shrivastav et al. 2010). El desarrollo del carcinoma bucal de células escamosas ha sido caracterizado como un proceso en tres pasos: fase de iniciación, promoción y progresión. La fase de iniciación es inducida por compuestos genotóxicos y resulta de eventos mutacionales en oncogenes como en genes supresores de tumores (Vairaktaris et al. 2008). 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 et

al. 1994). En el modelo de carcinogénesis de la mucosa bucal del hámster, las etapas de iniciación, promoción y progresión no se definen claramente ya que el DMBA es un cancerígeno completo, es decir, es iniciador y promotor (Monti Hughes 2012).

En cuanto a las características macroscópicas del epitelio durante el proceso de cancerización, luego de topicar la bolsa de la mejilla del hámster durante 3-8 semanas, se observa un engrosamiento de la mucosa con una superficie rugosa de apariencia granular blanquecina. A las 10-14 semanas de topicación, se evidencia un 100% de incidencia tumoral. Microscópicamente, entre las 3 y 9 semanas de aplicación de DMBA, se observan diferentes grados de hiperqueratosis, hiperplasia en células basales, pleomorfismo celular e hiperchromatismo nuclear. En los estados finales, semanas 10 a 14 de topicación, se observan carcinomas de células escamosas exofítics y/o endofítics (Chen y Lin 2010). A medida que transcurre el proceso de carcinogénesis, aumenta la incidencia de las lesiones con mayor atipia, es decir, progresivamente, NUMF (No Unusual Microscopic Features o sin características microscópicas inusuales), hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ*, carcinomas micro-invasivos y, finalmente tumores exofítics y endofítics (Monti Hughes 2012). La **hiperplasia** conlleva un aumento en el número de células. La arquitectura muestra una estratificación regular, sin atipias celulares. La **displasia** se caracteriza por una alteración arquitectónica acompañada por atipia citológica (variaciones en el tamaño y forma celular de los queratinocitos). A su vez, se detectan mitosis superficiales anormales, queratinización prematura, e hiperchromasia. En cuanto al **carcinoma *in situ*** se diagnostica al observar la totalidad o casi totalidad del grosor del tejido con anormalidades arquitectónicas en las capas viables acompañado de una atipia celular pronunciada. Comúnmente se observan también figuras mitóticas atípicas y mitosis superficiales anormales (Warnakulasuriya et al. 2008).

Figura 2.2 Epitelio normal sin cancerizar (control). Se observan 2-3 hileras de células, con capa granulosa y capa cornea bien definidas. Tinción con Hematoxilina-Eosina. Aumento: 250X.

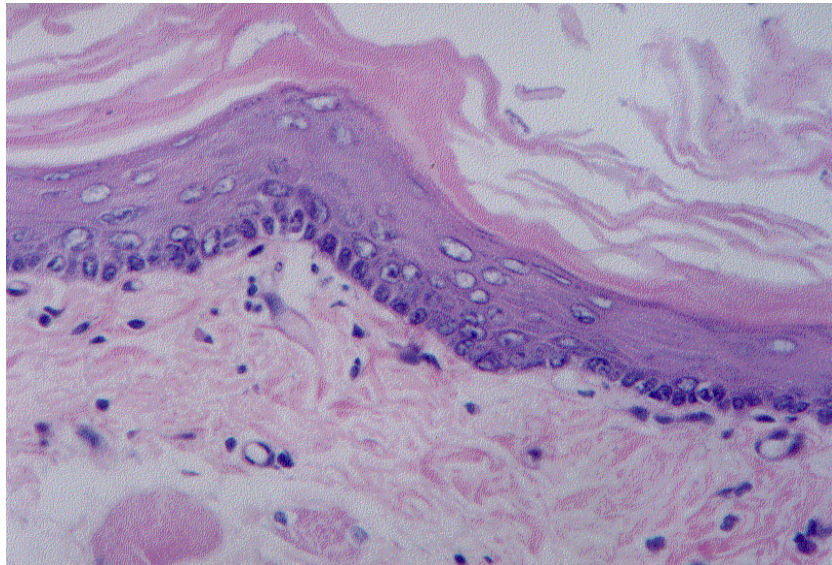


Figura 2.3 Bolsa tratada con DMBA. Se observa una hiperplasia donde las células epiteliales presentan apariencia normal pero aumentan su índice de proliferación, con lo cual aumenta el grosor epitelial. Tinción con Hematoxilina-Eosina. Aumento: 250X.

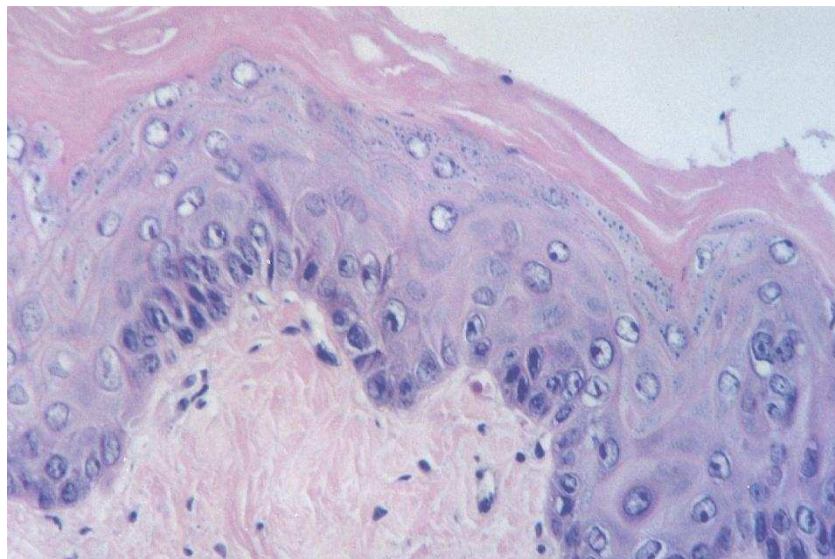


Figura 2.4 Bolsa tratada con DMBA. Se observa una displasia donde hay alteraciones celulares morfológicas y de orientación. Tinción con Hematoxilina-Eosina. Aumento: 250X.

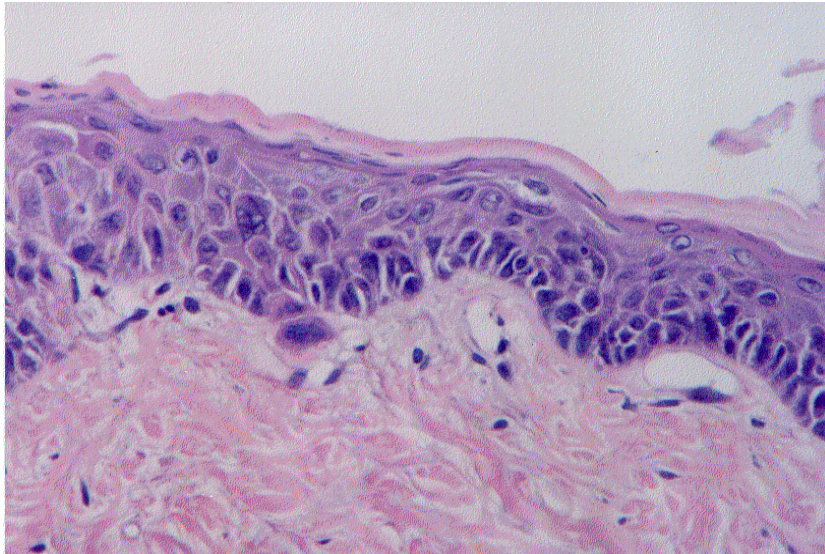
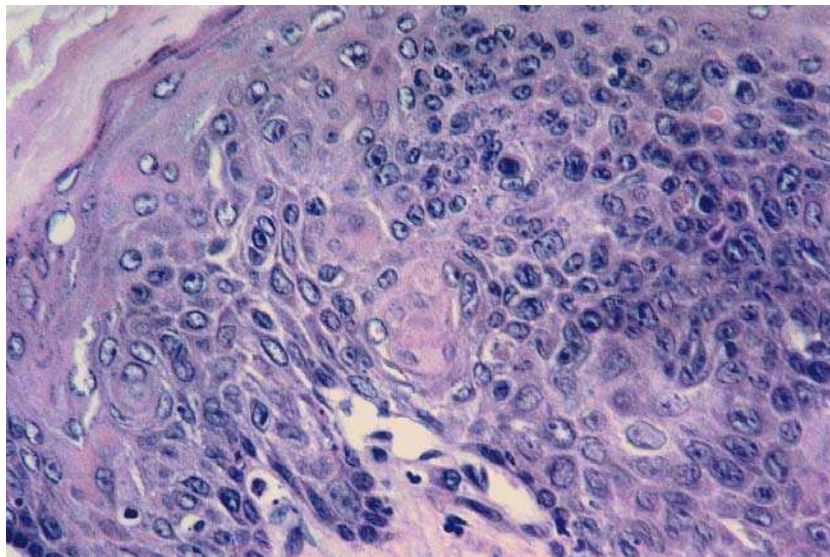


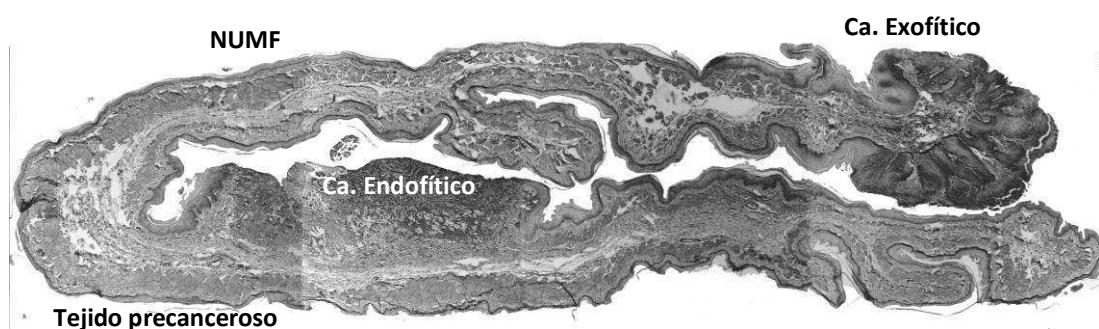
Figura 2.5 Bolsa tratada con DMBA. Se observa un carcinoma semi-diferenciado. Tinción con Hematoxilina-Eosina. Aumento: 250X.



Las distintas lesiones descritas frecuentemente coexisten en una única bolsa, es decir, no existe una correlación estrecha entre tiempo de topicación y tipo de lesión, debido a que distintos estadios (NUMF, hiperplasias, displasias y tumores (Figuras 2.2, 2.3, 2.4, 2.5)) pueden coexistir en una misma bolsa (Figura 2.6) (Monti Hughes 2012). La severidad de las lesiones aumenta con el paso del tiempo. Sin embargo, al final del proceso, los tumores coexisten con lesiones pre-neoplásicas y áreas aparentemente normales de la mucosa (NUMF). Por ejemplo, un hámster con

un carcinoma bucal de células escamosas probablemente presente displasias e hiperqueratosis en la mucosa alrededor de la lesión. A su vez, podemos encontrar más de un grado de angiogenesis en la misma bolsa simultáneamente (Feng y Wang 2006).

Figura 2.6 Microfotografía panorámica de un corte histológico de una bolsa topicada con DMBA. La bolsa fue evertida y doblada por la mitad. En ella coexisten cuadros histológicos correspondientes a los diferentes estadios del proceso de cancerización: tejido precanceroso o tejido con lesiones potencialmente malignas (PMD) (áreas de NUMF, hiperplasia, displasia), carcinomas *in situ* y carcinomas exofíticos y endofíticos.



La coexistencia de lesiones en una misma bolsa imita cercanamente el desarrollo de lesiones potencialmente malignas y malignas en la cavidad bucal humana donde a pesar que el carcinógeno es aplicado en toda la superficie mucosa, el proceso de cancerización no es uniforme pero resulta general en toda la bolsa. Este fenómeno se denomina “cancerización de campo” (Monti Hughes 2012).

2.4 Objetivos

- Hacer una evaluación dosimétrica de la facilidad de irradiación central de la columna térmica del RA-3 (FCCT) y un estudio piloto *in vivo* utilizando el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster (MCBH).
- Realizar la adaptación de la FCCT, mediante el desarrollo, construcción y caracterización de un blindaje de neutrones, para llevar adelante líneas de investigación en BNCT con el MCBH utilizando esta fuente.

- Realizar un primer estudio *in vivo* con el MCBH y el nuevo sistema de irradiación con blindaje, permitiendo la comparación con estudios anteriores utilizando otras fuentes de neutrones.

2.5 Evaluación dosimétrica de la FCCT del reactor RA-3 para realizar experimentos *in vivo*: estudio piloto en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster

2.5.1 Materiales y métodos

2.5.1.1 Caracterización del espectro de flujo neutrónico de la FCCT

Para caracterizar el espectro de flujo neutrónico del campo libre en la posición de irradiación, se realizaron mediciones de activación usando hojuelas delgadas circulares de varios materiales. Las especificaciones y las interacciones de activación neutrónica de interés correspondientes se presentan en la Tabla 2.1.

Los datos de las mediciones fueron procesados utilizando extensiones simplificadas de técnicas de activación neutrónica que han sido adaptadas por el Idaho National Laboratory (INL) para aplicaciones de BNCT a través de experiencias en otras facilidades médicas de EE.UU., Europa y Argentina (Nigg et al. 2000, Harker 1992). Los detalles precisos de estos trabajos escapan a los objetivos de esta tesis y pueden ser consultados en las referencias correspondientes. Como ayuda para la mejor comprensión, se presenta una explicación resumida del método de activación neutrónica en el ANEXO I. Las hojuelas de un diámetro estándar de 12,7 mm (0,5”) de oro (Au), cobre (Cu), tungsteno (W), manganeso-cobre (Mn-Cu) e indio (In), fueron ubicadas dentro de un contenedor circular de poli-tetrafluoretileno (PTFE, Teflon™). Se colocó una caja de cadmio (Cd) cubriendo cada una de estas hojuelas para suprimir la respuesta de activación con neutrones térmicos. Así, cada hojuela cubierta con cadmio (es decir bajo cadmio), responde a neutrones de energías cercanas a la energía de la resonancia respectiva al material de la hojuela, de acuerdo a como se muestra en la Tabla 2.1. También se dispuso una hojuela de oro sin cubierta de cadmio (desnuda) en una de las posiciones del contenedor y se

determinó la relación de cadmio para el oro (RCd^h = diferencia entre la actividad de la hojuela desnuda de Au y la actividad de la hojuela de Au cubierta por cadmio, dividida por la actividad de la hojuela de Au cubierta por cadmio). Las hojuelas tenían un espesor nominal en el rango de 0,0254 mm (0,001”) a 0,127 mm (0,005”), dependiendo del material.

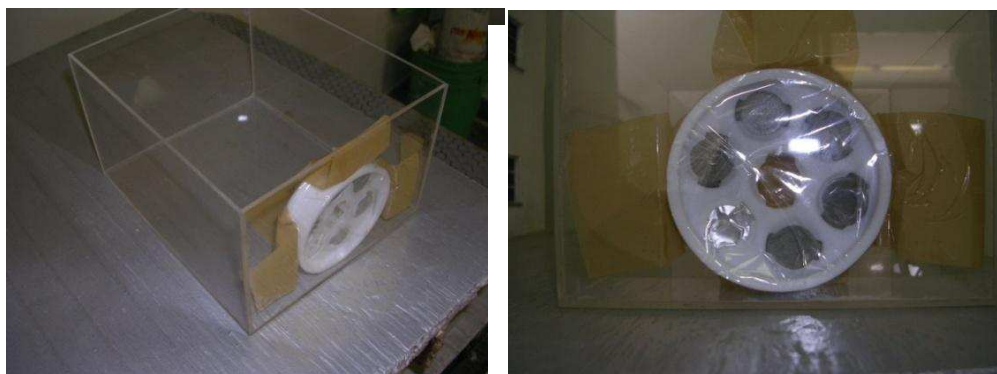
Tabla 2.1 Reacciones de activación utilizadas en las mediciones.

Interacción neutrónica	Rango de energía de la respuesta primaria	Energía de la emisión gamma de interés (keV)
^{197}Au (n, γ) hojuela desnuda	Térmico	411
^{115}In (n, γ) bajo Cd	1 eV Resonancia	1293,1097 y 416
^{197}Au (n, γ) bajo Cd	5 eV Resonancia	411
^{186}W (n, γ) bajo Cd	18 eV Resonancia	686
^{55}Mn (n, γ) bajo Cd	340 eV Resonancia	847
^{63}Cu (n, γ) bajo Cd	1 keV Resonancia	511 (Positron)
^{115}In (n,n') esfera de Boro	430 keV Umbral	336

El contenedor con las hojuelas, fue centrado dentro de una caja de acrílico porta-muestras que se ubicó en la posición de irradiación más cercana al núcleo (“a tope”) dentro de la columna térmica del RA-3, de forma que las hojuelas quedaran con una de sus caras enfrentando al núcleo del reactor. En la figura 2.7 se muestra el arreglo en que se ubicaron las folias dentro del contenedor de teflón en una caja porta-muestras de acrílico.

^h La RCd es una aproximación para evaluar la relación entre flujo térmico (Φ_t) y el flujo epitérmico (Φ_e), que estima el grado de termalización del espectro que se está estudiando.

Figura 2.7 Posición del contenedor circular de teflón en la caja porta-muestras de acrílico. La cara de la caja sobre la que se encuentra pegado el contenedor, se enfrenta al núcleo en la posición de irradiación.

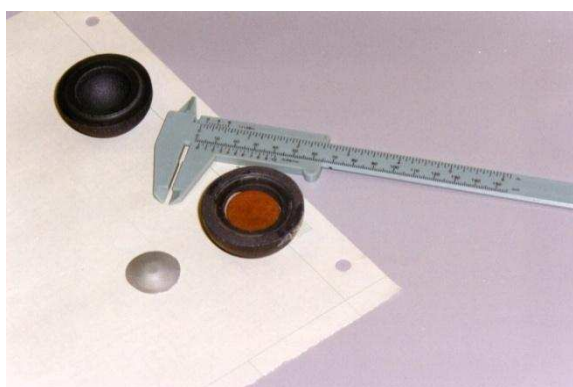


El conjunto de hojuelas fue irradiado durante 10 minutos a una potencia del reactor de 5 MW. Luego, las hojuelas fueron extraídas y las actividades fueron medidas usando una cadena convencional de espectrometría gamma asociada a un detector ORTEC HPGe a una distancia de 10 cm de la cara del detector. A partir de los resultados se estimó la actividad de saturación para cada caso (actividad de saturación = flujo x sección eficaz macroscópica, ver ANEXO I).

Para obtener información adicional sobre el espectro de neutrones rápidos, se realizó una segunda experiencia irradiando una hojuela de indio cubierta por una esfera de boro. Una hojuela de indio de 25,4 mm (1”) de diámetro, de propiedades descritas en la última línea de la Tabla 2.1, fue colocada dentro de una esfera hueca de boro (Figura 2.8). La composición de la esfera es aproximadamente 93% en peso de ^{10}B y 7% en peso de ^{11}B , con una densidad total de boro de $2,6 \text{ g/cm}^3$. El diámetro interno de la esfera de boro era aproximadamente 2,8 cm (1,1”), y el diámetro externo de la misma era aproximadamente 4,75 cm (1,9”). Esencialmente, este arreglo provee una supresión casi total del flujo térmico dentro de la cavidad interna de la esfera de boro. Como las emisiones gamma de activación provenientes de reacciones de captura en indio (con neutrones de menor energía que el corte del boro) son suprimidas, se logra favorecer el espectro de activación de la hojuela de indio con neutrones de mayor energía, es decir, se hace mucho más prominente en el espectro la línea relativamente débil de emisión gamma de 336 keV, que proviene de la dispersión inelástica en ^{115}In y es de interés crítico para esta determinación. La hojuela de indio activada es también mucho más fácil de manipular cuando se utiliza la esfera de boro de esta manera, ya que la actividad inducida es significativamente

menor que la que se obtendría sin la utilización de la esfera. El arreglo de la esfera de boro fue irradiado en forma separada de la experiencia anterior pero en la misma posición dentro de la columna térmica, y a la misma potencia del reactor. El tiempo de irradiación en este caso fue de 30 minutos a 5MW de potencia del reactor. Debido al tamaño de la hojuela, la medición de actividad en este caso particular fue corregido por el efecto de auto-blindaje en la hojuela para la emisión gamma de 336 keV (los datos de esta corrección no se describen).

Figura 2.8 Esfera de boro utilizada para suprimir el flujo neutrónico de bajas energías.



El uso de estas hojuelas de acuerdo a lo descrito, provee 7 funciones básicas de respuesta a neutrones con un grado útil de independencia. Estas funciones fueron:

- Captura en la resonancia en las hojuelas de cobre, oro, manganeso, tungsteno e indio en el contenedor de teflón, todas con la captura neutrónica térmica suprimida por cadmio (5 respuestas).
- La captura neutrónica total en una hojuela desnuda de oro en el mismo contenedor de teflón (1 respuesta).
- La dispersión inelástica en la hojuela de indio dentro de la esfera de boro (1 respuesta).

Estas mismas experiencias fueron realizadas anteriormente para caracterizar la facilidad de irradiación de la columna térmica del reactor RA-1 y una primera configuración del haz del RA-6 (Nigg et al. 2001, 2004).

2.5.1.2 Distribución de flujo dentro del cuerpo del animal

Para estimar la uniformidad espacial de la distribución de flujo de neutrones en varios puntos en la superficie y dentro del cuerpo de un hámster, se realizaron mediciones utilizando un fantoma de acrílico que fuera utilizado anteriormente para mediciones similares en el RA-1. El mismo está preparado con diferentes posiciones fijas (por fuera y por dentro), para colocar alambres de oro/cobre de aproximadamente 8 mm de largo y 1 mm de espesor (Figura 2.9). Se colocaron 12 alambres en las diferentes ubicaciones especificadas en la Tabla 2.6, (ver sección resultados). Cada alambre de aproximadamente 70 mg está compuesto de cobre aleado con 1,55 % en peso de oro. Estas mediciones se basan en la activación del oro y cobre que componen los alambres que provee dos repuestas linealmente independientes (absorción neutrónica en Cu-63 y Au-197). En la Tabla 2.2 se muestran las características relevantes de estos materiales en lo que refiere a la técnica.

Tabla 2.2 Características relevantes de los alambres de oro-cobre utilizados como detectores de activación.

Isótopo del elemento (abundancia natural)	Interacción neutrónica	Sección eficaz microscópica de activación	Producto de la reacción	$T_{1/2}$	Energía de la emisión gamma de interés (keV)
^{197}Au (100%)	(n, γ)	98,5 barns	^{198}Au	2,695 d	411
^{63}Cu (69.17%)	(n, γ)	4,5 barns	^{64}Cu	12,7 h	511 (positrón)

El fantoma de hámster instrumentado con los alambres fue ubicado dentro de una caja porta-muestras de acrílico, usada previamente en las experiencias con hojuelas, e irradiada en la misma posición dentro de la columna térmica durante 10 minutos a 5 MW de potencia del reactor. Luego se extrajeron los alambres y las actividades fueron medidas usando la misma cadena de espectrometría que la empleada con las hojuelas a una distancia de 10 cm de la cara del detector. A partir de las mediciones se calcularon las actividades de saturación para cada caso.

Figura 2.9 Fantoma de acrílico que simula un hámster. El acrílico, (Polimetilmetacrilato, $((C_5O_2H_8)_n)$) es un material que sirve para representar tejidos debido a que posee una composición similar de hidrógeno (8% p/p en acrílico, aproximadamente 10% p/p en músculo y piel, 11,1% p/p en agua), principal elemento que perturba el flujo neutrónico. A su vez, no contiene otros elementos contaminantes que puedan generar radionucleídos por activación. En ciertos casos es relevante considerar la diferencia de densidad que posee el material con respecto al tejido que se quiera simular.



2.5.1.3 Análisis por activación neutrónica

La actividad de los materiales irradiados fue medida usando una cadena convencional de espectrometría gamma asociada a un detector semiconductor ORTEC HPGe GMX10P4. La cadena de medición fue calibrada en energía y eficiencia para cada distancia empleada, utilizando una fuente puntual de Eu-152, con certificado de calibración #76044A-440 de Eckert & Ziegler Analytics que mantiene trazabilidad al NIST. Para la calibración se consideraron los fotones gamma con probabilidad de emisión mayor al 5% y se adoptaron siempre distancias de al menos 7 veces el tamaño de las muestras, de modo tal de que sea válido asumir una geometría de fuente puntual.

Los datos fueron procesados según la técnica de activación neutrónica convencional y se obtuvo el valor del producto entre el flujo neutrónico y la sección eficaz para cada material ($\sigma \phi = \text{SigFi}$). La incerteza total del método empleado es del 6%, sin tener en cuenta el error de posicionamiento de los detectores (hojuelas y alambres).

A los fines de esta caracterización solo se compararon los valores de SigFi en forma relativa para los diferentes puntos de medición (ver ANEXO I). La ventaja de usar los valores de SigFi es que fácilmente se puede obtener una estimación del

flujo considerando las secciones eficaces adecuadas para cada material (por ejemplo, considerando la sección eficaz del oro o del cobre de la Tabla 2.2).

2.5.1.4 Medición de tasa de dosis gamma

Como supuesto general se consideró que todo el cuerpo del animal, en particular la bolsa cancerizada evertida, se expone a la misma tasa de dosis gamma.

Para la caracterización de tasa de dosis gamma se utilizó una cámara de ionización (CI) Far West Technology de grafito modelo IC-18G de volumen sensible de aire de aproximadamente $0,1 \text{ cm}^3$ y sensibilidad de $(1,46 \pm 0,17) \cdot 10^{-12} \text{ [A/Gy/h]}$ calibrada con fuente de ^{60}Co . La cámara se polarizó con una fuente de tensión de baterías de 288 V y para medir la corriente entregada por la misma se utilizó un electrómetro marca Keithley modelo 6517A. De manera de descontar la contribución producida por las reacciones con neutrones, en especial la reacción $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$, la zona sensible de la cámara de ionización se cubrió con un blindaje de ^6LiF (95% enriquecido en Li-6).

Se realizaron mediciones en una misma posición de irradiación con dos condiciones diferentes, solo con la CI dentro de una caja de acrílico porta muestras, y utilizando un cilindro de acrílico recubriendo la CI, para simular la presencia de un animal y así considerar el aporte adicional a la dosis gamma asociado con la captura de neutrones térmicos por el hidrógeno presente en el cuerpo del mismo. Luego, a partir de la medición con y sin cilindro de acrílico, se obtuvo un factor de corrección para considerar el aumento de dosis debido a la captura del hidrógeno presente en el cuerpo del animal.

2.5.1.5 Inducción de tumores en el MCBH

La inducción de tumores en la bolsa derecha de la mejilla de hamsters Syrian (*Mesocricetus auratus*) jóvenes (6-8 semanas), se realizó aplicando por topicación 0,1 ml del carcinógeno químico dimetilbenzantraceno (DMBA) 0,5 % en aceite mineral 2 veces por semana durante 12 semanas según una modificación del protocolo estándar de carcinogénesis (Shklar 1979). Las topicaciones se realizaron con una jeringa descartable sin aguja, sin necesidad de anestésiar los animales (Figura 2.1).

Finalizado el protocolo, la bolsa tratada fue revisada periódicamente bajo anestesia suave con ketamina (70 mg/kg de masa corporal (m.c.)) y xilazina (10,5 mg/kg m.c.), suministrada en forma intraperitoneal (i.p.), con el fin monitorear el desarrollo de los tumores. Una vez que se desarrollaron los tumores exofíticos (carcinomas de células escamosas), los animales fueron usados para estudios.

2.5.1.6 Manejo de los animales

Los animales fueron mantenidos en cajas con tapa de alambre, con cama de viruta de pino, en grupos de no más de 5 animales del mismo sexo. El alimento balanceado en forma de pellets y el agua fueron entregados ad libitum. Los animales fueron mantenidos con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

Finalizados los tratamientos experimentales, los animales fueron eutanasiados por decapitación bajo sobredosis de anestesia administrada en forma i.p. (ketamina (140 mg/kg m.c.) y xilazina (21 mg/kg m.c.)). Todos los experimentos se realizaron siguiendo normas de la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 1996).

2.5.1.7 Preparación de compuestos borados

Para preparar la solución de BPA se utilizó la p-borofenilalanina (BPA; L-enantiómero, > 98 % enriquecida en ^{10}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 preparó una solución del complejo BPA-fructosa (BPA-F) a una concentración 0,14 M. 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 1989, LaHann 1993). Esta solución fue esterilizada por filtración en un filtro de 0,22 μm de poro (Nalge Company, Rochester, N.Y.) y almacenada a 4 °C hasta su utilización.

2.5.1.8 Estudio piloto de BPA-BNCT in vivo

Se seleccionaron 3 animales portadores de 11 tumores en total, conociendo la ubicación y tamaño de cada uno de los mismos. Los animales fueron ubicados bajo anestesia con ketamina (140 mg/kg m.c.) y xilazina (21 mg/kg m.c.), en una camilla de acrílico dentro de una caja del mismo material con la bolsa derecha (cancerizada) evertida para lograr una mayor exposición (Figura 2.10), y fueron irradiados individualmente en la FCCT del reactor RA-3 en la posición a 70 cm del tope, 3 horas después de la administración intraperitoneal (i.p.) del BPA a una concentración de 300 mg de compuesto por kilogramo de masa corporal (14,1 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$ m.c.) (Kreimann et al. 2001a).

Figura 2.10 Hámster cancerizado posicionado para la irradiación. Derecha: el contenedor de acrílico que contiene la camilla se encuentra listo para ser ubicado dentro de la cavidad porta-muestras de la FCCT. Izquierda: Se puede observar con mayor detalle la ubicación de la bolsa cancerizada con un tumor, pegada sobre una de las caras del contenedor de acrílico (que se ubica más cerca del núcleo del reactor en la posición de irradiación).



2.5.1.9 Prescripción y cálculo de dosis

Se tomaron como referencia los valores de fluencia y dosis absorbidas correspondientes a los estudios previos realizados en este modelo en el Reactor Nuclear RA-6 (CAB) (Tabla 2.3; Kreimann et al. 2001b). Las irradiaciones duraron 20 minutos cada una bajo flujo de neutrones térmicos de $(8,3 \pm 0,6) 10^8 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La duración de la irradiación fue calculada para alcanzar aproximadamente una fluencia de $1,1 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2}$ en la bolsa con tumores a tratar, con el fin de alcanzar una dosis terapéuticamente útil sin exceder el límite de radiotolerancia de los tejidos limitantes

de dosis. Se tuvo en cuenta la situación de compromiso al tratarse de una irradiación de cuerpo entero (condición diferente al caso de una irradiación en un haz como el del RA-6), intentando no superar significativamente las dosis absorbidas totales empleadas previamente en el RA-6 y, en particular, no exceder la componente de dosis boro, asociada con una mayor probabilidad de daño por tratarse de radiación de alto LET.

Tabla 2.3 Dosis Absorbidas [Gy], descritas en Kreimann et al. 2001b, para el haz del RA-6. Tratamiento con BNCT mediado por BPA (14,1 mg B/kg m.c.), 62 min de tiempo de irradiación, fluencia $1,1 \times 10^{12}$ n cm⁻². Los valores se expresan como media \pm DS.

Tejido	Dosis neutrones rápidos	Dosis gamma	Dosis boro	Captura (¹⁴ N)	Dosis total
Tumor ^a	1,02 \pm 0,08	1,40 \pm 0,06	2,5 \pm 0,3	0,22 \pm 0,02	5,2 \pm 0,3
Bolsa Normal ^b	1,02 \pm 0,08	1,40 \pm 0,06	0,84 \pm 0,08	0,22 \pm 0,02	3,5 \pm 0,1
Cabeza ^b	0,72 \pm 0,06	0,95 \pm 0,04	0,61 \pm 0,06	0,15 \pm 0,02	2,4 \pm 0,1
Cuerpo ^b	0,41 \pm 0,03	0,50 \pm 0,02	0,31 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01	1,30 \pm 0,05

^a considerando una [¹⁰B] de 30ppm

^b considerando una [¹⁰B] de 10ppm

Los valores de contenido de boro utilizados en el cálculo de dosis y el tiempo post-administración para la irradiación, se basaron en los estudios anteriores en este modelo (Kreimann et. al. 2001a, Trivillin 2007). En la Tabla 2.4 se presentan los valores de concentración de boro considerados para realizar la prescripción de dosis. En particular, a los fines de poder realizar comparaciones con los estudios anteriores, se seleccionaron valores conservativos de 30 ± 15 ppm de boro para el tejido tumoral y 15 ± 5 ppm para el tejido normal.

Para el cálculo de dosis absorbida en cualquier punto y/o tejido en este trabajo se tuvieron en cuenta las cuatro componentes típicas que se distinguen en BNCT y que se describieron previamente: dosis gamma, D_γ ; dosis de protones de la reacción de captura con nitrógeno, D_N ; dosis de neutrones rápidos, D_F ; y dosis boro, D_B . La suma de éstas cuatro componentes corresponde a la dosis total absorbida

que se reporta. Las consideraciones particulares que se tuvieron en cuenta para el cálculo de cada componente se describen a continuación.

Tabla 2.4 Concentración de boro en diferentes tejidos 3,5 hs luego de la administración en forma intraperitoneal (i.p.) de BPA (14.1 mg B/ kg de masa corporal (m.c.)). Datos obtenidos de estudios de biodistribución anteriores en el MCBH (Trivillin 2007). Los valores se expresan como media \pm DS.

Tejidos	BPA i.p. (14,1 mg ¹⁰B kg m.c.)
<i>Sangre</i>	11,5 \pm 4,1
<i>Tumor</i>	33,3 \pm 17,4
<i>Tejido precanceroso</i>	19,6 \pm 5,8
<i>Bolsa normal</i>	14,4 \pm 4,9
<i>Mucosa de carrillo</i>	18,2 \pm 8,9
<i>Piel</i>	14,2 \pm 8,3
<i>Mucosa de paladar</i>	13,0 \pm 4,3
<i>Lengua</i>	14,1 \pm 6,9
<i>Glándula parótida</i>	4,3 \pm 2,8
<i>Hígado</i>	11,4 \pm 4,5
<i>Bazo</i>	12,9 \pm 6,3
<i>Pulmón</i>	6,2 \pm 2,6
<i>Cerebro</i>	6,1 \pm 2,0
<i>Médula espinal</i>	1,6 \pm 1,3

2.5.1.9.1 Medición de flujo para las experiencias de BNCT *in vivo*

Las mediciones con hojuelas y alambres utilizadas para la caracterización del campo de radiación proveen resultados diferidos. Con el fin de medir el flujo térmico on-line para las experiencias de BNCT *in vivo*, se realizó una medición previa el día de irradiación de los animales con un detector de tipo autoenergizado (SPND, Self Powered Neutron Detector) de rodio (Rh) de 10 mm de longitud sensible, modelo

CNEA SPND Rh-10 (Miller et al. 2004)ⁱ, asociado con un electrómetro Keithley Modelo 6514. El valor de sensibilidad del detector utilizado fue $S = (1,98 \pm 0,16) 10^{-21}$ A/nv.

El valor de flujo térmico medido en la posición de irradiación con el SPND, se utilizó para realizar los cálculos de las componentes de dosis correspondientes.

2.5.1.9.2 Dosis gamma, D_γ

El cálculo de la tasa de dosis en cualquier punto (tejido) (D_γ) se realizó de la siguiente manera:

$$D = \dot{D}_\gamma \times t \times f_c$$

Donde \dot{D}_γ es la tasa de dosis medida previamente en aire con la CI en la posición de irradiación; t es el tiempo de irradiación; y f_c es un factor de corrección que tiene en cuenta el aumento de dosis por la presencia del cuerpo del animal y posibles variaciones de potencia del reactor del día de la experiencia con respecto al día de medición de la tasa de dosis gamma^j.

ⁱCuando el detector SPND de rodio es expuesto a neutrones térmicos, permite medir una corriente proporcional al flujo neutrónico luego de un tiempo mínimo de medición de 20 minutos. Este tiempo está asociado con el principio de funcionamiento del detector ya que las cargas que se generan provienen de la activación y decaimiento del rodio, el material sensible del detector. Mediante una calibración previa contra un método de medición absoluto (por ejemplo, medición por activación de hojuelas) se obtiene un factor de sensibilidad que permite traducir la corriente medida al valor de flujo al que se expuso el SPND. Comparado con el método de medición de hojuelas, el SPND permite obtener una medición de flujo en el punto de interés en corto tiempo y con un procesamiento de datos muy sencillo. A su vez, el SPND no requiere de alimentación eléctrica para su funcionamiento y su tamaño es muy pequeño, permitiendo medir en espacios reducidos sin afectar significativamente al sistema. Estos detectores fueron diseñados para realizar mediciones de flujo en la superficie expuesta de pacientes sometidos a tratamientos de BNCT en Argentina (Miller et al. 2004).

^j La contribución a la dosis por la presencia del cuerpo del animal se obtuvo de medir la tasa de dosis gamma con la CI en una misma posición con y sin la presencia de un fantoma de acrílico (ver 2.5.1.4 *Medición de tasa de dosis gamma gamma*). La corrección por variaciones de potencia se realiza a partir de la medición de flujo neutrónico con SPND en el día de la experiencia con respecto a una similar el día de medición con la CI. El factor f_c surge de la combinación de ambos ajustes.

2.5.1.9.3 Dosis de neutrones rápidos, D_n

Para el caso particular de una irradiación en la FCCT del RA-3, la caracterización previa del espectro del flujo neutrónico demostró que el flujo de neutrones rápidos es al menos tres órdenes menor con respecto al flujo térmico debido a la alta termalización que se logra en la columna térmica (Miller et al. 2009). Esto se refleja en los resultados de caracterización que se reportan más adelante en este mismo trabajo. Por lo tanto, la componente de dosis asociada con neutrones rápidos es despreciable frente al resto de las componentes y no se tuvo en cuenta en el cálculo final de dosis. A los fines comparativos en la discusión final de este capítulo, se reporta un valor aproximado para esta componente considerada a partir del modelado computacional de la fuente.

2.5.1.9.4 Dosis de protones de la reacción de captura con nitrógeno, D_N

La dosis debida a la reacción de captura $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$ surge de considerar la energía liberada en la misma y el número de reacciones que ocurren.

Para el cálculo de la dosis absorbida, también descrita en la literatura como *dosis física* (es decir, no pesada con el RBE), usualmente se aplica un **factor kerma, K_N** , que sirve para convertir la fluencia de neutrones a dosis absorbida^k.

El factor K_N se obtuvo a partir de los valores de kerma reportados en el Comisión Internacional de Unidades de Radiación (ICRU, International Commission on Radiation Units) en el reporte ICRU-63, promediando en forma ponderada según una distribución *Maxwell-Boltzmann* de energía de neutrones térmicos y considerando la concentración de ^{14}N para el tejido muscular adulto reportada en el ICRU-46 (3,4 % de N en peso). El valor obtenido fue corregido para una temperatura de 38°C, medida en la FCCT en experiencias previas (Crawley y Gadan 2007).

El cálculo final de esta componente de dosis se realizó de la siguiente forma:

$$D_N = K_N \times \text{flujo de neutrones} \times t$$

^k Los factores kerma de neutrones o fotones son factores que dependen de la energía, utilizados para convertir la fluencia de neutrones o fotones a *kerma* (kinetic energy released per unit mass) que, bajo ciertas condiciones (por ejemplo, existencia de equilibrio electrónico) aproxima a la dosis absorbida (Goorley et al. 2002).

donde el *flujo de neutrones* surge de la medición con SPND previamente a cada experiencia y t es el tiempo de irradiación. El valor de K_N utilizado fue **2.1 E-13 Gy cm²** (similar al valor que fuera utilizado en los cálculos de dosis de las experiencias previas realizadas por nuestro grupo en el RA-6 (2 E-13 Gy cm²)).

2.5.1.9.5 Dosis boro, D_B

Para el cálculo de dosis boro se aplicó un **factor kerma, K_B** , el cual, multiplicado por la *fluencia de neutrones* (flujo de neutrones x tiempo) y la concentración de boro en el tejido, da la dosis absorbida asociada con la reacción de boro-10:

$$D_B = K_B \times \text{fluencia de neutrones} \times [^{10}\text{B}]$$

El factor K_B se obtuvo a partir de los valores de kerma reportados en el reporte ICRU-63, promediando en forma ponderada según una distribución *Maxwell-Boltzmann* de energía de neutrones térmicos. El valor de K_B obtenido corregido por una temperatura de 38°C, fue **7,45 E-14 Gy cm² ppm**. Este factor es muy parecido al que fuera utilizado en los cálculos de dosis de las experiencias realizadas en el RA-6 (7,64 E-14 Gy cm²).

Los valores de concentración de boro considerados para el cálculo de dosis absorbida en cada tejido fueron los que se reportan en la Tabla 2.4.

2.5.1.10 Evaluación de la respuesta tumoral

La respuesta del tumor, del tejido precanceroso y del tejido normal fue evaluada por inspección visual y medición del volumen tumoral a los 1, 7, 14, 21 y 28 días post-irradiación. El volumen tumoral se calculó como el producto de los 3 diámetros ortogonales mayores (ancho*largo*alto), y se expresó en mm³. La remisión parcial fue definida como la reducción del volumen tumoral respecto del volumen tumoral inicial (pre-irradiación). La remisión completa fue definida como la desaparición del tumor en la inspección visual. La suma de la remisión parcial y completa se evaluó como “control tumoral” y el crecimiento del tumor fue interpretado como “sin control tumoral”. El peso corporal y el estado clínico de los animales fueron monitoreados periódicamente después de todos los protocolos de irradiación.

Los resultados de este ensayo preliminar fueron contrastados con los resultados de ensayos previos realizados en el RA-6 con BNCT mediado por BPA.

2.5.2 Resultados y Discusión

La Tabla 2.5 muestra la actividad de saturación para las diferentes hojuelas irradiadas en la primera experiencia de caracterización.

Tabla 2.5 Actividades de saturación por átomo de las hojuelas utilizadas en las experiencias de activación en la FCCT del RA-3. Irradiación en campo libre durante 10 minutos a 5MW de potencia del reactor. Las incertezas estadísticas de medición son aproximadamente de $\pm 10\%$ o menos a un nivel de 1σ .

Tipo de interacción	Actividad de saturación por átomo [s^{-1}]
^{197}Au (n, γ) desnuda	$2,59 \times 10^{-13}$
^{115}In (n, γ) bajo Cd	$9,75 \times 10^{-16}$
^{197}Au (n, γ) bajo Cd	$1,90 \times 10^{-16}$
^{186}W (n, γ) bajo Cd	*
^{55}Mn (n, γ) bajo Cd	*
^{63}Cu (n, γ) bajo Cd	*
$^{115}\text{In}(n,n')$	$6,71 \times 10^{-20}$
Diferencia Au-197 (n, γ)**	$2,59 \times 10^{-13}$

* Por debajo del límite de detección

** Diferencia entre la actividad de la hojuela desnuda de Au y la actividad de la hojuela de Au cubierta por cadmio.

Según estos resultados, comparando las actividades de saturación para la hojuela de oro desnuda y bajo cadmio, se obtuvo una relación de cadmio para el oro (RCd) igual a 1363, verificando una alta termalización del espectro dentro de la columna térmica del reactor. Sin embargo, el valor obtenido fue tomado con cierta reserva debido a que el valor de la hojuela bajo cadmio corresponde a una medición muy corta y, por lo tanto, con muy bajo número de cuentas en el pico de interés¹. En experiencias posteriores se repitieron las mediciones obteniendo datos más confiables que demuestran una RCd de aproximadamente 4100 (Pozzi et al. 2007,

¹ Esto hace que el error estadístico sea muy alto para una determinación correcta, ya que el error estadístico de la medición es la raíz cuadrada del número de cuentas.

Miller et al. 2009). La alta termalización se verifica también por la baja actividad de saturación de las hojuelas de indio, cobre, manganeso y tungsteno bajo cadmio; y la hojuela de indio dentro de la esfera de boro, todas con respuestas a mayores energías del espectro neutrónico.

En la Tabla 2.6, se muestran los valores de actividad de saturación obtenidos para cada alambre de cobre/oro luego de la irradiación del fantoma de acrílico. En particular, también se detalla el porcentaje que representa cada dato comparado en forma relativa al valor máximo obtenido de todos los alambres. Los valores máximos para el oro y el cobre, se correspondieron con los alambres ubicados en la posición correspondiente a la piel de la mejilla lado contra-lateral (opuesta al lado donde se ubica la bolsa cancerizada) y la bolsa contra-lateral, respectivamente. Ambas posiciones se encuentran en la cabeza, cuya ubicación es más cercana a la fuente de radiación (núcleo), con lo cual es esperable encontrar los valores máximos en alguno de los alambres ubicados en esa parte del cuerpo del animal. Posiciones más lejanas a la cabeza muestran valores relativos más bajos, disminución esperable en función del aumento de distancia a la fuente. Sin embargo, como se puede observar, el flujo de neutrones en el fantoma es espacialmente uniforme, siendo de +/- 15% con respecto al promedio en todo el cuerpo; y en la zona de la cabeza esta variación total de flujo se reduce a menos de +/- 10%.

La actividad de saturación para el oro en los alambres, fue consistente con la actividad correspondiente a la hojuela del mismo material, sin tener en cuenta las diferencias en la auto-atenuación de las diferentes geometrías.

La tasa de dosis gamma medida en la posición de irradiación sin muestra fue de $0,65 \pm 0,08$ Gy/h. Por medio de las mediciones previas realizadas con y sin cilindro de acrílico rodeando la CI, se estimó que, debido a la contribución por exposición del cuerpo del animal al flujo de neutrones, la tasa de dosis gamma se incrementa 1,78 veces, lo que implica una tasa de dosis gamma en la posición de irradiación en presencia del animal de $1,15 \pm 0,14$ Gy/h.

Tabla 2.6 Actividades de saturación obtenidas a partir de los alambres utilizados en la experiencia de medición por activación con el fantoma de hámster de acrílico. Las incertezas estimadas al nivel de 1σ fueron aproximadamente del 6%.

Posición alambre en el fantoma	Ubicación / Tejido	Au sin blindaje		Cu sin blindaje	
		Actividad de saturación por átomo [s^{-1}]	% del valor máximo	Actividad de saturación por átomo [s^{-1}]	% del valor máximo
1	Bolsa lado cancerizado	$2,94 \times 10^{-13}$	93,6	$1,46 \times 10^{-14}$	100
2	Cerebro	$2,87 \times 10^{-13}$	91,4	$1,32 \times 10^{-14}$	90,4
3	Pulmón	$2,63 \times 10^{-13}$	83,8	$1,19 \times 10^{-14}$	81,5
4	Hígado	$2,58 \times 10^{-13}$	82,2	$1,11 \times 10^{-14}$	76,0
5	Bolsa lado contralateral	$2,99 \times 10^{-13}$	95,2	$1,46 \times 10^{-14}$	100
6	Piel mejilla lado cancerizado	$3,12 \times 10^{-13}$	99,4	$1,40 \times 10^{-14}$	95,9
7	Piel cuello	$3,04 \times 10^{-13}$	96,8	$1,32 \times 10^{-14}$	90,4
8	Piel abdomen	$2,61 \times 10^{-13}$	83,1	$1,27 \times 10^{-14}$	87,0
9	Piel cadera	$2,33 \times 10^{-13}$	74,2	$1,10 \times 10^{-14}$	75,3
10	Piel dorso	$2,53 \times 10^{-13}$	80,6	$1,17 \times 10^{-14}$	80,1
11	Piel mejilla lado contralateral	$3,14 \times 10^{-13}$	100	$1,42 \times 10^{-14}$	97,3
12	Piel abdomen	$2,88 \times 10^{-13}$	91,7	$1,18 \times 10^{-14}$	80,8
Promedio posiciones cabeza		$3,01 \times 10^{-13}$	95,9	$1,41 \times 10^{-14}$	96,7
Promedio posiciones cuerpo		$2,66 \times 10^{-13}$	84,6	$1,19 \times 10^{-14}$	81,6

Las dosis absorbidas, estimadas para las diferentes componentes de radiación para la bolsa con tumor, la bolsa normal y para el resto del cuerpo sin blindaje se presentan en la Tabla 2.7. Debido a un ajuste sobre el factor de

sensibilidad del detector SPND utilizado para medir el flujo, que se realizó con posterioridad a las experiencias de irradiación de animales del presente estudio, la fluencia real en la bolsa cancerizada se re-calculó en forma retrospectiva y fue un 16% mayor a la prescrita originalmente. El flujo medido en la posición de la bolsa fue $9,3 \cdot 10^8 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los valores de flujo en cada posición del cuerpo fueron calculados a partir del valor de flujo medido en la posición de la bolsa el día de irradiación, ajustado de acuerdo a los resultados de la experiencia con el fantoma de acrílico instrumentado con alambres. Se utilizaron como factores de ajuste los porcentajes que se obtuvieron a partir de la actividad de saturación medida en cada posición con respecto a la posición de la bolsa cancerizada (% del valor máximo, Tabla 2.6).

Tabla 2.7 Dosis absorbidas [Gy], estimadas para las irradiaciones realizadas en el presente estudio en la facilidad del RA-3. Como se mencionó anteriormente, los valores de la componente de dosis asociada con neutrones rápidos es despreciable frente a las otras componentes de dosis y no se reportan en la tabla.

Tejido	Dosis gamma	Dosis boro	Captura (^{14}N)	Dosis total [Gy]
Tumor ^a	$0,48 \pm 0,09$	$2,5 \pm 1,3$	$0,23 \pm 0,02$	$3,2 \pm 1,3$
Bolsa Normal ^b	$0,48 \pm 0,09$	$0,8 \pm 0,3$	$0,23 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,3$
Piel cabeza	$0,48 \pm 0,09$	$1,1 \pm 0,7$	$0,24 \pm 0,03$	$1,8 \pm 0,7$
Piel abdomen	$0,48 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,6$	$0,20 \pm 0,03$	$1,7 \pm 0,6$
Piel dorso	$0,48 \pm 0,09$	$0,9 \pm 0,6$	$0,19 \pm 0,03$	$1,6 \pm 0,6$
Piel cadera	$0,48 \pm 0,09$	$0,9 \pm 0,5$	$0,17 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,5$
Hígado	$0,48 \pm 0,09$	$0,7 \pm 0,3$	$0,18 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,3$
Pulmón	$0,48 \pm 0,09$	$0,4 \pm 0,2$	$0,19 \pm 0,03$	$1,1 \pm 0,2$
Sangre ^c	$0,48 \pm 0,09$	$0,8 \pm 0,3$	$0,21 \pm 0,03$	$1,5 \pm 0,3$

^a considerando una $[^{10}\text{B}]$ de 30ppm (similar a lo reportado por Kreimann et al. 2001b).

^b considerando una $[^{10}\text{B}]$ de 10ppm (similar a lo reportado por Kreimann et al. 2001b).

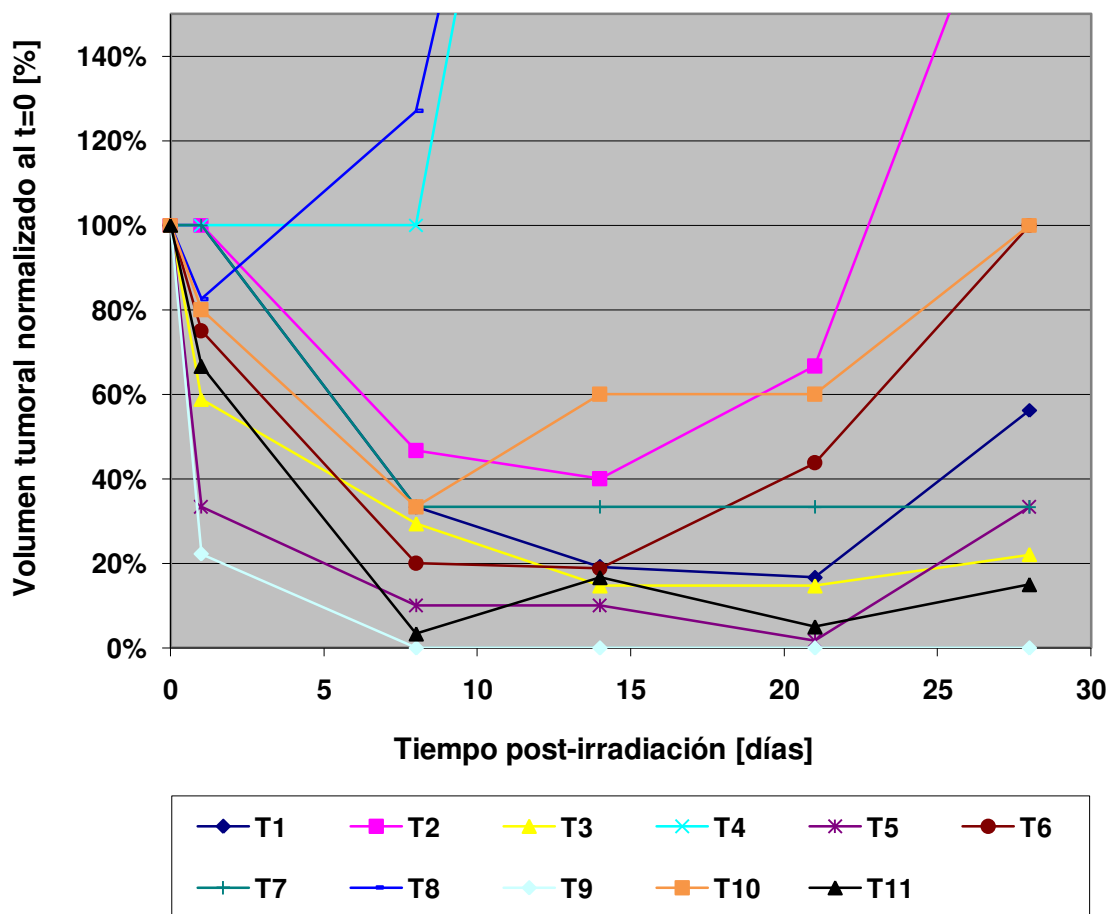
^c considerando la $[^{10}\text{B}]$ en sangre y el cálculo del flujo promedio en el cuerpo a partir de la experiencia del fantoma instrumentado con alambres.

En la Figura 2.11 se muestra la respuesta tumoral al BNCT mediada por BPA a la dosis empleada, usando como parámetro de evaluación la evolución post-tratamiento del volumen del tumor, normalizado con respecto al volumen inicial

(previo a ser irradiado). Del total de 11 tumores tratados, a los 28 días post-irradiación se observó remisión completa en un solo tumor (9 %) y regresión parcial en 8 casos (46 %). Sumando los dos efectos evaluamos un control tumoral cercano al 55 %, mientras que en el resto (45 %) de los tumores se observó un incremento final del volumen a los 28 días de haber recibido la terapia. Sin embargo, solo se observó un crecimiento continuo en 2 casos (18 %) durante todo el período de seguimiento, mientras que 8 tumores (82 %) mostraron una disminución en su tamaño hasta los primeros 14 a 21 días post irradiación.

Ninguno de los animales tratados con BNCT-BPA mostró signos aparentes de radiotoxicidad a nivel clínico (comportamiento anormal, diarrea o vómitos, falta de apetito, etc.) o alteraciones en la ganancia de peso corporal. No se observó un grado de mucosistis significativo en ninguna de las bolsas irradiadas.

Figura 2.11 Respuesta al BNCT mediado por BPA, como función del tiempo post-irradiación. Se representa, para los 11 tumores irradiados, la evolución del volumen tumoral normalizado al momento previo a la irradiación (t=0).



2.5.3 Discusión

Comparando con el estudio previo para este mismo protocolo (BPA-BNCT 14,1 mg B/ kg de m.c.) realizado en el RA-6, en líneas generales se puede observar que en la posición de la bolsa del hámster cancerizada, se aplicó la misma fluencia de neutrones térmicos. Esto implica que se suministró igual dosis de protones derivada de la reacción de captura en nitrógeno y, asumiendo la misma concentración de boro en el tumor, tejido precanceroso y normal, se suministró la misma dosis boro en estos tejidos. Las principales diferencias se observan en una menor dosis gamma (menos de la mitad) y la ausencia de la componente de neutrones rápidos. En conjunto, esto se traduce en una dosis absorbida menor, de alrededor del 60% de la dosis reportada en el ensayo realizado en el RA-6. Dado el mayor flujo de neutrones térmicos en el RA-3, el tiempo de irradiación para suministrar la misma fluencia de neutrones que en el RA-6 fue menor.

En relación a los valores de dosis absorbida que recibió el cuerpo del animal, comparando la Tabla 2.3 y la Tabla 2.7 se puede observar que se alcanzaron o superaron levemente las dosis absorbidas totales correspondientes al RA-6. Esto se debe a que en el RA-6, el cuerpo no se expone al haz, quedando detrás de un blindaje (Trivillin 2007). La exposición del cuerpo entero al flujo de neutrones térmico en el RA-3 hace que los diferentes órganos reciban proporcionalmente una componente dosis boro y de protones mayor, incluso casi duplicando estas componentes de dosis para algunas partes de la piel y otras posiciones del cuerpo. Vale la pena destacar que son justamente estas componentes las que producirían mayor daño por tratarse de radiación de alto LET. Sin embargo, ninguno de los animales tratados con BPA-BNCT mostró signos aparentes de radiotoxicidad a nivel clínico, lo que demuestra que a estos niveles de dosis y en este modelo experimental, la posibilidad de llevar adelante de forma segura estudios radiobiológicos *in vivo* utilizando esta fuente.

El efecto terapéutico (control tumoral (CT) de 82 % y 55%, a los 14 y 28 días post-tratamiento, respectivamente) fue menor al resultado obtenido en nuestros trabajos anteriores para el mismo protocolo (CT: 91% a los 14 días post-tratamiento (Kreimann et al. 2001b)). En particular, solo el 9% (1 tumor) mostró remisión completa en comparación al 78% observado en el estudio previo luego de 14 días post-tratamiento. En principio, esta disminución en el efecto observado se atribuyó a

que se aplicó una dosis total inferior al tumor. Si bien no se observaron síntomas generales debido a la irradiación de cuerpo entero en los animales sometidos a este ensayo preliminar, por cuestiones de ética en el cuidado y uso de los animales de experimentación, es deseable proteger el cuerpo del animal cuánto sea posible para llevar adelante futuras experiencias. En estas condiciones de irradiación, el aumento de la dosis en el tejido blanco que se quiere estudiar, inevitablemente conlleva a la irradiación de cuerpo entero a mayores niveles de dosis, y no se puede descartar la manifestación de síndromes radioinducidos en cualquiera de sus formas, que podrían comprometer el estado clínico de los animales durante los experimentos e incluso afectar los resultados de los ensayos. Así, a partir de la idea de lograr una mejor respuesta incrementando la dosis, surgió la necesidad de diseñar y construir un blindaje de neutrones para el cuerpo del animal, que permita prescribir mayores dosis localmente al tumor, protegiendo a los tejidos sanos, trabajo que se describe en las siguientes secciones. El hecho de que en este estudio preliminar se utilizó una posición de irradiación alejada del núcleo (70 cm alejados de la posición de máximo flujo posible), permitió suponer que se podrían mantener o mejorar las condiciones de irradiación (flujo térmico) en el punto de interés para el MCBH, aún asumiendo una perturbación de flujo de neutrones debido al uso de un blindaje que proteja el cuerpo de los animales.

2.5.4 Conclusiones preliminares

Desde el punto de vista dosimétrico, la facilidad de irradiación central de la columna térmica del RA-3, ofrece una excelente fuente de neutrones para llevar adelante estudios radiobiológicos *in vivo* en animales pequeños. La dosis asociada con neutrones rápidos es despreciable en comparación con otras componentes de dosis consideradas en la dosimetría de BNCT (gamma y neutrones térmicos). La magnitud del flujo térmico es suficiente para realizar irradiaciones alcanzando niveles de dosis relevantes para estudios de BNCT en tiempos razonables. Para la realización de experimentos *in vivo* con animales, es recomendable el diseño de un blindaje de neutrones para proteger el cuerpo de los animales, y así alcanzar los niveles de dosis requeridos en la posición de interés para cada modelo experimental, con un margen de seguridad de trabajo adecuado.

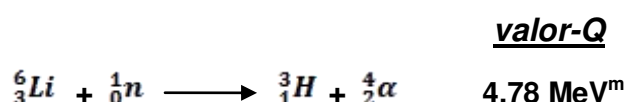
2.6 Desarrollo y caracterización de un blindaje neutrónico en la FFCT del reactor RA-3, para la aplicación de BNCT en el modelo experimental de cáncer bucal

2.6.1 Materiales y métodos

2.6.1.1 Elección del material para el blindaje

El material seleccionado para construir el blindaje fue carbonato de litio, enriquecido al 95 % en ${}^6\text{Li}$ (${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$), isótopo que le da las características al material como blindaje de neutrones térmicos. Los neutrones térmicos interactúan con los núcleos de los átomos de ${}^6\text{Li}$ de acuerdo a la reacción: ${}^6\text{Li}(n,\alpha){}^3\text{H}$. Este material fue recomendado y gentilmente donado por el Dr. David Nigg del Idaho National Laboratory de EE.UU.. Este material también fue utilizado como blindaje de hámsters en los primeros ensayos de irradiación de este mismo modelo experimental en el reactor RA-1 (Trivillin et al. 2004b, Nigg et al. 2004). En estado natural, el ${}^6\text{Li}$ tiene una abundancia del 7,4% (el resto, se encuentra como litio-7).

Una característica importante de la reacción del ${}^6\text{Li}$ con neutrones térmicos es que procede solo hacia el estado fundamental del producto. La reacción se describe a continuación (Knoll 1989):



Por tratarse de partículas pesadas de alto LET, estos productos son absorbidos en un corto recorrido en el mismo material o en las paredes del blindaje.

Si bien la sección eficaz para esta reacción (940 barns) es significativamente menor que, por ejemplo, la que se produce con el ${}^{10}\text{B}$ (3840 barns), lo que hace del ${}^{10}\text{B}$ un material típicamente usado como absorbente neutrónico, una importante ventaja del ${}^6\text{Li}$ es que no se generan rayos gamma inmediatos como resultado de la

^m Según los cálculos de las energías de los productos de la reacción para una energía del neutrón incidente despreciable:

$E({}^3\text{H}) = 2,73 \text{ MeV}$

$E(\alpha) = 2,05 \text{ MeV}$

captura. Esta radiación gamma se traduciría en un aporte adicional de radiación a la muestra que se está tratando de blindar.

Un punto adicional que fue tenido en cuenta fue la generación de tritio como producto de la captura del litio, un radionucleído emisor beta negativo puro de período de semi-desintegración largo ($T_{1/2} = 12,3$ años). Se consideró como posible efluente de descarga gaseoso y en el contexto del potencial caso de un evento con riesgo de contaminación en el manejo operativo del blindaje (ver ANEXO II). En relación al tritio que quedaría retenido dentro del blindaje, la energía máxima de las partículas beta emitidas en la desintegración de tritio es solo de 19 KeV, por lo que son absorbidas en las paredes mismas del blindaje y no afectarían ni a los operadores del blindaje, ni a los animales que se irradian. Sin embargo, desde el punto de vista de la radioprotección, es necesario tener en cuenta ciertos cuidados en el manejo post-irradiación del ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$, no solo debido a la generación de tritio y la potencial contaminación en caso de dispersión del material, sino también a la activación por producción de ${}^{18}\text{F}$ que fue detectada con posterioridad a la construcción y uso del blindaje (ANEXO III).

2.6.1.2 Diseño del blindaje de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$

El cuerpo principal del blindaje se compone de dos cajas rectangulares de acrílico, una dentro de la otra, de forma tal de obtener paredes dobles de acrílico, conteniendo entre ellas un relleno ininterrumpido de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ (95% enriquecido en ${}^6\text{Li}$) de aproximadamente 6 mm de espesor (Figura 2.12).

La elección del espesor de la pared del blindaje se realizó de acuerdo a los cálculos que se detallan en el ANEXO IV.

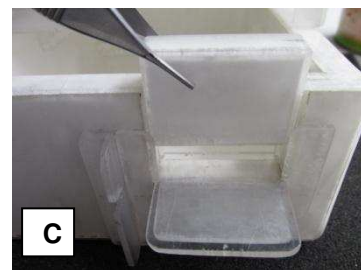
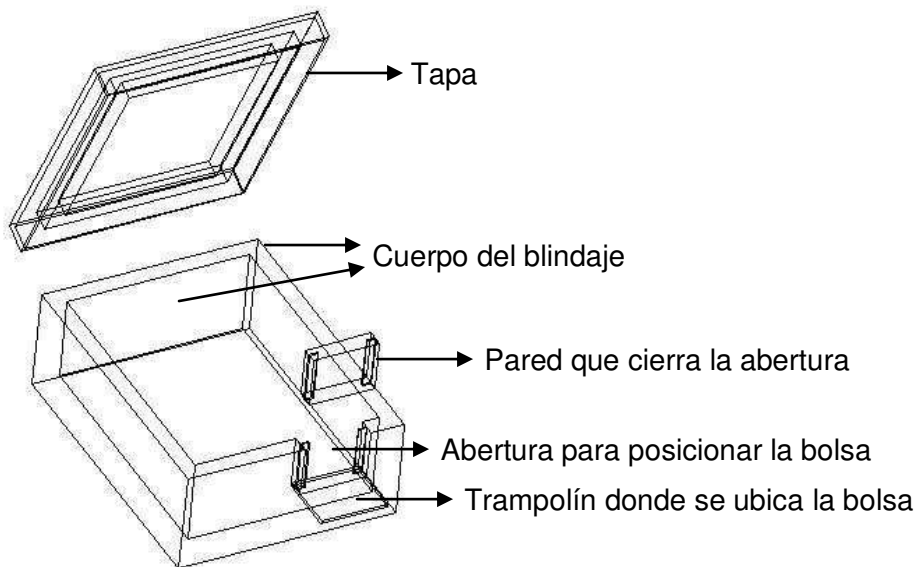
Las dimensiones externas del cuerpo del blindaje son 170 mm de largo, 130 mm de ancho y 60 mm de altura.

La caja blindaje posee una tapa removible por donde se accede a su interior y permite la ubicación del animal, que también se conforma por dos paredes de acrílico conteniendo ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ entre ellas. Las dimensiones externas de la tapa son 175 mm de largo, 134 mm de ancho y 10 mm de altura.

En el frente, el blindaje presenta una abertura que permite el posicionamiento de la bolsa de la mejilla evertida, sobre un trampolín de acrílico que se extiende por

fuera del blindaje dejando la zona a tratar expuesta al flujo neutrónico (Figura 2.13) mientras se protege el resto del cuerpo.

Figura 2.12 Diseño del blindaje de neutrones para el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster: una caja rectangular con tapa formada por paredes dobles de acrílico rellenas con ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$, y una abertura que permite disponer la bolsa del hámster evertida para ser irradiada sobre un trampolín de acrílico. En el dibujo superior se puede observar en detalle las dos cajas rectangulares de acrílico que forman las paredes dobles de acrílico del blindaje. Inferior: imágenes del blindaje de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ (A), la abertura y el trampolín donde se posiciona la bolsa (B) y la colocación de la pared que cubre la abertura (C).



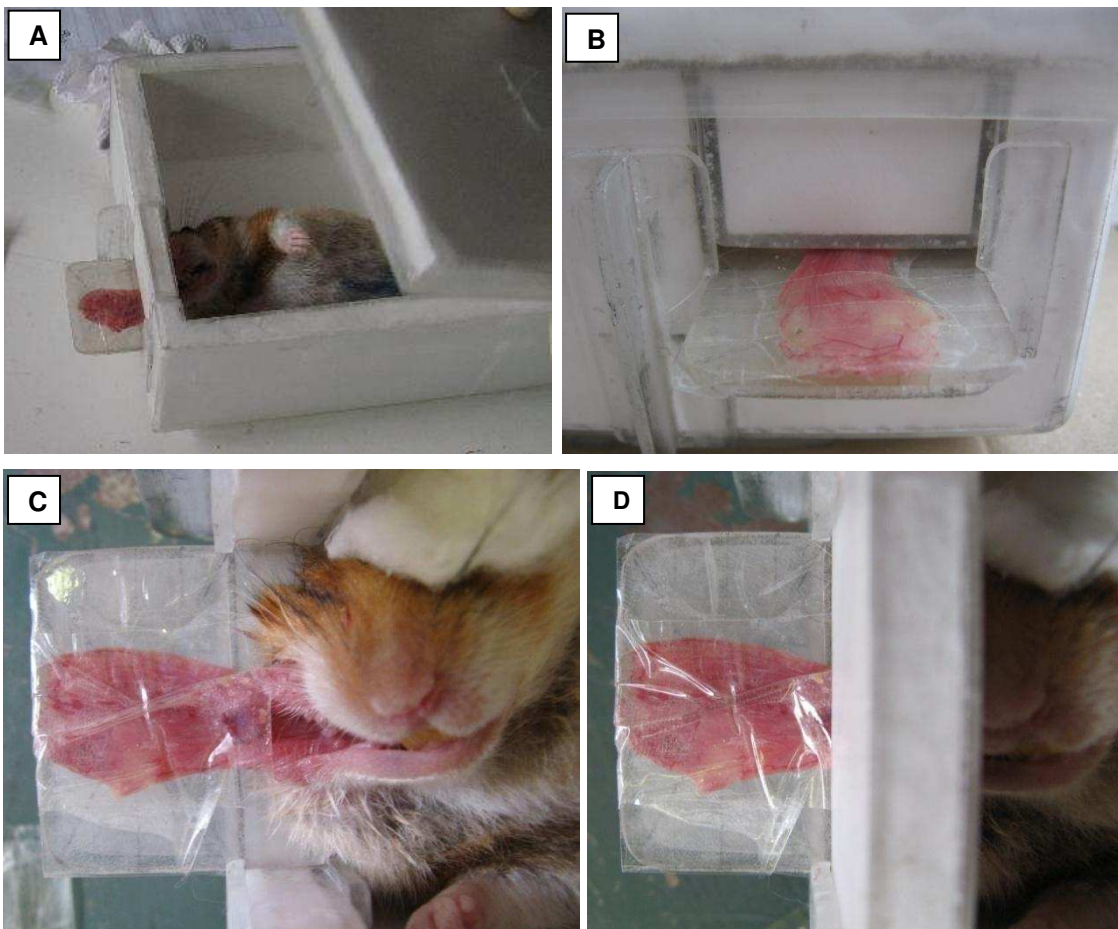
Con el animal posicionado y antes de cerrar la tapa del blindaje, la ventana se cierra interponiendo entre el trampolín y la cabeza del animal una pequeña pared de aproximadamente 6 mm de espesor de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$, para proteger la cabeza (Figura

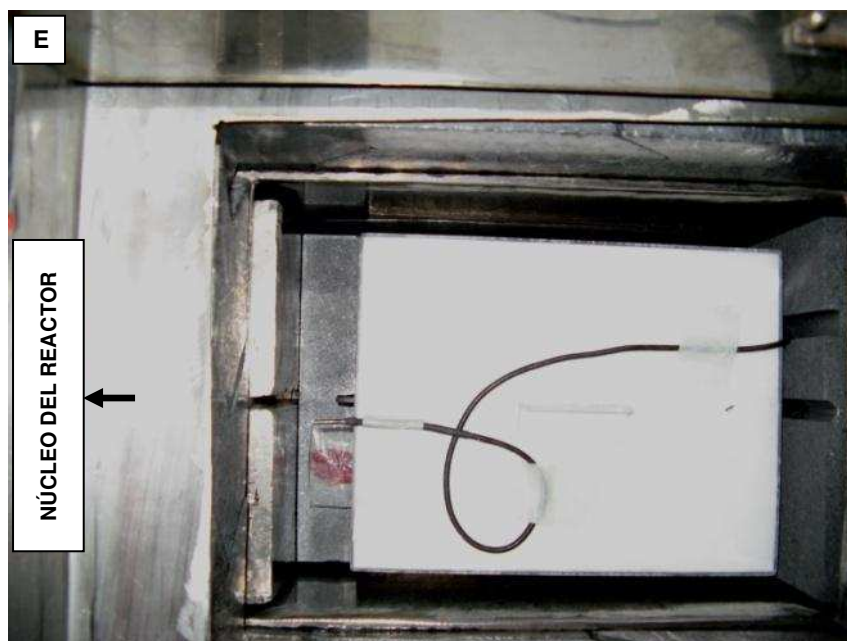
2.12). La pequeña pared se construyó con acrílico lo más delgado posible tratando de exponer al máximo la bolsa a tratar.

En el lado interior de la tapa, se dispuso un marco de acrílico que soporta un escalón interno de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$, con el fin de evitar la posible filtración de neutrones en forma directa o por rebote a través del espacio de acrílico que se forma por el apoyo de la tapa sobre la caja y que interrumpe el blindaje. El escalón encaja en el perímetro interno de la caja, formando un laberinto de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$.

Con la tapa superior en posición, el blindaje queda listo para ser irradiado en la facilidad central de la columna térmica del reactor (Figura 2.13).

Figura 2.13 Ubicación del hámster dentro del blindaje (A). En las imágenes B, C y D se puede observar un detalle de cómo queda posicionada la bolsa de la mejilla para la irradiación y la pared que completa la ventana protegiendo la cabeza del animal. Foto E: blindaje posicionado en la cavidad porta muestras de la FCCT. Se indica la posición del núcleo del reactor respecto de la ubicación del blindaje.





Cabe mencionar que, con posterioridad a este trabajo y dada la alta tasa de uso del blindaje en diversas líneas de trabajo de nuestro grupo, se realizó una optimización de este diseño y se construyó un nuevo blindaje que permite irradiar 2 hamsters simultáneamente (Pozzi 2012). Los detalles del nuevo diseño exceden el alcance de este trabajo de tesis y pueden ser consultados en Pozzi (2012).

2.6.1.3 Caracterización dosimétrica del blindaje

Las posiciones de principal interés para caracterizar el flujo son donde se ubica la bolsa del hámster sobre el trampolín, y aquellos puntos de mayor flujo dentro del blindaje (a priori esperables en las cercanías de la abertura, donde se interrumpe el blindaje). Para caracterizar el flujo neutrónico se repitió la experiencia con el fantoma de hámster instrumentado con alambres de cobre/oro (Cu/Au) (sección 2.5.1.2 Distribución de flujo dentro del cuerpo del animal), colocando en este caso el fantoma dentro del blindaje. Adicionalmente, se posicionaron tres alambres fuera del blindaje, sobre el trampolín, para evaluar el flujo neutrónico donde se ubica la bolsa. Las posiciones elegidas para posicionar estos alambres fueron en el borde donde termina la pared que cubre la abertura (aprox. 0,5 cm del centro de la pared del blindaje), y a 1 y 2 cm de distancia del primer alambre (1,5 y 2,5 cm de distancia del centro de la pared, respectivamente), de forma tal de evaluar, respectivamente, el flujo en la base, en el centro y en la punta de la bolsa a ser tratada (Figura 2.14).

Figura 2.14 Fantoma de hámster de acrílico instrumentado con alambres de oro/cobre para medir la distribución de flujo neutrónico con el blindaje de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$. Las flechas rojas en la imagen superior derecha indican la posición de los tres alambres ubicados sobre el trampolín de acrílico donde se posiciona la bolsa del hámster.



El conjunto del fantoma instrumentado con los alambres dentro del blindaje de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ fue irradiado en la posición más cercana al núcleo dentro del canal de la FCCT del reactor (a tope), durante 40 minutos a una potencia de 8 MW. Finalizada la irradiación, los alambres fueron retirados y medidos en una cadena de espectrometría gamma y procesados por métodos de activación neutrónica de la misma forma como se describió anteriormente para el caso sin blindaje.

2.6.2 Resultados

Se midió un flujo térmicoⁿ de $5,4 \times 10^9 \text{ ncm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (incerteza 8%) en el punto más expuesto sobre el trampolín (2,5 cm del centro de la pared del blindaje). Este valor es alrededor de un 25 % más bajo que el que se obtiene en la misma posición sin la presencia del blindaje, y se debe a una depresión local de flujo que produce la presencia del mismo (los datos de las mediciones sin blindaje no se muestran).

ⁿ Flujo neutrónico térmico para una energía de 0,025 eV.

En la Tabla 2.8 se muestran los valores de actividad de saturación para el oro y el cobre en las distintas posiciones del fantoma dentro del blindaje y sobre el trampolín. En la misma tabla se expresa en forma porcentual el valor en cada posición con respecto al valor medido en la posición media sobre el trampolín (1 cm del centro de la pared del blindaje^o).

Tabla 2.8 Actividades de saturación obtenidas a partir de los alambres utilizados en la experiencia de medición por activación con el fantoma de hámster de acrílico dentro del blindaje de neutrones de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$. También se expresan los valores relativos (%) al valor obtenido donde se posicionaría el centro de la bolsa para el tratamiento. Las incertezas estimadas al nivel de 1σ fueron aproximadamente del 6%. NC: no corresponde.

# posición en el trampolín / fantoma	Ubicación / Tejido	Au con blindaje		Cu con blindaje	
		Actividad de saturación por átomo [s ⁻¹]	% del valor en el centro de la bolsa	Actividad de saturación por átomo [s ⁻¹]	% del valor en el centro de la bolsa
NC	punta bolsa	5,20E-13	113 %	2,36E-14	114%
NC	centro bolsa	4,60E-13	100 %	2,07E-14	100%
NC	base bolsa	3,49E-13	76 %	1,62E-14	79 %
1	Bolsa	1,39E-14	3 %	5,82E-16	3 %
2	Cerebro	5,52E-15	1,2%	2,45E-16	1,2%
3	Pulmón	1,46E-15	0,3%	5,30E-17	0,3%
4	Hígado	1,32E-15	0,3%	4,11E-17	0,2%
5	Bolsa	1,71E-14	4 %	8,21E-16	4 %
6	Piel mejilla	4,03E-15	0,9%	1,56E-16	0,8%
7	Piel cuello	1,61E-15	0,4%	6,62E-17	0,3%
8	Piel abdomen	1,56E-15	0,3%	5,72E-17	0,3%
9	Piel cadera	4,53E-16	0,1%	3,40E-17	0,2%
10	Piel dorso	1,33E-15	0,3%	4,19E-17	0,2%
11	Piel mejilla	8,48E-15	1,8%	3,56E-16	1,7%
12	Piel abdomen	9,69E-16	0,2%	4,37E-17	0,2%
Promedio posiciones cabeza		9,80E-15	2 %	4,32E-16	2 %
Promedio posiciones cuerpo		1,25E-15	0,3%	4,82E-17	0,2%
Promedio todas las posiciones		4,81E-15	1,0 %	2,08E-16	1,0 %

^o Como se verá más adelante, la posición media en el trampolín se definió como punto de referencia para realizar las mediciones de flujo neutrónico previo a cada experiencia. Por esta razón se elige aquí como punto relativo de comparación.

El mayor valor de actividad medido en cualquier posición dentro del blindaje coincide con un punto en la cabeza del animal y alcanzó el 4 % del valor medido en la zona media del trampolín. Si se tienen en cuenta todas las posiciones en el cuerpo sin considerar las de la cabeza, el valor promedio de flujo es menor al 0,5 % con respecto al valor que recibe el centro de la bolsa a tratar. Esto implica que la dosis debida a la componente boro que recibe el cuerpo será proporcionalmente menor en relación con la dosis que recibe la bolsa cancerizada ubicada en el trampolín^P.

Comparando los valores medidos en las tres posiciones sobre el trampolín, donde se ubicaría la bolsa a irradiar, se puede ver como el flujo disminuye desde el valor máximo en el extremo del trampolín que apunta al núcleo del reactor, hacia la pared del blindaje. Por ejemplo, para la medición de Cu, la activación relativa al punto medio sobre el trampolín es aproximadamente de **114 % en la punta y 79 % la base**. Como la fuente que se quiere blindar es un campo cuasi-isotrópico, el flujo de neutrones en cualquier posición proviene de todas las direcciones. De esta forma se genera un efecto tipo “sombra” sobre el trampolín debido al blindaje, efecto que se incrementa sobre las posiciones más cercanas al mismo. Esta variación sobre el trampolín representa una variación real de flujo en la posición de irradiación, que deber ser tomada en cuenta como tal en el cálculo de dosis absorbida utilizando este sistema.

2.6.3 Discusión y conclusiones

Se logró diseñar y construir un blindaje de neutrones para el modelo experimental de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster adaptado a la FCCT del reactor RA-3, que permite proteger el cuerpo de los animales durante las irradiaciones.

La caracterización del blindaje demostró que se pueden obtener valores de flujo neutrónico térmico en la posición de interés que permiten alcanzar niveles de dosis relevantes para realizar estudios de BNCT en este modelo experimental, con tiempos de irradiación de 20 minutos o menos. Sin embargo, la presencia misma del blindaje produce una variación de flujo entre el extremo y la base del trampolín de

^P Asumiendo una misma concentración de boro en todos los tejidos.

hasta un 40%, lo que implica una heterogeneidad de la dosis prescrita al utilizar este sistema de irradiación.

Dentro del blindaje, el flujo se reduce al menos 20 veces en la posición más expuesta, que se encuentra en las cercanías de las ventanas donde se coloca la cabeza del hámster. En el resto de las posiciones el flujo disminuye más de dos órdenes de magnitud. Dado que el flujo térmico es proporcional a las componentes de dosis debidas a la captura en boro y nitrógeno, la disminución de flujo dentro del blindaje se traduce directamente en un menor valor de dosis de estas componentes, las más relevantes (alto LET) desde el punto de vista de posibles efectos radio-inducidos no deseados. Mediante la caracterización del blindaje se obtuvieron factores de atenuación de flujo neutrónico dentro del mismo para ser utilizados en la estimación de dosis en diferentes órganos de interés.

2.7 Evaluación de la eficacia terapéutica y radioxicidad del tratamiento con BNCT en el modelo de cáncer bucal de la mejilla del hámster en el reactor RA-3

2.7.1 Introducción

La eficacia del tratamiento de tumores por BNCT mediada por los compuestos BPA, GB-10 y (BPA + GB-10) en el modelo de la bolsa de la mejilla del hámster, fue demostrada con éxito por nuestro grupo en estudios previos utilizando la fuente de neutrones del reactor RA-6 (San Carlos de Bariloche) (Kreimann et al. 2001b, Trivillin et al. 2004a, 2006). Posteriormente, se construyó una nueva fuente de neutrones en el reactor RA-3 (Buenos Aires), que sirve para aplicaciones biomédicas de BNCT (Miller et al. 2009). En la sección anterior de esta tesis se demostró la factibilidad del uso de esta fuente en ensayos *in vivo* con animales pequeños. Para continuar con este tipo de experiencias fue prioritario adaptar la nueva fuente mediante el desarrollo de un blindaje de neutrones que permitiera proteger la mayor parte del cuerpo de los animales mientras se irradia el campo de interés, de modo de evitar efectos radio-inducidos indeseables. En esta sección se plantea como objetivo realizar el tratamiento con BNCT a mayor dosis utilizando el sistema de irradiación con blindaje, y evaluar la eficacia terapéutica y la potencial radiotoxicidad en el modelo de cáncer bucal en hámster.

2.7.2 Materiales y métodos

2.7.2.1 Inducción de los tumores y manejo de los animales

La inducción de tumores en la bolsa derecha de la mejilla de hamsters Syrian (*Mesocricetus auratus*) jóvenes (6-8 semanas), se realizó como se describió anteriormente por topicación de DMBA 0,5 % en aceite mineral 2 veces por semana durante 12 semanas (Figura 2.1).

Una vez que se desarrollaron los tumores exofíticos (carcinomas de células escamosas), los animales fueron usados para estudios.

Los animales fueron mantenidos en cajas con tapa de alambre, con cama de viruta de pino, en grupos de no más de 5 animales del mismo sexo. El alimento

balanceado en forma de pellets y el agua fueron entregados ad libitum. Los animales fueron mantenidos con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

Finalizados los tratamientos experimentales, los animales fueron eutanasiados por decapitación bajo sobredosis de anestesia administrada i.p. de ketamina (140 mg/kg m.c.) y xilazina (21 mg/kg m.c.). Todos los experimentos se realizaron siguiendo normas de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 1996).

2.7.2.2 *In vivo* BNCT

Grupos de animales con tumor fueron sometidos a BNCT mediado por: el compuesto BPA (33 tumores) (**grupo BPA-BNCT**), el compuesto GB-10 (11 tumores) (**grupo GB10-BNCT**) o la administración combinada de ambos compuestos (GB-10 + BPA) (13 tumores) (**Grupo COMB-BNCT**). Estos mismos protocolos fueron probados previamente en forma satisfactoria en el haz del reactor RA-6 (Kreimann et al. 2001a, 2001b; Trivillin et al. 2006). En la Tabla 2.8 se presentan los valores de concentración de boro utilizados para los cálculos dosimétricos (Kreimann et al. 2001a, Heber et al. 2004, 2006).

Tabla 2.8 Concentración de boro (media \pm DS) (ppm) para los diferentes protocolos de administración utilizados.

Tejido	BPA ^a	GB-10 ^b	GB-10 ^c + BPA ^d
Tumor	33 \pm 17	32 \pm 21	63 \pm 21
Tejido precanceroso	20 \pm 6	34 \pm 17	41 \pm 14
Bolsa normal	14 \pm 5	22 \pm 7	38 \pm 18
Sangre	12 \pm 4	32 \pm 6	30 \pm 14

^a 3 hs después de inyección i.p. 14,1 mg ¹⁰B/kg m.c.

^b 3 hs después de inyección i.v. 50 mg ¹⁰B/kg m.c.

^c 3 hs después de inyección i.v. 34,5 mg ¹⁰B/kg m.c.

^d 1,5 hs después de fin de simil-infusión de 28.2 mg ¹⁰B/kg m.c. (duración de simil-infusión: 3 hs)

Otro grupo de animales con tumor (26 tumores) fueron irradiados sin la administración de un compuesto borado (**Grupo Solo Haz**) para estudiar el efecto de la radiación de fondo. El tiempo de irradiación del grupo solo haz fue el correspondiente para alcanzar la misma fluencia de neutrones que la máxima utilizada en los protocolos BNCT.

Adicionalmente se irradiaron bolsas normales de animales sin cancerizar, para evaluar potencial radiotoxicidad en el tejido normal de la bolsa, inducida por los mismos tratamientos.

2.7.2.3 Dosimetría

Los cálculos dosimétricos se realizaron en forma análoga a lo descrito previamente en la sección 2.5, considerando las nuevas condiciones del sistema con el blindaje. Sintéticamente, las dosis reportadas incluyen tres componentes: una dosis de protones proveniente de la captura del nitrógeno, una dosis gamma y la contribución de la reacción de boro^q.

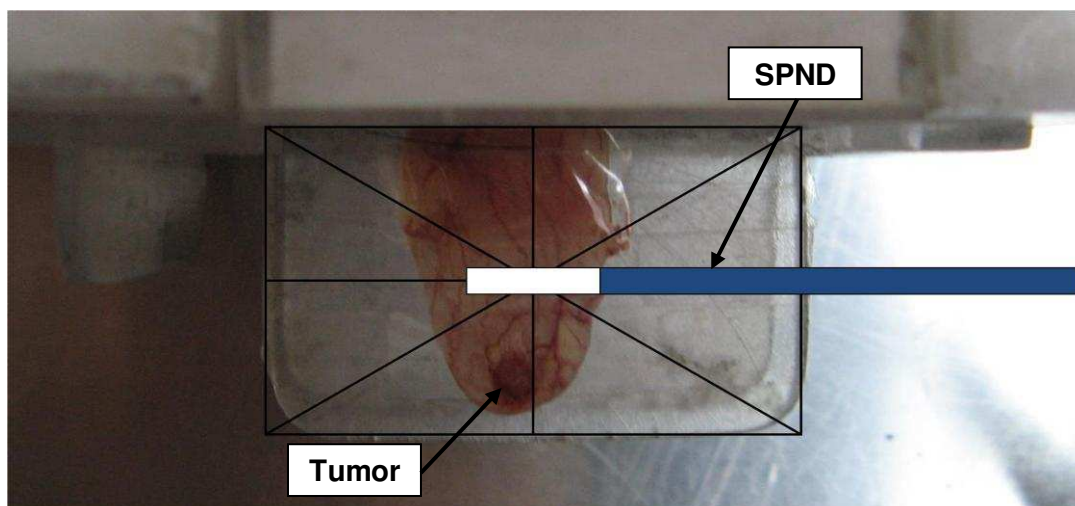
Para la caracterización de tasa de dosis gamma se utilizó la misma cámara de ionización (CI) utilizada en la caracterización sin blindaje (Far West Technology de grafito modelo IC-18G), cuyo volumen sensible de aire (0,1 cm³) fue cubierto con un blindaje de ⁶LiF (95% enriquecido en Li-6), de manera de descontar la contribución producida por las reacciones con neutrones, en especial la reacción ¹⁴N(n,p)¹⁴C. La zona sensible de la CI fue posicionada sobre la tapa del blindaje a la altura del trampolín donde se posiciona la bolsa, de modo de poder determinar la tasa de dosis gamma del sistema de irradiación completo de la forma más representativa de la posición de tratamiento^r. A los fines experimentales se consideró que la tasa de dosis gamma medida fue la misma en el resto de las posiciones del cuerpo del animal.

Para cada día de irradiación, se realizó una medición con un SPND dispuesto en el centro del trampolín, para ajustar el flujo neutrónico y la tasa de dosis gamma a eventuales variaciones de potencia del reactor con respecto a las condiciones caracterizadas previamente. En la Figura 2.15 se indica la posición donde se mide el flujo neutrónico con el SPND, en superposición con una bolsa de hámster cancerizada posicionada y lista para la irradiación. Luego, considerando la concentración de boro para cada protocolo, se determinó el tiempo de exposición para alcanzar las dosis prescriptas.

^q Para el boro y el nitrógeno, los factores kerma térmicos utilizados para los cálculos fueron los mismos que se describieron anteriormente.

^r Mediante otros ensayos y simulaciones computacionales, se pudo comprobar que la presencia o no del animal dentro del blindaje no hace una contribución significativa a la tasa de dosis gamma debido a la gran atenuación del flujo neutrónico que se produce dentro del blindaje. De esta forma, no fue necesario el uso de un factor de corrección de la tasa de dosis gamma por la reacción con hidrógeno presente en el cuerpo del animal. Los resultados de estas evaluaciones no se muestran.

Figura 2.15 Imagen de la bolsa de la mejilla del hámster cancerizada, posicionada para ser irradiada. En este caso se observa un tumor exofítico ubicado hacia el extremo del trampolín. En forma superpuesta, un diagrama muestra a qué altura se coloca un detector SPND en el centro del trampolín, para realizar la medición de flujo neutrónico previo a las irradiaciones, que luego se utiliza para realizar el cálculo de dosis. Las dosis reportadas corresponden a esta posición sobre el trampolín.



Como la dosis fue estimada en función de la medición de flujo en el centro del trampolín, en la medida de lo posible se intentó posicionar los tumores a tratar alrededor de esa posición, con el objetivo de minimizar cuanto fuera posible la variación de flujo neutrónico a lo largo del trampolín debida a la presencia de blindaje.

2.7.2.4 Seguimiento de los animales

La respuesta del tumor, el tejido precanceroso y normal, fue evaluada por inspección visual y la medición del volumen tumoral a los 0, 1, 7, 14, 21 y 28 días post-tratamiento. Se definió como "remisión parcial (RP)" a la reducción del volumen tumoral con respecto al momento previo al tratamiento (tiempo 0 de seguimiento); y "remisión completa (RC)" a la desaparición del tumor. La "respuesta o control tumoral" incluye la suma de las remisiones parciales y completas.

La masa corporal y los signos clínicos fueron monitoreados periódicamente. A los 28 días (último tiempo experimental), los animales fueron eutanasiados para realizar un análisis histológico del tumor, el tejido precanceroso y normal.

El análisis estadístico de los datos de control tumoral, se realizó empleando el test exacto de Fisher. La significancia estadística se definió para un $p \leq 0,05$.

2.7.3 Resultados

El flujo neutrónico medido en el centro del trampolín fue $(6,1 \pm 0,5) \times 10^9$ n $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ para el protocolo BPA-BNCT y $(4,3 \pm 0,5) \times 10^9$ n $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ para los protocolos GB10-BNCT y COMB-BNCT. Las diferencias en esta condición de irradiación para los diferentes protocolos se debió a variaciones de potencia de trabajo del reactor. La tasa de dosis gamma calculada para esas dos condiciones de potencia fue $(7,3 \pm 0,9)$ Gy/h y $(5,8 \pm 0,7)$ Gy/h, asociada al mayor y menor nivel flujo, respectivamente.

En la Tabla 2.9 se presentan las dosis absorbidas para las diferentes componentes de radiación, estimadas para la posición central del trampolín a partir de la medición de flujo correspondiente. La dosis boro se indica en Gy por parte por millón de boro por peso. En la Tabla 2.10 se muestran las dosis absorbidas totales. La dosis absorbida total para el protocolo Solo Haz fue $1,5 \pm 0,1$ Gy.

Tabla 2.9 Dosis absorbida asociada a cada componente para los diferentes protocolos experimentales. Los valores expuestos están estimados para la posición central del trampolín.

	BPA- BNCT	GB-10- BNCT	(GB-10 + BPA)- BNCT
Tiempo de irrad. [min]	$5,0 \pm 0,1$	$9,9 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,1$
Dosis Gamma [Gy]	$0,60 \pm 0,07$	$0,95 \pm 0,11$	$0,30 \pm 0,04$
Dosis Captura (^{14}N) [Gy]	$0,39 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,02$
Dosis Boro [Gy/ppm]	$0,14 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,02$	$0,061 \pm 0,006$

Tabla 2.10 Dosis absorbida total estimada en diferentes tejidos para los diferentes protocolos. La incerteza de la dosis boro incluye la incerteza asociada a las determinaciones de concentración de boro para cada caso (Tabla 2.8).

	BPA- BNCT	GB-10- BNCT	(GB-10 + BPA)- BNCT
Tumor	6 ± 2	8 ± 4	$4,3 \pm 1,3$
Tejido precanceroso	$3,7 \pm 0,9$	8 ± 3	$3,0 \pm 0,9$
Bolsa normal	$3,0 \pm 0,7$	$5,6 \pm 1,4$	$2,8 \pm 1,1$
Cuerpo	$0,70 \pm 0,08$	$1,2 \pm 0,1$	$0,38 \pm 0,05$

Los animales cancerizados sin ningún tratamiento (grupo SHAM control, n = 77 tumores, 12 hamsters) exhiben una progresión en el 84 % de los tumores luego

de 28 días de seguimiento (remisión parcial 16%, remisión completa = 0%, control tumoral 16%)^s (Heber et al. 2014). Aquí se debe aclarar que el 16% de remisiones parciales se debe a reducciones espontáneas en el volumen tumoral ya que este grupo no fue tratado.

En la Tabla 2.11 se presentan los datos de control tumoral para cada protocolo experimental al final del período de seguimiento luego del tratamiento (28 días). Al momento de la irradiación, arbitrariamente se definieron dos rangos de volumen tumoral para categorizar el tamaño tumoral y evaluar una potencial respuesta diferencial relativa al volumen tumoral a tratar.

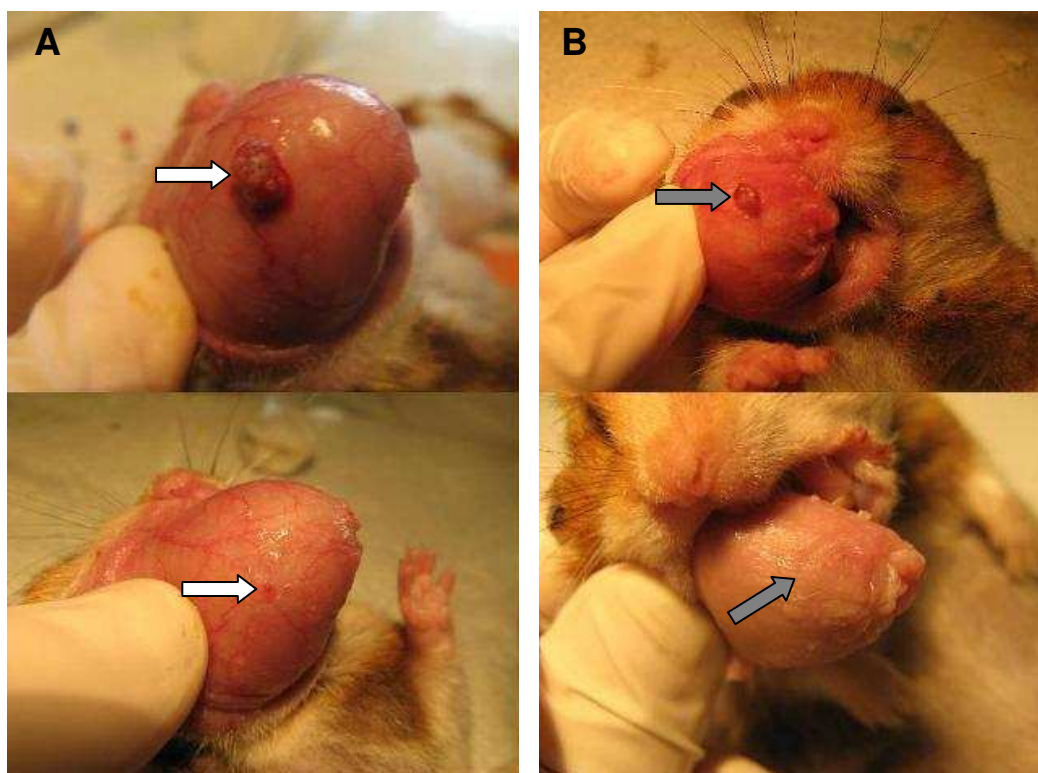
Tabla 2.11 Respuesta tumoral 28 días post tratamiento para cada protocolo experimental evaluado. Los tumores fueron agrupados, según el volumen al inicio del tratamiento, en chicos (<10mm³) y grandes (≥10mm³). El Total representa la respuesta de todos los tumores sin discriminar el volumen inicial de los mismos. RP: Remisión Parcial, RC: Remisión Completa, Control Tumoral: CT = (RP + RC).

Protocolo	Tumores	n	RP	RC	CT
Solo Haz	Chicos < 10mm³	23	23%	0%	23%
	Grandes ≥ 10mm³	3	67%	0%	67%
	Total	26	31%	0%	31%
BPA- BNCT	Chicos < 10mm³	28	21%	50%	71%
	Grandes ≥ 10mm³	5	60%	20%	80%
	Total	33	27%	45%	73%
GB10- BNCT	Chicos < 10mm³	7	29%	43%	78%
	Grandes ≥ 10mm³	4	75%	0%	75%
	Total	11	45%	27%	73%
(GB10 + BPA)- BNCT	Chicos < 10mm³	11	36%	45%	82%
	Grandes ≥ 10mm³	2	100%	0%	100%
	Total	13	46%	38%	85%

^s Los resultados asociados a este grupo control forman parte de una experiencia realizada por nuestro grupo de investigación, y se presentan con la finalidad de comparar con los resultados que se presentan en este trabajo.

Los tres protocolos BNCT mostraron una eficacia terapéutica (control tumoral) estadísticamente significativa versus el control sin tratar ($p \leq 0,000$). En la Figura 2.16 se muestran ejemplos representativos de remisión parcial y completa.

Figura 2.16 Ejemplos representativos de (A) un caso de remisión parcial (GB10-BNCT) y (B) un caso de remisión completa (BPA-BNCT). Paneles superiores: pre-tratamiento; paneles inferiores: 28 días post-tratamiento.



Comparado con el control sin tratamiento, el grupo Solo Haz mostró un aumento en la respuesta (remisión parcial 16% vs 31%, respectivamente), aunque la diferencia observada a este nivel de dosis no fue estadísticamente significativa. Esta tendencia sobre el efecto del Solo Haz fue significativamente menor que cualquiera de los protocolos BNCT ($p \leq 0,03$). Adicionalmente, los protocolos BNCT alcanzaron un 27-45% de remisión completa (combinando todos los datos de ambos tamaños de tumores), mientras que el Solo Haz no indujo ninguna remisión completa. El protocolo BPA-BNCT fue el único que indujo remisión completa en tumores grandes (1 de 5 tumores = 20%).

El análisis histológico de tumores tratados con BNCT que respondieron parcialmente, reveló signos de daño radioinducido, como por ejemplo, núcleos hipercromáticos, vacuolización y focos necróticos.

A nivel clínico, ningunos de los animales tratados manifestó signos de radiotoxicidad.

El tejido precanceroso de la bolsa de animales tratados con BPA-BNCT mostró un grado de mucositis moderado-alto (eritema, edema, erosión de la bolsa y úlceras, en general pequeñas (<2 mm) y algunas de mayor tamaño), mientras que en los animales tratados con (GB10+BPA)-BNCT, el tejido precanceroso manifestó signos de mucositis leve (eritema, edema y erosión). En todos los casos la mucositis fue reversible, con un pico de intensidad entre los 7 y los 14 días post-tratamiento, comenzando a resolverse a los 21 días. En la Figura 2.17 se puede observar la evolución en el tiempo de la bolsa de un caso tratado con BPA-BNCT.

En el caso del protocolo GB10-BNCT y Solo Haz no se observaron signos de mucositis en el tejido precanceroso de la bolsa irradiada. En la Figura 2.18 se puede observar la evolución en el tiempo de la bolsa de un caso tratado con GB10-BNCT.

No se observaron signos de radiotoxicidad en tejido normal, ni alteraciones clínicas ni cambios en la ganancia de masa corporal en ninguno de los animales normales (no cancerizados), tratados con BNCT o con Solo Haz hasta 6 meses de seguimiento post tratamiento.

Figura 2.17 Imágenes de revisiones de la bolsa de un hámster tratado con BPA-BNCT. Se puede observar la evolución de la mucositis en el tejido precanceroso a diferentes tiempos post-tratamiento. Luego de 21 días la mucositis comienza a resolverse.

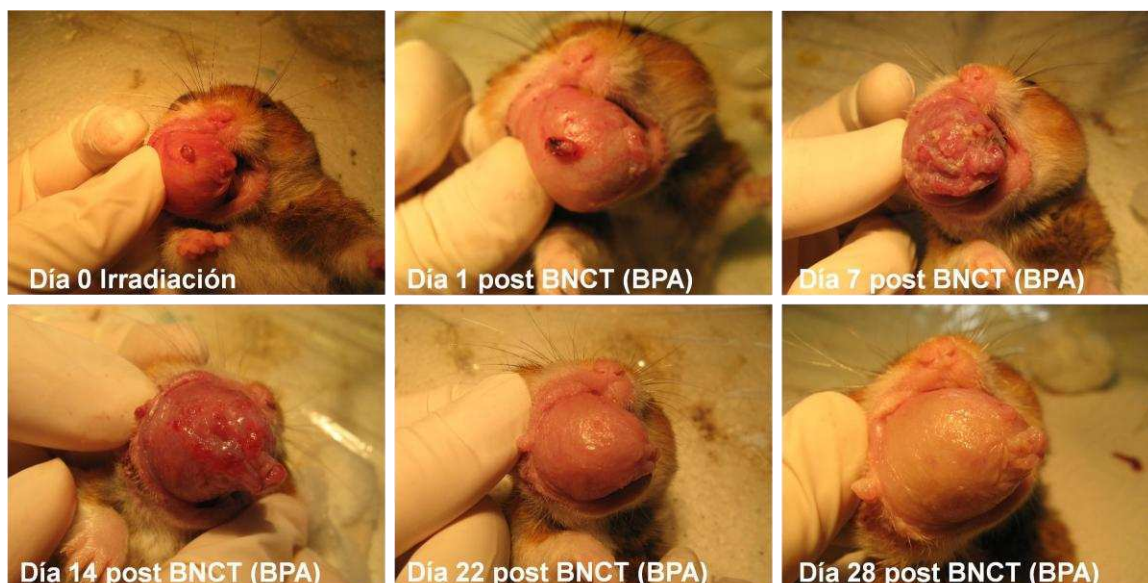
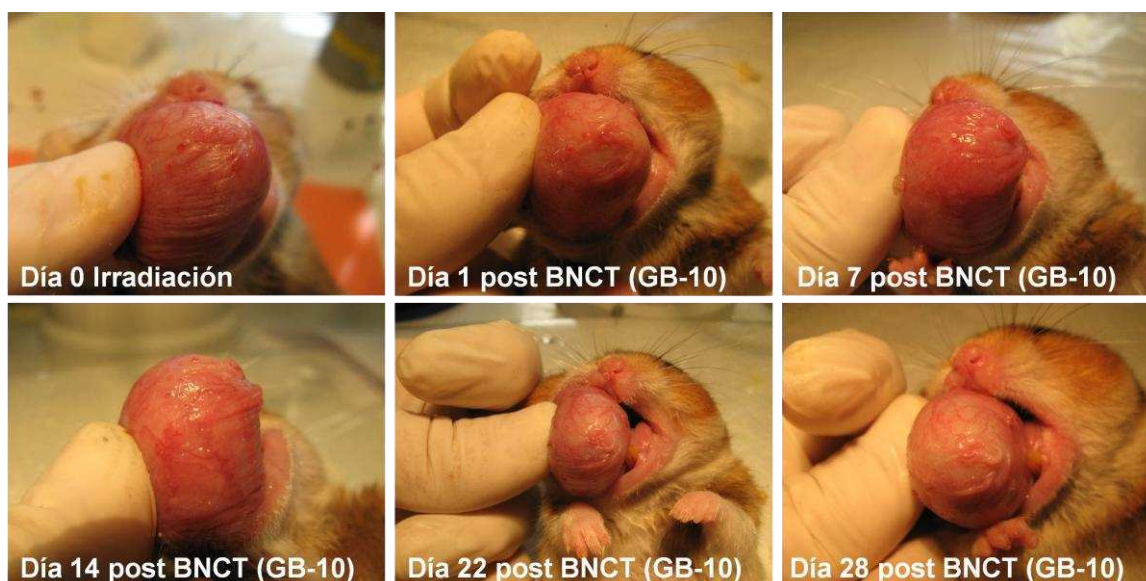


Figura 2.18 Imágenes de revisiones de la bolsa de un hámster tratado con GB10-BNCT. Al igual que en el caso del grupo Solo Haz, este tratamiento no indujo el desarrollo de mucositis en el tejido precanceroso al nivel de dosis estudiado.



2.7.4 Discusión

Se pudieron realizar con éxito los primeros estudios de BNCT en el modelo experimental de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster utilizando el blindaje de neutrones de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$, demostrando que la adaptación de la FCCT del reactor RA-3 es una herramienta útil para llevar adelante estudios *in vivo* con esta fuente de neutrones.

Se comprobó que los tres protocolos de BNCT realizados en el RA-3 fueron terapéuticamente muy efectivos, e inocuos para el tejido normal de la bolsa expuesto y para el cuerpo del animal blindado.

Aunque la dosis absorbida total entregada al tumor con GB10-BNCT fue superior que con los otros dos protocolos BNCT (Tabla 2.10), el control tumoral no difiere significativamente. Considerando que las componentes de dosis de fondo fueron similares (1 Gy y 1,5 Gy, para BPA-BNCT y GB10-BNCT, respectivamente), este resultado sugiere que el factor de eficacia biológica del compuesto (CBE) en este modelo experimental sería mayor para el BPA que para el GB-10, explicación que coincide con observaciones previas en trabajos de nuestro grupo (Trivillin et al., 2004, 2006). Pese a que el GB-10 es un compuesto que se distribuye relativamente en forma homogénea (no selectiva) en la sangre, el tumor, tejido precanceroso y normal, el protocolo de BNCT utilizando este compuesto logró un control tumoral

significativo sin efectos radiotóxicos en tejido precanceroso y normal. Este resultado coincide con estudios previos de nuestro laboratorio que sugieren que el efecto selectivo del GB10-BNCT sobre el tumor, no atribuible a una incorporación selectiva del compuesto por el tumor, estaría mediado por un efecto selectivo sobre los vasos sanguíneos del tumor, que por sus características aberrantes serían más sensibles al tratamiento que los vasos sanguíneos del tejido precanceroso y normal (Trivillin et al. 2006).

El hecho de que el protocolo de administración combinada de compuestos (GB10+BPA) entregue mayores cantidades de boro al tejido tumoral (Tabla 2.8), permite la reducción del tiempo de irradiación, reduciendo la dosis de fondo (que afecta de forma similar al tumor y a los tejidos precanceroso y normal) en relación a la dosis de la componente boro, lo que mejoraría la respuesta terapéutica (Coderre y Morris 1999, Trivillin et al. 2004a). Si bien no muestra una diferencia significativa en la respuesta tumoral con respecto a los otros protocolos BNCT estudiados, se observó una tendencia de mayor respuesta con el protocolo (GB10+BPA)-BNCT (85% vs 73% (otros protocolos)). El protocolo (GB10+BPA)-BNCT combinaría los mecanismos de targeting vascular de GB-10-BNCT y de targeting celular de BPA-BNCT. Asimismo el uso combinado de 2 compuestos borados con propiedades diferentes y mecanismos de incorporación diferentes redundaría en una mayor homogeneidad en la distribución de boro en las distintas poblaciones celulares de tumores heterogéneos como los estudiados (Trivillin et al. 2006, Heber et al. 2006).

El efecto terapéutico observado con el protocolo Solo Haz mostró una tendencia de aumento de las remisiones parciales versus el control sin tratamiento. Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, hay que considerar que los niveles de dosis de radiación de fondo fueron bajos (1 y 1,5 Gy) y sería esperable observar un grado de respuesta significativo a mayores dosis. En este sentido se encuentra pendiente el estudio del potencial rol terapéutico de las distintas componentes de dosis de fondo, sugerido en trabajos previos de nuestro grupo (Trivillin et al. 2008). Sería interesante llevar a cabo experiencias comparativas utilizando otras fuentes de neutrones como las de los reactores RA-1 y RA-6, ya que estas otras facilidades poseen diferentes espectros neutrónicos que la FCCT del RA-3. En la Tabla 2.12 se muestra una comparación de los valores de las distintas componentes de dosis de un protocolo cualquiera de BNCT aplicado al modelo de

cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, utilizando estas fuentes de irradiación. Los datos correspondientes al RA-3 surgen de los experimentos realizados con el sistema con blindaje de neutrones. Los datos del RA-1 y del RA-6 fueron tomados de publicaciones y presentaciones a congresos de trabajos previos de nuestro grupo (Nigg et al. 2004, Trivillin et al. 2004b, 2006). Las dosis corresponden a la posición de irradiación de la bolsa cancerizada.

Tabla 2.12 Datos comparativos de las diferentes componentes de dosis en tratamientos de BNCT aplicados al modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, utilizando diferentes fuentes de neutrones (reactores RA-1, RA-3 y RA-6). Las dosis corresponden a la posición de la bolsa cancerizada. La dosis asociada a la componente del boro se representa por Gy por ppm de ^{10}B . Los valores se expresan dentro de un rango obtenido a partir de la recopilación de las experiencias publicadas: RA-1 (Nigg et al. 2004, Trivillin et al. 2004b), RA-3 (este trabajo), RA-6 (Trivillin et al. 2006).

	RA-1	RA-3	RA-6
Tiempo de irradiación [min]	10 - 30	3 - 10	35 - 75
Flujo térmico [n / (cm ² s)]	$1,5 \times 10^8$	$6,3 \times 10^9$	$3,4 \times 10^8$
Fluencia [n / cm ²]	$(0,010 - 0,27) \times 10^{12}$	$(1,1 - 3,8) \times 10^{12}$	$(0,71 - 1,5) \times 10^{12}$
Captura (^{14}N) [Gy]	0,035 - 0,10	0,23 - 0,78	0,14 - 0,30
Neutrones rápidos [Gy]	0,59 - 1,8	<0,03	0,48 - 1,0
Dosis γ [Gy]	0,13 - 0,39	0,37 - 1,2	1,4 - 2,9
Dosis Boro [Gy / ppm]	0,0060 - 0,018	0,084 - 0,28	0,054 - 0,12

Cabe destacar que las tres fuentes de irradiación han tenido modificaciones y los valores absolutos de dosis actualmente pueden cambiar. Sin embargo, el orden de magnitud de las componentes de dosis de la Tabla 2.12, se pueden considerar

representativas de estas fuentes. Las principales diferencias que se pueden observar son:

- El RA-3 posee el mayor flujo térmico, un orden de magnitud por encima de las otras dos fuentes, lo que disminuye considerablemente los tiempos de irradiación para obtener la misma fluencia de neutrones térmicos.
- El RA-3 también posee la menor tasa de dosis gamma por unidad de flujo neutrónico térmico, una característica deseable para fuentes orientadas a estudios de BNCT donde esta componente se quiere minimizar.
- El RA-1 posee la mayor tasa de dosis asociada a neutrones rápidos. Esta componente es significativamente menor en el RA-6 y es despreciable en el RA-3.

Un dato relevante no consignado en la Tabla 2.12, es el flujo de neutrones epitérmicos. Mientras que en la FCCT el flujo de neutrones de mayor energía que la térmica se considera despreciable en comparación con el flujo térmico, esto no ocurre en las facilidades del RA-1 y del RA-6. En particular, la fuente del RA-6 posee una geometría de haz, y la componente epitérmica otorga una ventaja si se piensa en el tratamiento de tumores profundos. Esto se debe a que el espectro se termaliza al atravesar los primeros centímetros de tejido y se logra obtener un mayor flujo térmico en profundidad.

Los rangos de tiempo de irradiación/dosis que se consideraron en la Tabla 2.12, se corresponden con protocolos aplicados al modelo experimental que no produjeron efectos radio-inducidos inaceptables, ni en la bolsa ni a nivel clínico de los animales. En el caso particular del RA-1, se observó que no sería posible hacer BNCT mediado por GB-10 o BPA con tiempos de exposición de más de 30 minutos sin exceder la tolerancia del tejido normal (Trivillin et al. 2004b). Sin embargo, con 30 minutos de irradiación empleando un blindaje de neutrones térmicos, se pudo alcanzar un 50 % de control tumoral asociado con una radiotoxicidad moderada.

En principio, de la comparación general surge que la FCCT del RA-3 sería la fuente con mejores características para evaluar protocolos de BNCT con el modelo experimental de cáncer bucal del hámster, ya que se pueden alcanzar mayores niveles de componente selectiva de dosis boro en relación con la dosis de fondo. Sin embargo, utilizando el haz del RA-6, se pudo asociar un 70-92 % de control tumoral con la ausencia total de radiotoxicidad del tejido normal (Kreimann et al. 2001b; Trivillin et al. 2006), valores que incluso superan los resultados obtenidos en este

trabajo utilizando la FCCT del RA-3 (considerando niveles de dosis absorbida total similares y mayor dosis asociada a la componente boro).

Considerando que la mayor diferencia entre las fuentes del RA-1 y el RA-6 con respecto al RA-3, se encuentra en la dosis asociada a neutrones de mayor energía al rango térmico, sería particularmente interesante evaluar la influencia de esta componente sobre la respuesta. En este sentido, el reactor RA-1 ofrece una fuente muy buena para realizar experimentos para evaluar el efecto de la componente de dosis asociada a neutrones rápidos. Por otro lado, el tratamiento con Solo Haz en la FCCT del RA-3, permite prescribir dosis de fondo despreciando la componente de neutrones rápida (dosis ^{14}N + dosis gamma). Sería interesante evaluar la respuesta a diferentes niveles de dosis absorbida total de fondo, cercanos a los valores de dosis utilizados con protocolos BNCT.

Adicionalmente, combinar este tipo de estudio con un experimento comparativo de dosis vs respuesta utilizando una fuente gamma pura de referencia, permitiría evaluar la eficacia biológica *in vivo* de las distintas componentes de dosis de la fuente en este modelo experimental de cáncer bucal.

En cuanto a la radiotoxicidad observada en el presente trabajo llevado a cabo en la FCCT del RA-3, se manifestó mucositis en el tejido precanceroso de la bolsa del hámster inducida por los protocolos BPA-BNCT y (GB10+BPA)-BNCT. El grado moderado a alto de mucositis alcanzado con el tratamiento con BPA-BNCT sería limitante de dosis, sugiriendo que no sería conveniente escalar la dosis con este protocolo. La incorporación preferencial del BPA en las células basales del epitelio (Kreimann et al. 2001b) por un mecanismo activo a través del sistema L de transportadores de aminoácidos de membrana (Wittig et al. 2000), podría causar daño preferencial en las células basales del epitelio del tejido precanceroso cuando se realiza el tratamiento con BPA-BNCT, exacerbando así la mucositis en este tejido. La incorporación homogénea de GB-10 vía mecanismos de difusión daría lugar solamente a un grado de mucositis leve. Sin embargo, en todos los casos este efecto secundario fue reversible y aceptable en vista del efecto asociado de control tumoral. Hay que tener en cuenta que la mucositis confluyente es un efecto secundario frecuente durante la radioterapia convencional para los tumores de cabeza y cuello avanzado, y sería el efecto potencialmente limitante de la dosis.

Finalmente, se puede concluir que fue demostrado el éxito terapéutico de diferentes protocolos de BNCT para el tratamiento de cáncer bucal experimental *in vivo*, utilizando la FCCT del reactor RA-3 con el sistema de blindaje neutrónico adaptado al modelo de estudio.

Capítulo 3

3 Aplicación de BNCT al tratamiento de un modelo experimental de metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorrectal en la facilidad de irradiación central de la columna térmica del reactor RA-3

3.1 Metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorrectal

Excluyendo los tumores de piel no melanóticos, la suma de los cánceres de colon y recto (cáncer colorrectal) representa el tercer tipo de cáncer más frecuente, y también es la tercera o cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo (considerando ambos sexos), y la segunda causa de muerte por cáncer en nuestro país según informes nacionales (ver Introducción general).

Las metástasis hepáticas son la primera causa de tumores malignos en el hígado y constituyen la segunda localización secundaria más frecuente de las enfermedades neoplásicas malignas, sólo precedida por la localización linfonodal (Martínez et al. 2008).

En particular, 50% de los pacientes con cáncer colorrectal (CCR) desarrollan metástasis en el hígado, las cuales son responsables de dos tercios de las muertes debidas a esta enfermedad. Contrariamente a otras localizaciones a distancia, las metástasis hepáticas son consideradas una enfermedad locorregional, ya que un tratamiento local puede mejorar la sobrevida global en este grupo de pacientes (Cardoso et al. 2009). El único tratamiento estándar potencialmente curativo de pacientes con metástasis hepáticas colorrectales (MHCR) es la resección quirúrgica de las metástasis o su combinación con el tratamiento ablativo localizado (p/ej. radiofrecuencia, crio-terapia) (Van den Eynde and Hendlisz 2009).

La tasa de sobrevida a 5 años de pacientes luego del tratamiento quirúrgico, oscila entre el 25% a 58%, comparada con el 0% a 5% de pacientes que no se operan. Desafortunadamente, solo entre el 10 y el 25% de los pacientes con MHCR reúnen inicialmente los requisitos necesarios para someterse a dicho procedimiento (Adam et al. 2011, Zendel et al. 2014). El tamaño, localización y número de las metástasis, su presencia en ambos lóbulos y la presencia de enfermedad extra-

hepática son factores de mal pronóstico que condicionan las alternativas de tratamiento (Figueras et al. 2001). A su vez, la recurrencia local después de la cirugía debido a la enfermedad residual microscópica, ocurre en la mayoría de los pacientes (Ruan and Warren 2005).

En los últimos 5 años, la combinación de algunas drogas quimioterapéuticas ha logrado inducir una respuesta tumoral, u ocasionalmente ha servido como neoadyuvante haciendo resecables casos de MHCR que no lo eran, aunque aún se deben realizar ensayos controlados al respecto (Van den Eynde and Hendlisz 2009, Adam et al. 2011, Zendel et al. 2014).

En cuanto a la terapia radiante, la radiosensibilidad del hígado, limita el tratamiento eficaz de las metástasis hepáticas sin exceder la radiotolerancia del hígado (Jirtle et al. 1984). El parénquima hepático tolera poco los amplios volúmenes de tratamiento implicados en radioterapia convencional utilizando fotones o electrones (Suzuki et al. 2000). Sin embargo, los avances más recientes en radioterapia externa utilizando fotones, incluyendo radioterapia 3D conformacional o radioterapia de intensidad modulada (RTIM), han contribuido a circunscribir parcialmente estos efectos no deseados (Suzuki et al. 2007, Kim et al. 2005, Thomas et al. 2005).

3.2 BNCT como alternativa de tratamiento de MHCR

Las terapias dirigidas capaces de destruir selectivamente las células tumorales preservando el tejido normal, podrían mejorar la eficacia y reducir la toxicidad. En este contexto, se ha propuesto la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) como potencial tratamiento de casos de metástasis hepáticas derivadas de CCR, múltiples, bilobares, irresecables, y resistentes a quimioterapia. (Zonta et al. 2006, Suzuki et al. 2007, Altieri et al. 2004, Wittig et al. 2008, Cardoso et al. 2009). Considerando al BNCT una técnica basada en un direccionamiento biológico y no geométrico (como ocurre en el caso de la radioterapia convencional), potencialmente permitiría dañar selectivamente las células tumorales infiltrantes en el tejido sano en general, y las micrometástasis en particular, un desafío en las terapias oncológicas actuales (Cardoso et al. 2007).

Desde el punto de vista de la investigación pre-clínica, estudios en un modelo experimental de metástasis hepática pueden contribuir al entendimiento de la radiobiología de la aplicación de BNCT a esta patología, y a respaldar y mejorar el diseño de protocolos clínicos terapéuticamente útiles y más seguros. El presente trabajo fue realizado en este sentido, de acuerdo con los objetivos que se plantean más adelante.

3.3 Antecedentes clínicos recientes

La aplicación del BNCT para el tratamiento de metástasis hepáticas multifocales fue propuesta por primera vez por un grupo de investigadores de la Universidad de Pavia, Italia, a través del proyecto TAOOrMINA (Project for Advanced Treatment of Organs by Means of Neutron Irradiation and Autotransplant or TAOOrMINA project) (Zonta et al. 2006, Pinelli 2001). Este proyecto se basó en la idea novel de aplicar BNCT a un órgano aislado o *ex-situ*, el cual, luego del tratamiento, sería reimplantado de acuerdo a un procedimiento de autotransplante. Hasta ese momento todos los tratamientos se habían realizado *in-situ*, irradiando con neutrones la zona del paciente a tratar.

La irradiación del hígado aislado plantea la posibilidad del tratamiento de todos los tumores independientemente de sus posiciones, formas y tamaños, dado que potencialmente se puede alcanzar una irradiación homogénea en todo el volumen irradiado. De esta forma se lograría maximizar la dosis entregada al volumen tumoral, siendo el único órgano limitante de dosis el hígado sano. Además, la técnica de autotransplante evita los efectos de rechazo existentes en el trasplante habitual, ya que el paciente recibe su propio hígado tratado. Como se mencionó anteriormente, el hecho que BNCT sea además una modalidad terapéutica de targeting “biológico” y no conformacional, resulta particularmente interesante para el tratamiento de metástasis difusas en el hígado porque permitiría tratar células infiltrantes en tejido sano que no son localizables geoméricamente.

En el año 2001 el método *ex situ* (BPA-BNCT) fue aplicado en Pavia, Italia, por primera vez sobre el hígado aislado de un paciente. El órgano estaba afectado por metástasis difusas de carcinoma de colon. Una semana posterior al tratamiento, las imágenes por Tomografía Axial Computada (TAC) mostraron áreas de tejido necrótico en las ubicaciones de los nódulos tumorales (Pinelli et al. 2001, Zonta et al.

2009). El paciente fue dado de alta a los 40 días de haber sido tratado, en buena condición general, con todas las funciones recuperadas. Los controles sucesivos demostraron una mejora progresiva del estado de salud del paciente, mostrando una calidad de vida excelente. Sin embargo, 20 meses después del tratamiento el paciente presentó signos de recurrencia de la enfermedad (evidenciada mediante marcadores sistémicos). Se detectó una recidiva en hígado que fue operada y luego el paciente fue sometido a quimioterapia. Al año siguiente, el paciente presentó recurrencias a nivel abdominal que resultaron resistentes a quimioterapia e inmunoterapia y el paciente finalmente falleció, 44 meses post tratamiento con BNCT (Zonta et al. 2009).

En julio del 2003, el mismo procedimiento (BPA-BNCT ex situ) fue aplicado nuevamente a otro paciente para el tratamiento de metástasis hepáticas irresecables, sin opción terapéutica, derivadas de un carcinoma de recto. En este caso también se logró un control de las metástasis, según lo documentado, entre los 10 y 20 días posteriores al tratamiento (Zonta et al. 2009). Sin embargo, la evolución clínica del paciente empeoró al final del primer mes. El paciente presentaba una cardiomiopatía previa e incurrió en subsecuentes complicaciones circulatorias consistentes en trombosis de la arteria hepática (posiblemente vinculadas a la generación de grandes cantidades de material necrótico producto del control tumoral), y la posterior falla cardíaca que le causó la muerte 33 días posteriores al tratamiento.

El “síndrome post-irradiación” observado fue similar en ambos pacientes, con idénticos síntomas y desarreglos bioquímicos, condición clínica que probablemente contribuyó a la muerte del segundo paciente con cardiomiopatía (Zonta et al. 2009).

Estas dos aplicaciones del tratamiento fueron realizadas sobre pacientes terminales, demostrando que la aplicación del método ex situ es realizable, con resultados prometedores en cuanto al control local del tumor. Sin embargo, las conclusiones se basan solo en estos dos casos testigo, ya que ese proyecto fue suspendido en Italia, no registrando un número de casos que permita sacar conclusiones definitivas (Zonta et al. 2009).

Posteriormente, Suzuki y colaboradores (2007) realizaron un estudio piloto confirmando la factibilidad de la aplicación de BNCT en la modalidad *in-situ* para el tratamiento de un paciente con carcinoma hepatocelular (CHC). El paciente fue

tratado con (BPA + BSH)-BNCT en su lóbulo derecho y con un tratamiento de quimioembolización arterial hepática en el lóbulo izquierdo. A un mes del tratamiento, los tumores tratados con BNCT permanecieron sin cambios mientras que los tratados con quimioembolización crecieron. Luego de 3,5 meses post-BNCT, los tumores tratados mostraron nuevamente un crecimiento y el paciente murió por una disfunción del hígado causada por el progreso del CHC, 10 meses posteriores al tratamiento con BNCT. Aunque no se pudo concluir la efectividad del BNCT, los autores del trabajo confirman la factibilidad de uso de esta técnica para el tratamiento de CHC.

En la Argentina, desde el año 2004, en base al trabajo realizado en la Universidad de Pavia, se desarrolla un proyecto multidisciplinario con la finalidad de realizar los estudios que permitan llevar adelante tratamientos clínicos con BNCT *ex-situ*, en pacientes con metástasis en hígado derivadas de carcinoma de colon, que se presenten multifocales, irresecables, bilobares y resistentes a quimioterapia, y cuya única opción terapéutica sea un tratamiento paliativo. A diferencia del proyecto italiano, donde se irradió la totalidad del hígado, el proyecto local contempló irradiar solamente una parte del lóbulo izquierdo. Esta nueva propuesta, basada en la resección parcial del hígado, plantea una exposición del paciente a un riesgo menor versus la resección total, ya que no involucraría una fase an-hepática (ausencia de hígado), y permitiría que la funcionalidad hepática post-operatoria no dependiera exclusivamente de la integridad de los segmentos tratados con BNCT. Asumiendo una diseminación metastásica en todo el hígado, la técnica propuesta involucraría: **1)** la administración del compuesto borado, **2)** la extirpación de una porción del lóbulo izquierdo (segmentos II y III) en el tiempo preestablecido post-administración del compuesto borado, **3)** el transporte de la porción de hígado extirpada al reactor para su posterior irradiación con neutrones y, finalmente, **4)** la reimplantación de la porción del hígado tratado con BNCT en el mismo paciente. Luego de un tiempo de espera se provocaría una atrofia parcial en el lóbulo derecho del hígado, induciendo la regeneración de los segmentos tratados con BNCT, de manera de producir una suficiente masa de hígado sano para permitir la resección de la porción restante de hígado enferma.

Sin embargo, esta propuesta presenta algunas restricciones/objeciones. Por un lado plantea una intervención quirúrgica más compleja. A su vez presenta la

particularidad de exponer al paciente a un período en el que conviven: la enfermedad sin tratamiento en una porción del hígado junto con la sección de hígado tratado, mientras se aplica un estímulo de regeneración hepática (se desconoce si esta inducción de la regeneración hepática podría ser un estímulo de crecimiento para las células cancerosas que no fueron tratadas). Estas objeciones llevaron a que otro grupo de médicos argentinos se interesara por el tratamiento del hígado completo, con algunas variantes técnicas, en la línea original de trabajo planteada por los investigadores italianos.

Ambas técnicas de autotrasplante (irradiación de hígado parcial o total) involucran la perfusión del órgano con una solución de preservación, por ejemplo solución de Wisconsin (W), al igual que en un procedimiento estándar de trasplante, que sirve también para mantener al órgano en hipotermia durante la irradiación con neutrones (Crawley y Gadan et al. 2007). Debido a la importancia de conocer la biodistribución del compuesto boroado para prescribir las dosis necesarias para alcanzar el control tumoral sin exceder la radiotolerancia del hígado, es de interés conocer la concentración de boro en el hígado y las metástasis luego de la perfusión con la solución de preservación. Estas cuestiones fueron abordadas por Cardoso y colaboradores en nuestro país a nivel clínico en el año 2009 (Cardoso et al. 2009), con resultados preliminares que demuestran una disminución considerable de la concentración de boro luego de la perfusión con la solución de preservación, estableciendo la importancia de considerar este proceso en la planificación del tratamiento clínico.

3.4 Antecedentes de estudios experimentales

A nivel experimental se realizaron varios estudios de biodistribución de boro en modelos animales con tumores de diferente etiología en hígado (Pinelli et al. 2001, Roveda et al. 2004, Suzuki et al. 2004, Liao et al. 2010).

También se registran estudios de BNCT en modelos experimentales empleando criterios de valoración relativos, aunque indirectos, al control tumoral (Nano et al. 2004, Suzuki et al. 2000). En el primer trabajo citado, Nano y col. estudiaron el efecto del BPA-BNCT en el tratamiento de metástasis de adenocarcinoma de colon inducidas en el hígado de ratas BDIX a partir de la inyección intra-esplénica de células singeneicas (DHA/K12/TRb), irradiando el

hígado con metástasis aislado de las ratas (*ex-situ*) y trasplantando el hígado tratado a otro animal. Si bien lograron observar signos de daño y necrosis y la presencia de células apoptóticas, el estudio se vio restringido a una ventana de 4-6 días post-tratamiento debido a complicaciones por la intolerancia inmunológica en el trasplante alogénico. En el caso del trabajo de Suzuki y col., estudiaron el efecto del BPA-BNCT y el BSH-BNCT sobre metástasis inducidas en el hígado de ratones a partir de una línea celular de carcinoma de células escamosas (SCCVII), a través de un ensayo de clonogenicidad de células tumorales obtenidas *ex-vivo* luego del tratamiento. En este caso, solo el tratamiento con BPA-BNCT mostró disminución significativa en la sobrevivencia celular, en comparación con el tratamiento con iguales niveles de dosis absorbida de radiación de fondo o el tratamiento con radiación gamma. Los autores también evaluaron el efecto sobre hepatocitos y calcularon factores de eficacia biológica relativa (RBE) con el fin de estimar las dosis equivalentes. Sin bien el resultado se encuentra acotado al tipo celular estudiado y a una evaluación de respuesta *ex-vivo* sobre las mismas, los autores sostienen que el tratamiento con BPA-BNCT aportaría un beneficio terapéutico (es decir, la reacción de captura en boro causaría un mayor daño a los tumores que a los hepatocitos circundantes), para el tratamiento de tumores hepáticos.

Recientemente, Sy-Yu y col., de Taiwan, publicaron un trabajo interesante donde se evalúa la eficacia de la aplicación de BNCT mediado por ácido bórico para el tratamiento de carcinoma hepatocelular, utilizando un modelo experimental basado en la implantación de células en el hígado (Sy-Yu Lin et al. 2013). El ácido bórico (BA = H_3BO_3) es una molécula sin carga, pequeña (61,83 de peso molecular), que difunde rápidamente en forma pasiva dentro de los fluidos del cuerpo. Pese a que uno no esperaría que el BA se incorpore preferencialmente a tumor, los autores demostraron cierto grado de selectividad en la incorporación de BA a tumor vs hígado (luego de 30 minutos de la administración del compuesto). Asimismo, se demostró una respuesta inducida por la aplicación del BA-BNCT, sin producir un daño en el hígado, hasta 80 días posteriores al tratamiento. Cabe mencionar que el trabajo no incluye una comparación del efecto de BNCT vs la dosis de fondo. El análisis de la irrigación de los tumores reveló una disminución del flujo sanguíneo luego del tratamiento con BA-BNCT. Se postuló que la respuesta estaría vinculada a un daño preferencial en los vasos aberrantes que irrigan los tumores. Un mecanismo análogo fue el que se observó en nuestro laboratorio utilizando el modelo de cáncer

bucal del hámster, cuando se aplicó un tratamiento de BNCT mediado por el compuesto GB-10, también de características difusivas (Trivillin et al. 2006; cita de esta tesis).

En un contexto clínico, para brindar un beneficio en el tratamiento de tumores en hígado, la reacción de captura neutrónica en boro debe causar más daño en el tumor que en el hígado que lo rodea, considerando un caso de tratamiento *ex-situ*, y de otros tejidos expuestos, para el caso de un tratamiento *in-situ*. Dado que en cualquier situación de tratamiento clínico (*ex-situ* o *in-situ*), el hígado sano y el tumor se irradian simultáneamente, la ganancia terapéutica dependerá fundamentalmente de una respuesta diferencial asociada con el compuesto borado que se utilice, ya sea por un alto factor de acumulación (tumor/hígado), una microdistribución particular u otros mecanismos asociados con un daño preferencial (p/ej. el posible efecto mencionado sobre los vasos aberrantes del tumor).

Los trabajos resumidos aquí resaltan la relevancia de llevar adelante estudios en modelos de tumores en hígado a nivel experimental, que contribuyan a evaluar nuevas estrategias y a la comprensión de la radiobiología del BNCT. Este tipo de estudio contribuye a la toma de decisión sobre la conveniencia del BNCT para el tratamiento de metástasis hepáticas, y para la optimización del diseño de protocolos clínicos seguros y terapéuticamente útiles.

En principio, considerando como alternativa clínica el tratamiento *ex-situ* de hígado parcial propuesto en el proyecto de BNCT en Argentina, nuestro grupo estudió la potencial radiotoxicidad de BNCT en hígado en términos una potencial inhibición de su capacidad regenerativa, (Cardoso et al, 2007). En este trabajo se evaluó el efecto de dosis terapéuticas de BPA, GB-10 y (GB-10 + BPA) y de la aplicación de BNCT mediado por estos compuestos borados, sobre la regeneración del hígado sano y la función hepática sana en rata Wistar usando la hepatectomía parcial como estímulo regenerativo. Los criterios de evaluación fueron el seguimiento del peso corporal, la relación entre el peso del hígado y el peso corporal, la síntesis de ADN medida por la incorporación de 5-bromo-2-deoxiuridina, hemograma, función renal en términos de niveles de urea y creatinina en sangre, función hepática en términos de albúmina sérica, bilirrubina total y directa, enzimas hepáticas (alanina y aspartato transaminasas) y, finalmente, evaluando la histología y la arquitectura del hígado. Como resultados generales, se observó que ninguno de los protocolos de

BNCT evaluados, causaron alteraciones en la regeneración del hígado sano, ni en la función/proliferación del hígado regenerado o su histología/arquitectura. Se concluyó que los protocolos de BNCT a las dosis seleccionadas, no perjudicarían la capacidad de regeneración de los hepatocitos normales.

Mediante la contribución a este trabajo se desarrollaron tareas que formaron parte de la capacitación inicial para llevar adelante esta tesis, este capítulo en particular y la elaboración de la siguiente publicación:

- Effect of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) on normal liver regeneration: towards a novel therapy for liver metastases. Cardoso JE., Trivillin VA., Heber EM., Nigg DW., Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Itoiz ME., Bumashny E, Pozzi E, and Schwint AE. Int. J. Radiat. Biol., Vol. 83, 10, October 2007, pp. 699 – 706.

3.5 Objetivo específico y resumen referido a este capítulo

Considerando el marco local e internacional descripto, en cuánto al interés de aplicar la técnica del BNCT para el tratamiento de MHCR, ***el objetivo del presente estudio fue realizar una evaluación sistemática de la eficacia terapéutica del BNCT en un modelo experimental de metástasis hepática de adenocarcinoma de colon en ratas, y considerar la potencial radiotoxicidad del tratamiento en el hígado.***

Para alcanzar este objetivo, primero se realizó la puesta a punto de un modelo experimental de metástasis hepáticas adaptado a realizar estudios de BNCT *in vivo* en el Reactor Nuclear RA-3, fuente de neutrones disponible para llevar adelante las experiencias. Luego, se desarrolló y caracterizó dosimétricamente un sistema adecuado de blindaje neutrónico para proteger el cuerpo de los animales durante los tratamientos. Finalmente, se evaluó la respuesta del tumor e hígado al tratamiento con BPA-BNCT en el modelo experimental *in vivo*. Sobre la base de estos resultados se discuten distintos aspectos radiobiológicos del BNCT a nivel experimental, intentando contribuir al conocimiento que sirva para optimizar futuros tratamientos clínicos con esta técnica.

3.6 Elección del modelo experimental

Dado que no contábamos con un modelo de estudio de metástasis hepáticas, para cumplir con el objetivo, era fundamental elegir el modelo a utilizar. Un hipotético modelo animal ideal para el estudio de metástasis hepáticas de origen colorectal debería imitar todos los aspectos morfológicos, de alteraciones bioquímicas y del comportamiento biológico de la enfermedad en humanos (Kobaek-Larsen et al. 2000), a la vez que debería ser práctico, predecible, y óptimo en términos de las consideraciones éticas (de Jong et al. 2009).

Desde el punto de vista técnico, de Jong y colaboradores (2009) describen los aspectos que debería cumplir un modelo ideal de MHCR:

- Las células tumorales deben ser vitales y tener potencial metastático.
- Las células tumorales deben alcanzar e invadir el parénquima del hígado y subsecuentemente establecerse y crecer como nódulos tumorales.
- El modelo debe ser eficiente (una alta proporción de los animales utilizados deben exhibir las características requeridas).
- El modelo debe ser reproducible.
- El modelo debe ser práctico.

Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con un modelo que satisfaga todas estas condiciones. En consecuencia, la elección de un modelo involucra compromisos y decisiones según las características y necesidades experimentales de acuerdo al objetivo planteado (de Jong et al. 2009).

Los modelos de CCR generados por inducción química, por ejemplo, en general implican mucho tiempo y cuando ocurre la aparición de metástasis, lo hace en forma no sincronizada en distintos animales (de Jong et al. 2009).

Se seleccionó el modelo basado en la inoculación de células singeneicas de carcinoma de colon DHDK12/TRb en ratas BDIX, el mismo utilizado por el grupo dedicado a estudios de BNCT en Pavia, Italia (Nano et al. 2004, Roveda et al. 2004). La DHDK12/TRb es una línea celular de carcinoma de colon establecida, originalmente aislada de ratas BDIX con carcinoma de colon inducido químicamente con 1,2-dimetilhidralazina (Caruso et al. 1993, Maggiori et al. 2012). Por lo tanto, la asociación entre la línea celular DHD/K12 y las ratas BDIX es biológicamente compatible, siendo un modelo *in vivo* descrito y estudiado más extensamente en los

últimos años (Maggiori et al. 2012). Un aspecto relevante para destacar, es que el modelo involucra animales inmunocompetentes. Así, representa mejor el estado inmunológico de los pacientes con CCR que desarrollan metástasis, dado que el sistema inmune juega un rol clave en la respuesta a la enfermedad (de Jong et al. 2009, Maggiori et al. 2012). A su vez, los animales inmuno-deficientes muestran un estado de salud menos estable (de Jong et al. 2009).

Las vías más comunes de inoculación de las células en este modelo son la intra-portal y la intra esplénica (ya sea con o sin extirpación posterior del bazo). Estos métodos de inyección de células resultan ser relativamente sencillos, consistentes y eficientes para inducir metástasis múltiples en hígado. La inyección intra-portal de las células, se apoyaría en la generalmente aceptada hipótesis de la dispersión hematológica de las células de cáncer colorrectal en humanos a través del sistema portal. Esta sería una característica relevante y deseable para un modelo experimental de la enfermedad (de Jong et al. 2009, Maggiori et al. 2012). Sin embargo, el método de implantación no recrea el proceso de desarrollo de metástasis ya que la dispersión de las células no se produce desde el tumor original, luego de varias transformaciones que facilitan el evento metastático (Maggiori et al. 2012). También se pueden presentar complicaciones por la aparición de metástasis secundarias en pulmón, lo cual no resulta restrictivo si se eligen correctamente los tiempos de seguimiento. Sin embargo, la mayor dificultad que se presentó para la elección de este método de inoculación de células, fue desde un punto de vista práctico. Los nódulos metastásicos generados por esta técnica, se distribuyen de forma variable en todo el hígado, dificultando la evaluación y seguimiento de los mismos. Si bien actualmente existen métodos de seguimiento no invasivos con imágenes de alta resolución (por ej, PET-CT), se trata de equipos muy costosos a los cuales no tenemos acceso. Por otro lado, de acuerdo a las características de la fuente de neutrones disponible (reactor RA-3, sección 1.9), la prescripción de la dosis al tumor del tratamiento con BNCT para metástasis distribuidas en todo el volumen del hígado del animal, sería mucho más heterogénea que conociendo la ubicación de los nódulos.

Otro método para establecer nódulos metastásicos es por implantación sub-capsular o intraparenquimal de las células tumorales en una ubicación conocida del hígado (Caruso et al. 1993, de Jong et al. 2009). Este método de inducción de

tumores ha sido probado en experimentos para estudiar el efecto de terapias locales sobre las metástasis. Si bien esta vía de llegada de las células no imita la generación de metástasis como en la evolución natural de la enfermedad, reproduce el microambiente en el que se desarrollan las metástasis y presenta la gran ventaja práctica para el investigador, de poder evaluar la respuesta del tumor a la terapia en forma intraoperatoria, al conocer la localización de los nódulos tratados.

De acuerdo con los criterios de selección expuestos, nuestro grupo de trabajo decidió comenzar a estudiar la aplicación de BNCT, utilizando la línea celular de carcinoma de colon DHD/K12/TRb, singeneicas con ratas BDIX inmunocompetentes, utilizando el método de implantación sub-capsular de células dentro del hígado. Luego, se realizó un estudio piloto para determinar las condiciones experimentales óptimas para obtener nódulos hepáticos sub-capsulares medibles, bien localizados, sin diseminación pulmonar o peritoneal y vascularización adecuada. Este estudio se describe en el siguiente apartado.

Para finalizar esta sección, vale la pena mencionar un trabajo realizado en los últimos años, en forma paralela al desarrollo de esta tesis. Maggiori y colaboradores describieron un modelo que combina la inoculación de células por vía intraportal y sub-capsular en el mismo animal (Maggiori et al. 2012). Por este método combinado, los autores del trabajo demostraron la puesta a punto de un modelo experimental *in vivo*, en animal inmunocompetente, de metástasis hepáticas bilobares altamente controlable y reproducible, que suma las bondades de ambos métodos de inoculación. Presenta una macro-metástasis perfectamente localizada en el punto de inoculación que facilita el seguimiento experimental (por vía sub-capsular de la misma forma que se aborda en el presente trabajo de tesis), y un número acotado de micro-metástasis difusas, que hace el modelo más atractivo para estudios pre-clínicos, al ajustarse mejor a las situaciones clínicas que presenta la enfermedad en humanos (la presencia simultánea de macro-metástasis y múltiples micro-metástasis no detectables, éstas últimas asociadas en general con una recurrencia de la enfermedad post-tratamiento).

3.7 Puesta a punto del modelo experimental de metástasis hepáticas de cáncer colorectal

3.7.1 Cultivo de células

Las células singeneicas de cáncer de colon DH/DK12/TRb (ECACC, Reino Unido), fueron replicadas y mantenidas en un medio de cultivo compuesto por 50% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen) y 50% F-10 (Ham's F-10 Nutrient Mixture, Invitrogen), con el agregado de suero fetal bovino al 10% (Foetal Calf Serum Irradiated – PAA Laboratories GMBH (Austria)). Una vez que los cultivos alcanzaron un 80-90% de confluencia, el medio de cultivo fue descartado y las células fueron: lavadas 3 veces con PBS, desprendidas con el agregado de Tripsina+EDTA, suspendidas en medio F10-DMEM con suero y concentradas por centrifugación. El pellet de células obtenido se re-suspendió en medio F10-DMEM sin suero y se contabilizó el número de células vivas por exclusión con solución de Trypan blue en cámara de Neubauer. Finalmente se realizaron pruebas inoculando diferentes volúmenes a una misma concentración de células o, mediante diluciones seriadas, se obtuvieron volúmenes fijos de 25 µl con diferentes concentraciones de células.

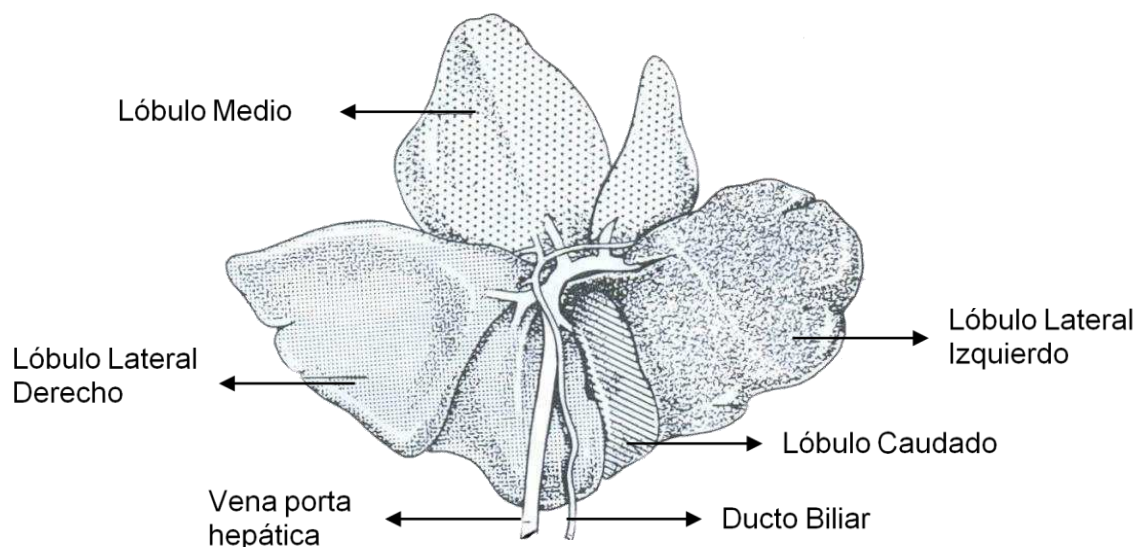
3.7.2 Método de inoculación de células en forma sub-capsular

Se emplearon ratas BDIX (Charles River Lab., MA, EE.UU.) de ambos sexos, de 170 a 300 gr de peso corporal, mantenidas en jaulas individuales con alimento y agua a libre demanda, en una habitación con ciclos de luz-oscuridad de 12 hs; y células singeneicas de cáncer de colon DHD/K12/TRb (ECACC, Reino Unido). Se realizó un estudio piloto inicial con 30 animales.

El hígado de la rata está compuesto de cuatro lóbulos (Figura 3.1). Los lóbulos medio y lateral izquierdo comprenden alrededor del 70% del hígado. El tercer lóbulo en tamaño es el lateral derecho que se superpone un poco con el lóbulo medio hacia la derecha. El lóbulo más pequeño es el lóbulo caudado, que posee dos segmentos que rodean la parte abdominal del esófago. Los lóbulos caudado y lateral derecho, se encuentran unidos a lo largo de la vena cava. Los lóbulos del hígado

están ligados entre sí por pliegues del peritoneo, los cuales constituyen los ligamentos suspensorios de los lóbulos (Waynforth HB y Flecknell PA 1992).

Figura 3.1 Vista de la superficie dorsal del hígado de una rata. Extraído de Waynforth y Flecknell, 1992.



Los animales anestesiados (ketamina 36,5 mg/kg de m.c.+ xilazina 5,4 mg/kg de m.c.), fueron ubicados en posición de cúbito dorsal, con la cola hacia el investigador, fijando suavemente las patas del animal sobre una mesa quirúrgica de experimentación. La piel del abdomen de los animales fue rasurada y la zona de incisión fue desinfectada con iodopovidona o alcohol etílico.

Se procedió a practicar una laparotomía de la siguiente forma: se realizó una incisión en la piel sobre la línea media del abdomen, extendiéndose justo por debajo del cartílago xifoideo, hasta alrededor de la mitad de la distancia a la base de la cola (Figura 3.2). Luego se realizó una segunda incisión similar en los músculos abdominales. Realizando una presión suave del contenido abdominal con los dedos desde los costados del animal justo por debajo del hígado, se procedió a exteriorizar ligeramente el hígado del animal (Figura 3.2).

El ligamento transparente suspensorio que une la cara convexa del hígado al diafragma (ligamento falciforme), se puede cortar con un par de tijeras de punta redonda para lograr una mayor libertad de movimiento del hígado (Figura 3.3).

Figura 3.2 Primeros pasos a seguir durante la cirugía para realizar la inoculación de las células, Izquierda: esquema de una rata en posición de cúbito dorsal para practicar la laparotomía. La línea vertical marca el lugar por donde debe realizarse la incisión. Derecha: procedimiento para exteriorizar los lóbulos medio e izquierdo del hígado. Extraído de Waynforth y Flecknell, 1992.

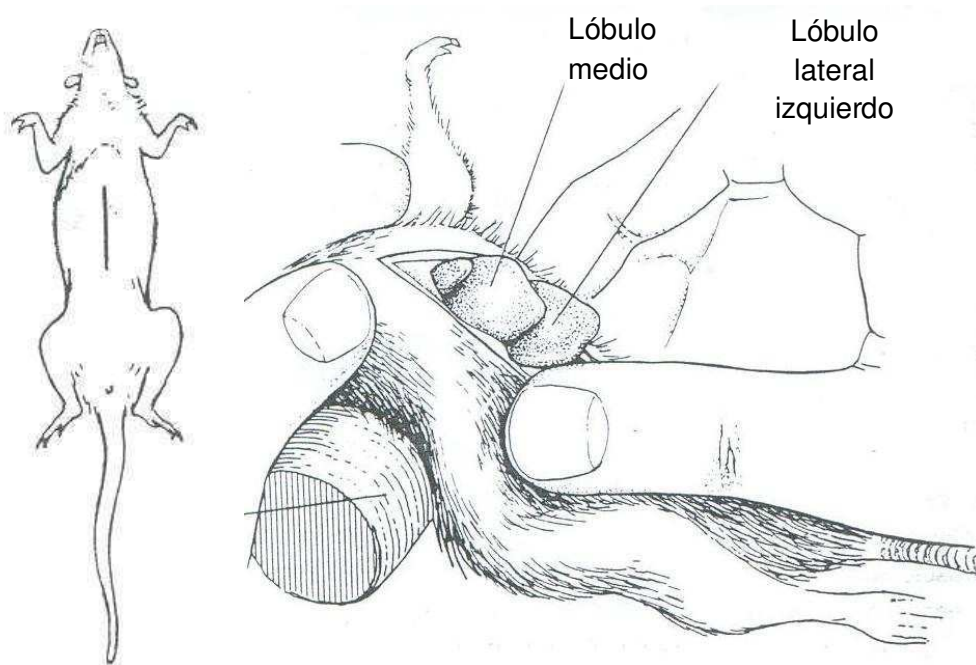
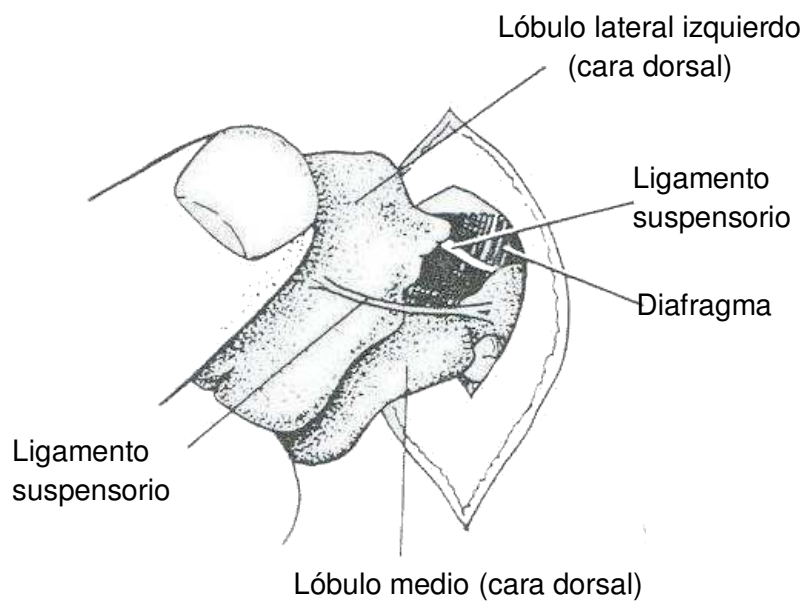


Figura 3.3 Detalle de los ligamentos suspensorios que se pueden cortar para lograr una mejor movilidad de los lóbulos hepáticos. Extraído de Waynforth y Flecknell, 1992.

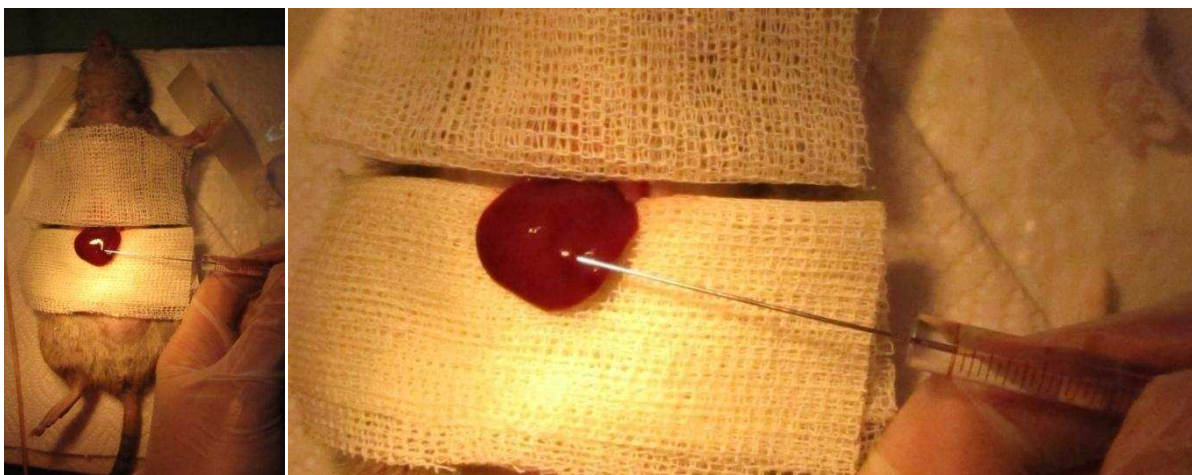


Luego se colocó una pieza de gasa seca estéril a lo largo del límite de la incisión en la piel y se extrajeron los lóbulos medio y lateral izquierdo de la cavidad

abdominal de la misma forma que antes, dejándolos ahora descansar sobre la gasa. En esta condición, se procedió a inocular el volumen de células DH/DK12/TRb en el lóbulo lateral izquierdo del hígado. Para ello se introdujo una jeringa tipo Hamilton con aguja de 22-gauge previamente esterilizada en alcohol 70% en agua destilada, penetrando cerca del extremo derecho del lóbulo, recorriendo superficialmente el parénquima hepático de derecha a izquierda aproximadamente un centímetro y llegando, con una localización lo más sub-capsular posible, al punto del implante.

Con la aguja ubicada en la posición deseada, se procede a descargar el volumen de células, observando en la superficie del hígado, donde se encontraba el extremo de la aguja, un nódulo pequeño de color claro del tamaño de una lenteja (Figura 3.4). Antes de retirar la aguja, se procedió a ejercer presión con un hisopo de algodón en el borde del nódulo de células justo en el final del recorrido de la aguja de forma de evitar que las células se escurran por el lugar que dejó la aguja al ser extraída. Manteniendo la presión se retiró lentamente la aguja y se ejerció presión con otro hisopo en el lugar donde se introdujo la aguja hasta contener el posible sangrado (aproximadamente entre 30 y 60 segundos fueron suficientes).

Figura 3.4 Procedimiento de inoculación de células DH/DK12/TRb en el lóbulo lateral izquierdo del hígado de ratas BDIX. Con la aguja ubicada en la posición deseada, se procede a descargar el volumen de células.



Finalmente los animales fueron suturados mediante sutura intradérmica para prevenir futuras reaberturas, y la zona de cirugía fue desinfectada con iodopovidona. Luego de la cirugía los animales fueron mantenidos bajo una lámpara de calor y vigilados hasta su recuperación de la anestesia.

Durante todo el período de duración de los experimentos, los animales fueron revisados y pesados periódicamente. En el caso de aparición de abscesos e infecciones de las heridas los animales fueron anestesiados para realizar curaciones.

3.7.3 Ensayos de puesta a punto del modelo

Por medio de la técnica descrita, se realizaron 1 ó varios inóculos aislados, intra-hepáticos, sub-capsulares en el lóbulo lateral, con un rango de 0,17 a 10 millones de células suspendidas en volúmenes de prueba de 8 a 140 µl de medio F10-DMEM, por inóculo. Los animales se sacrificaron a distintos tiempos post-inoculación (10 a 40 días), momento en el cual se les practicó una segunda laparotomía para explorar la superficie del hígado, observar la evolución de los tumores y tomar muestras del hígado con tumor. En varios casos se presentaron algunos inconvenientes en la segunda cirugía, como ser la adhesión de los lóbulos hepáticos, manipulados durante la inoculación de células, con parte del epiplón que se encuentra entre el estómago y el hígado. Algunas veces se observó la presencia de adherencias a otros órganos como al peritoneo visceral que recubre el estómago o el intestino, o incluso al peritoneo parietal que separa al diafragma, o cerca de la zona de la cicatriz de la incisión realizada durante la primera laparotomía. Este tipo de adherencias fueron separadas cuidadosamente tratando de no producir desgarros en el hígado, evitando un manipuleo excesivo que es la principal causa de la formación de éstas adherencias, que se incrementan al volver a operar a los animales. Cabe destacar que el riesgo de formación de adherencias también es alto a nivel clínico después de cirugías abdominales.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo fue que los animales a tratar tuvieran nódulos medibles, bien localizados, sin diseminación peritoneal ni pulmonar y una vascularización adecuada. De esta forma, se determinaron las condiciones potencialmente óptimas de trabajo. Posteriormente, las mismas fueron ensayadas en un segundo grupo de 56 ratas, con las cuáles se realizaron estudios de biodistribución de compuestos borados en el modelo y se evaluaron los tumores a nivel histológico (los experimentos de biodistribución no forman parte del presente trabajo de tesis). Para la evaluación histológica se realizó un procedimiento de rutina que consiste en la fijación de las muestras en formol 4% en PBS por al menos 24 hs,

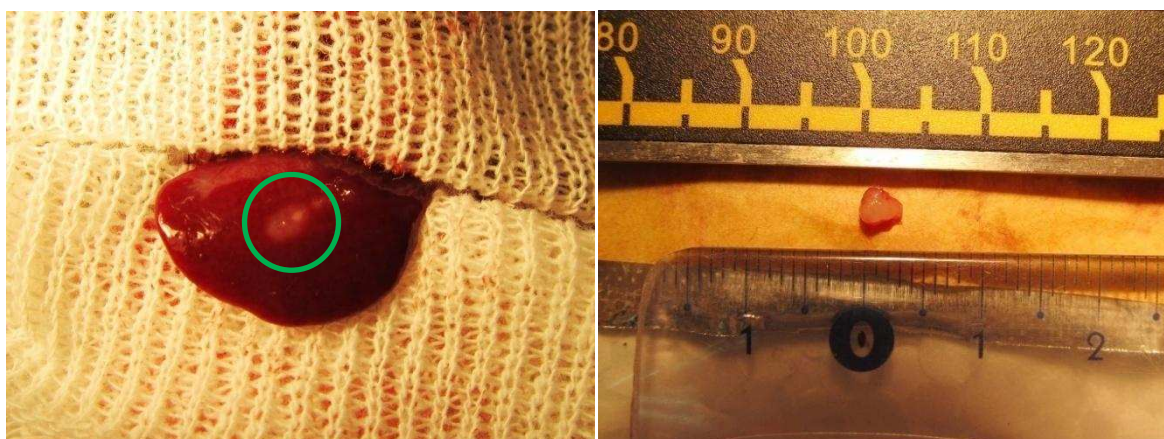
la inclusión en tacos de parafina y el corte por micrótopo. Los cortes fueron montados, desparafinados y teñidos con hematoxilina y eosina para su visualización al microscopio óptico.

3.7.4 Resultados de la puesta a punto del modelo

Se obtuvo crecimiento tumoral en 98% de las ratas ensayadas. En base al estudio piloto, se determinaron las condiciones óptimas de trabajo: inoculación de 0,5 millones de células en 10 µl de medio F10-DMEM en 1 ó 3 inóculos. Se verificó el crecimiento del tumor en todos los tiempos evaluados (10 a 40 días), y se definió como tiempo para obtener nódulos de forma reproducible aproximadamente los 13 días post-inoculación.

En el segundo grupo de 56 ratas, inoculadas con el volumen y la concentración definidos previamente, se verificó reproduciblemente el desarrollo de nódulos únicos, visibles, superficiales y mensurables sin diseminación peritoneal ni pulmonar luego de 13 +/- 1 día post-inoculación (Figura 3.5).

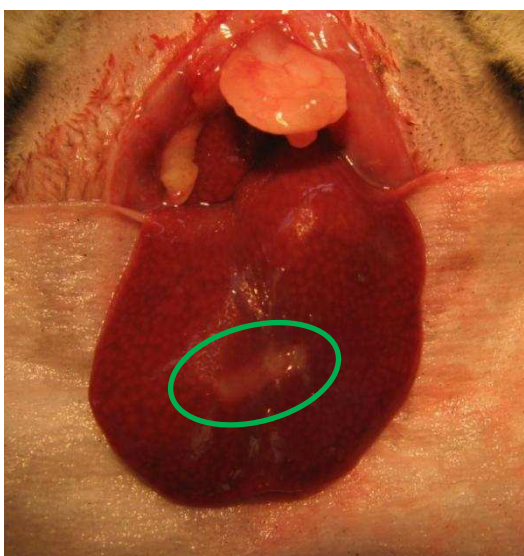
Figura 3.5 Izquierda: Imagen del lóbulo lateral izquierdo de una rata BDIX, 2 semanas luego de la inoculación sub-capsular de las células DH/DK12/TRb. En el centro del lóbulo se puede observar un único nódulo tumoral (círculo verde), ubicado superficialmente, que puede ser palpado y evaluado para su seguimiento post-tratamiento. Derecha: el mismo nódulo luego de ser disecado.



En aproximadamente el 50% de los casos, también se observó el crecimiento de células a lo largo del recorrido de la aguja con la cual se inoculan las células dentro del hígado, principalmente debido al arrastre o reflujo del volumen de inoculación al retirar la aguja (Figura 3.6). En algunos casos el nódulo tumoral se presentó más alargado, de espesor parejo o de mayor espesor donde se descargó

el inóculo (final de recorrido de la aguja). En una proporción menor de casos se llegó a observar crecimiento externo sobre la superficie del hígado, siempre en cercanía del punto donde se introdujo la aguja, donde es esperable una posible contaminación con células en la superficie externa del hígado.

Figura 3.6 Imagen del lóbulo lateral izquierdo de una rata BDIX, 2 semanas luego de la inoculación sub-capsular de las células DH/DK12/TRb. En el detalle (óvalo verde) se puede observar un único nódulo tumoral alargado, debido al crecimiento de células a lo largo del recorrido de la aguja de inoculación.



A nivel histológico, los nódulos se describen como tumores muy compactos, vascularizados y con formaciones glandulares típicas de adenocarcinoma, mostrando un patrón con mayor proporción de parénquima tumoral que estroma. Se evidencian células tumorales de forma y tamaño característico, con núcleos leptocromáticos y la presencia de numerosas mitosis (Figura 3.7). Este conjunto de características son similares a las descritas por otros autores en el mismo modelo (Caruso et al. 1993, Maggiori et al. 2012).

Luego de la cirugía, los animales presentaron una buena recuperación clínica general. Se observó una disminución en la ganancia de masa corporal los primeros días post-inoculación, coherente con una menor alimentación de los animales en ese primer período de recuperación de la intervención. En las Figuras 3.8 y 3.9 se presentan la evolución de la masa corporal promedio y la masa relativa al inicio (momento de la inoculación) para ambos sexos, donde se puede observar la recuperación de la ganancia de masa corporal 5 días post-cirugía. Luego de

aproximadamente 2 semanas de seguimiento la ganancia de masa corporal promedio relativa al momento de la inoculación fue del 7%.

Figura 3.7 Imagen histológica de un nódulo con estroma vascularizado, 13 días post-inoculación. La imagen superior, tomada a menor aumento (objetivo 20X), ilustra el crecimiento de las células de adenocarcinoma de colón en contacto con el parénquima hepático. A mayor aumento (objetivo 40X), imagen inferior, se puede observar la diferenciación glandular, células tumorales de forma y tamaño característico, con núcleos leptocromáticos y la presencia de numerosas mitosis.

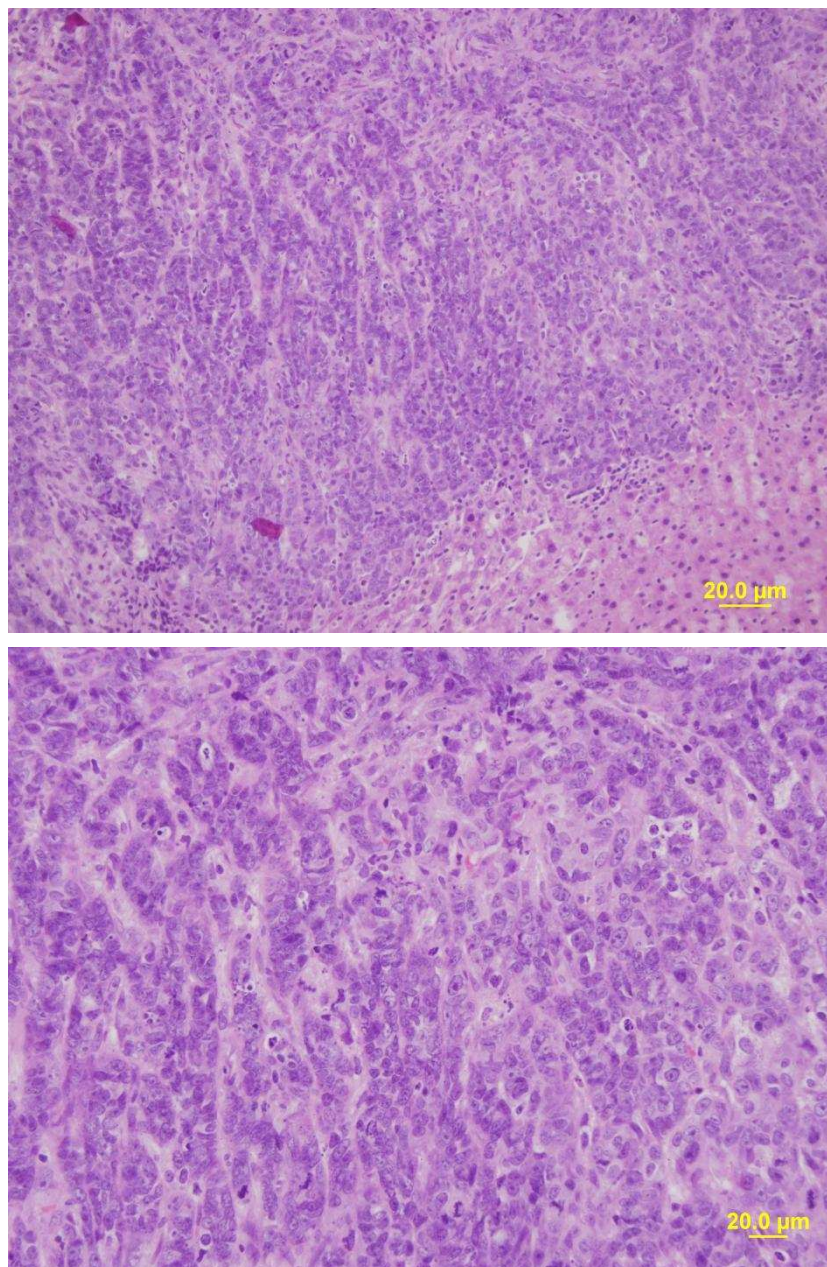


Figura 3.8 Masa corporal promedio (g) de las ratas BDIX para cada tiempo post inoculación. El tiempo 0 (t_0) corresponde al momento en que se realiza la inoculación de células en el hígado. Las barras de error representan +/- un desvío estándar.

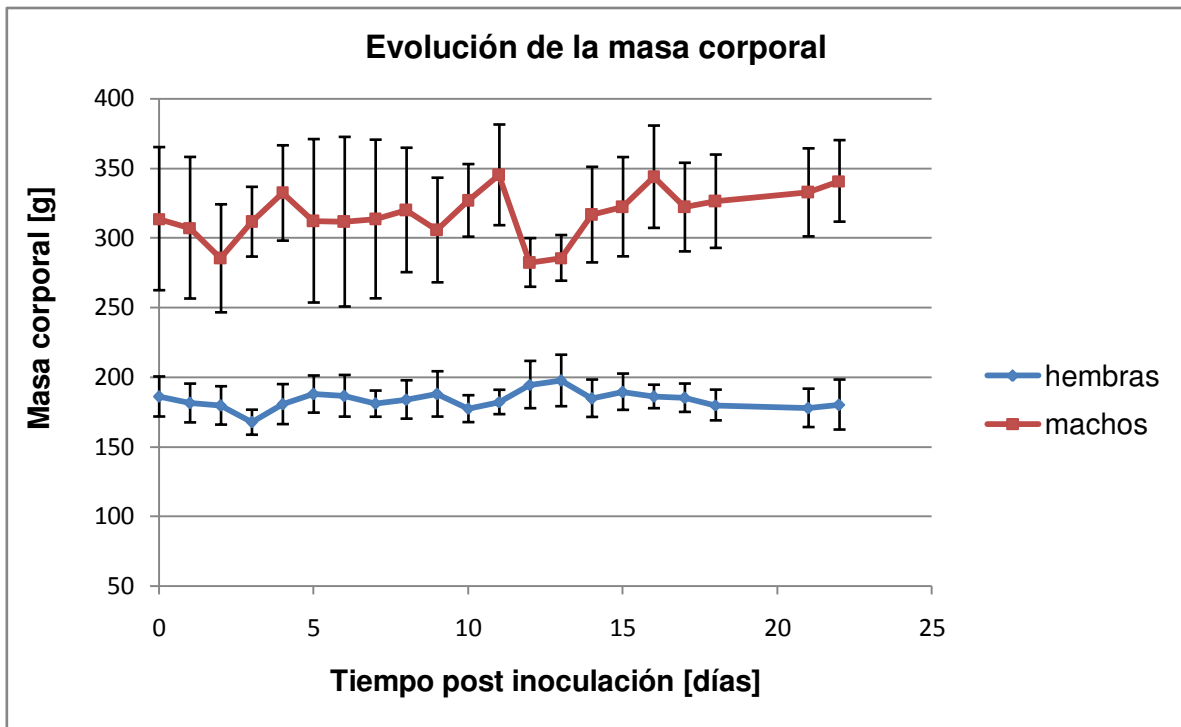
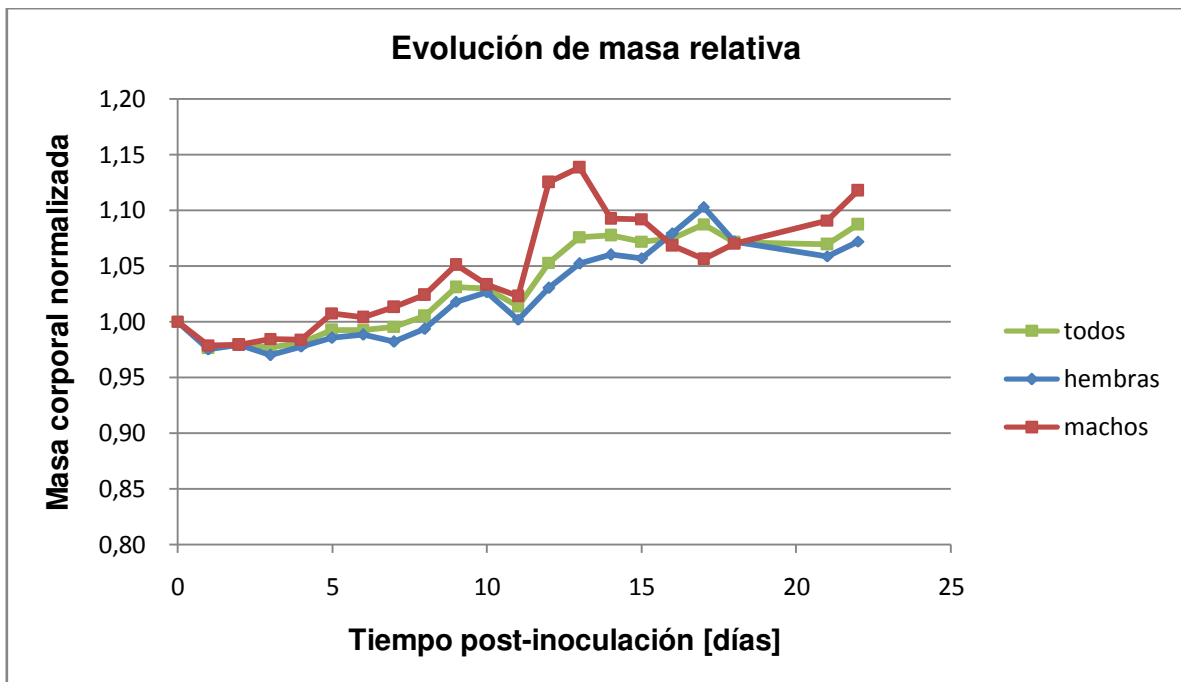


Figura 3.9 Masa corporal relativa a la masa corporal correspondiente al momento de la inoculación (masa a tiempo t / masa a tiempo t_0 ó masa corporal normalizada). En el gráfico se omiten los errores para una mejor visualización, siendo el desvío promedio del 5% y no mayor al 8% en ningún momento.



El uso de 1 inóculo disminuyó la aparición de adherencias y fue seleccionado para los estudios de BNCT *in vivo* mientras que para los estudios de biodistribución previos (Garabalino et al. 2011) se realizaron varios inóculos para aumentar la masa tumoral disponible para la medición de concentración de boro en tejido tumoral.

3.7.5 Conclusión de la puesta a punto del modelo

Según los requerimientos pre-establecidos, se logró poner a punto un modelo experimental reproducible de metástasis hepáticas localizadas, útil para llevar adelante estudios experimentales de BNCT. Se seleccionó el modelo de 1 inóculo para realizar estudios *in vivo* de BNCT en la facilidad de irradiación disponible en el reactor RA-3 ya que facilita la irradiación local y el blindaje del resto del cuerpo.

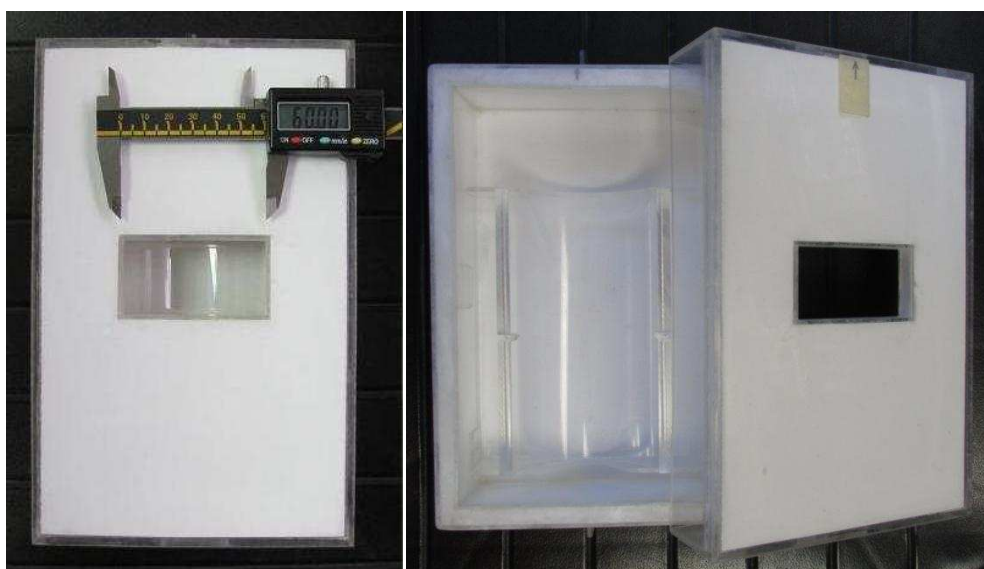
3.8 Desarrollo de un blindaje de neutrones para realizar estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de metástasis hepáticas seleccionado

El objetivo fue diseñar y construir un blindaje de neutrones adaptado al modelo de metástasis hepáticas seleccionado y al proceso de irradiación en la FCCT del reactor RA-3, que permitiera proteger el cuerpo del animal mientras se entrega una dosis terapéutica en la zona de interés (ubicación del nódulo tumoral).

3.8.1 Diseño del blindaje

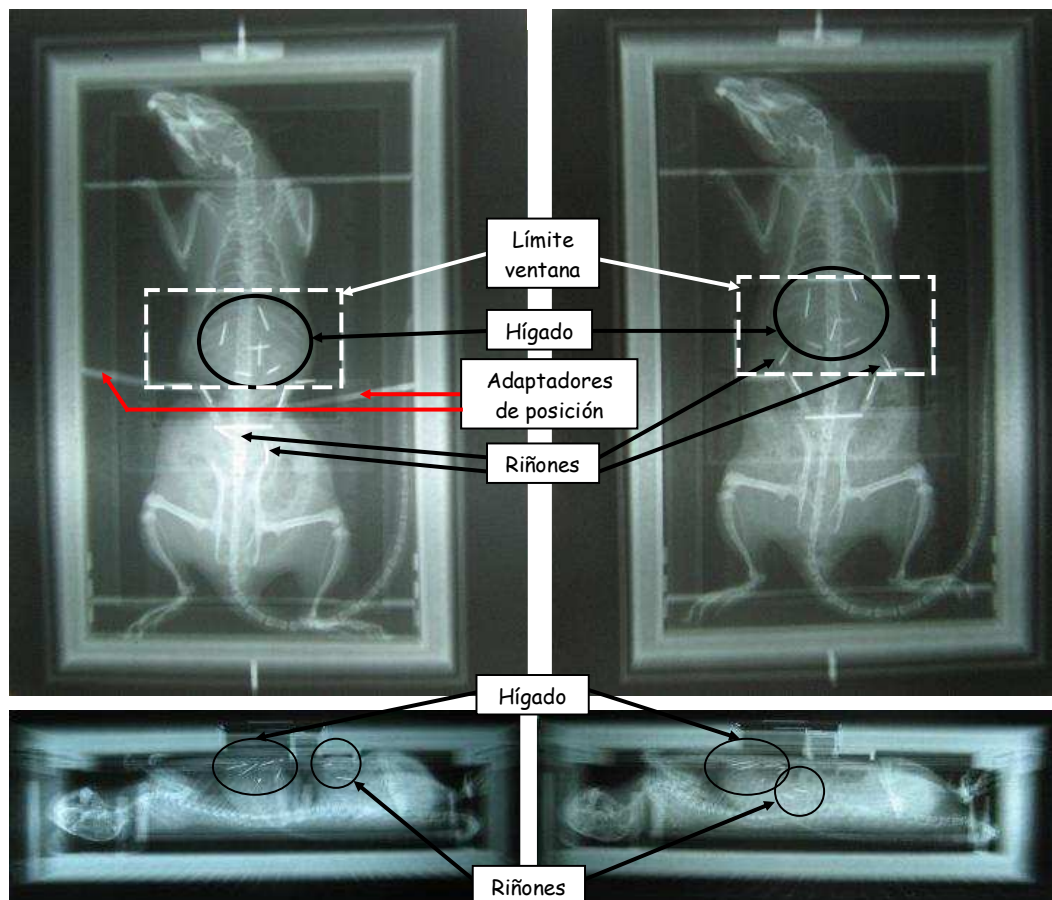
De forma análoga al diseño propuesto para el modelo de cáncer bucal (ver sección 2.6 del Capítulo 2), el blindaje consiste en una caja rectangular con tapa removible, con paredes dobles de acrílico conteniendo un relleno ininterrumpido de 6 mm de espesor de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ (95% enriquecido en ${}^6\text{Li}$, absorbente de neutrones térmicos) (Figura 3.10). La tapa presenta una ventana o apertura colimada (de 60 mm x 30 mm) que permite exponer la región de interés protegiendo el resto del cuerpo del animal (Figura 3.10).

Figura 3.10 Imágenes del blindaje de neutrones de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ desarrollado para la irradiación del hígado en el modelo experimental de metástasis hepáticas en ratas BDIX. En el interior se coloca una camilla de acrílico que sirve para posicionar al animal de forma reproducible.



Fue de particular importancia proteger el riñón, cercano al eje de exposición del hígado, dada la alta concentración del compuesto borado que se acumula en este órgano (ver Tabla 3.4 y Garabalino et al. 2011). Para cumplir con este requerimiento, se construyó una cama de acrílico de modo de ubicar reproduciblemente al animal dentro del blindaje, y se emplearon 2 paletas de acrílico, una a cada lado del animal, para posicionar los riñones fuera de la ventana de exposición. Con el fin de verificar el posicionamiento de los órganos, se realizó un estudio donde se tomaron placas radiográficas de animales de distintas masas corporales dentro del blindaje (Figura 3.11).

Figura 3.11 Radiografías longitudinales (fotos superiores) y laterales (fotos inferiores) de una rata BDIX ubicada dentro del blindaje. Se presenta el mismo animal con adaptadores para reposicionar los riñones alejándolos de la ventana de exposición (fotos izquierda) y sin adaptadores (fotos derecha). Las flechas rojas marcan la posición de los adaptadores. Con indicaciones en negro se señalan las posiciones de alambres ubicados en diferentes órganos de interés. El recuadro punteado en blanco define los límites de la apertura en la tapa del blindaje.



Se ubicaron pequeños alambres en la posición de los diferentes lóbulos hepáticos y de los dos riñones para una mejor visualización de tejidos blandos (Figura 3.11). En cada caso se evaluó la posición relativa a la ventana del hígado, la zona donde se implanta el nódulo tumoral, los riñones y otros órganos limitantes de dosis con el objetivo de seleccionar las condiciones óptimas de posicionamiento.

3.8.2 Caracterización dosimétrica del blindaje

Como primera caracterización, se realizó una medición de flujo neutrónico térmico mediante la técnica de activación neutrónica, empleando un fantoma de acrílico instrumentado con alambres de cobre-oro (1,55 % de Au) de aproximadamente 1 cm de largo y 1 mm de diámetro. En esta primera caracterización, se obtuvo un flujo térmico (2200 m/s) del orden de $4 \times 10^9 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el centro de la ventana (a la altura de la piel del animal), y $2 \times 10^9 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en una posición interna a la profundidad del hígado, un valor adecuado para alcanzar un nivel de dosis terapéutica para estos experimentos en un tiempo razonable. El flujo en los límites de la ventana (por ej. a la altura de la porción de los pulmones o de los riñones que quedarían algo expuestos en el borde de la ventana), fue de entre el 15-30 % de la posición más expuesta en la ventana (superficie de la piel del animal). En el resto de las ubicaciones dentro del blindaje se obtuvieron flujos al menos 20 veces menores, al igual que lo observado para el blindaje construido para el modelo de cáncer bucal en hámster, descrito en la sección 2.6 del segundo capítulo del presente trabajo de tesis.

En el proceso de irradiación en la FCCT del RA-3, se define una medición de flujo neutrónico en una posición reproducible (monitora) en cada experiencia, que es el parámetro sobre el cual se define el tiempo de irradiación necesario para alcanzar la dosis requerida en un punto de interés. De esta forma, para realizar la estimación de la dosis en un determinado órgano, es necesario conocer el flujo neutrónico, o lo que es lo mismo, la relación que existe entre el flujo en el órgano y el flujo en la posición de referencia donde se controla el flujo en cada experiencia. Con la finalidad de obtener factores (F_w) que representen la atenuación de flujo neutrónico en diferentes posiciones dentro del blindaje (hígado, pulmón, riñón, intestino, etc.) con respecto a esta posición de referencia, se realizaron 4 irradiaciones ubicando alambres dentro del cuerpo de ratas posicionadas en el blindaje. Para ello se

seleccionaron ratas de diferente masa corporal (de entre 170 y 250 g) cubriendo el rango a ser utilizado en los futuros experimentos (ratas de masa corporal superior a 250-260g no pueden ser ubicadas cómodamente en el volumen interior del blindaje). Los animales fueron anestesiados y operados para implantarles los alambres para la medición de flujo. Luego de la irradiación, los animales fueron sacrificados y los alambres se extrajeron, se lavaron y fueron medidos en una cadena de espectrometría gamma. Los datos obtenidos se procesaron de acuerdo a lo descrito anteriormente para obtener el valor de flujo en cada posición (sección 2.5.1.3). En la Tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las localizaciones evaluadas (para una rata de masa corporal intermedia dentro del rango definido).

Tabla 3.1 Resultados de la activación de alambres ubicados dentro del cuerpo de una rata posicionada dentro del blindaje de neutrones. Se muestran los valores de flujo neutrónico medidos en cada posición. Los factores Fw se presentan como la relación porcentual, entre el valor medido en cada posición con respecto al valor medido en la ubicación externa (piel más expuesta en la ventana). LLI: lóbulo lateral izquierdo; LLD: lóbulo lateral derecho. Los valores de flujo fueron determinados con una incerteza menor al 5 %.

Identificación alambre	Ubicación	Flujo (nv)	Fw [%]
W29	Externa (piel más expuesta)	3,4E+09	100%
W25	Hígado, lóbulo LLI inferior	1,6E+09	46%
W26	Hígado, lóbulo LLI superior	2,4E+09	72%
W27	Hígado, lóbulo MLD	1,4E+09	43%
W23	Riñón derecho	5,0E+08	15%
W24	Riñón izquierdo	3,3E+08	10%
W28	Pulmón	1,1E+09	32%

En la experiencia con la rata de menor tamaño se observaron variaciones importantes en el posicionamiento dentro del blindaje, quedando más expuesta la posición de los riñones y parte del pulmón. Por este motivo, para los órganos ubicados en las cercanías de la ventana, se consideraron dos factores diferentes

que contemplen la situación que determinado órgano se encuentre o no totalmente blindado.

En la Tabla 3.2, se muestra un ejemplo de cálculo representativo de estimación de las dosis recibidas en los diferentes órganos durante una de las primeras pruebas piloto de irradiación con este modelo, tomando en cuenta los factores de atenuación de flujo (F_w) (en su mayoría, seleccionados del caso que se muestra en la Tabla 3.1). En los casos donde se supone que ciertos órganos se exponen parcialmente (casos "sin blindar" o "cerca del hígado" en la Tabla 3.2), los factores de atenuación fueron seleccionados a partir de los resultados de las irradiaciones analizadas que presentaron el valor más conservativo (menor blindaje).

Se puede observar en las estimaciones de dosis, la importancia de lograr un buen posicionamiento de los riñones de modo de lograr que queden lo mejor blindados posible, disminuyendo la dosis que recibe ese órgano.

También se consideró el caso particular de la irradiación del intestino, considerando que se encontraría en contacto con líquido intraperitoneal (i.p.) que presenta un alto contenido de boro (Garabalino et al. 2011). Teniendo en cuenta la radiosensibilidad del intestino y la dosis asociada a la alta concentración de boro presente en el líquido i.p. en el caso de los protocolos que se suministran por esa vía, se proyectó realizar un lavado de la cavidad intraperitoneal previo a cada irradiación, de modo de retirar el líquido residual conteniendo boro y así disminuir la dosis que reciben los órganos internos.

De los resultados expuestos hasta el momento queda claro que puede existir una variación importante en el flujo al que puede estar expuesto determinado órgano en función del tamaño del animal y/o del correcto posicionamiento del mismo dentro del blindaje. Cabe mencionar que en la Tabla 3.2 no se presentan valores de dosis en tumor, debido a que para determinar el valor de flujo en el nódulo tumoral a tratar y en el hígado más expuesto, se realizaron mediciones particulares con el fin de lograr una mejor aproximación al valor real de flujo en los puntos de mayor interés. Estas mediciones se describen más adelante junto a la descripción de los ensayos *in vivo* con el modelo.

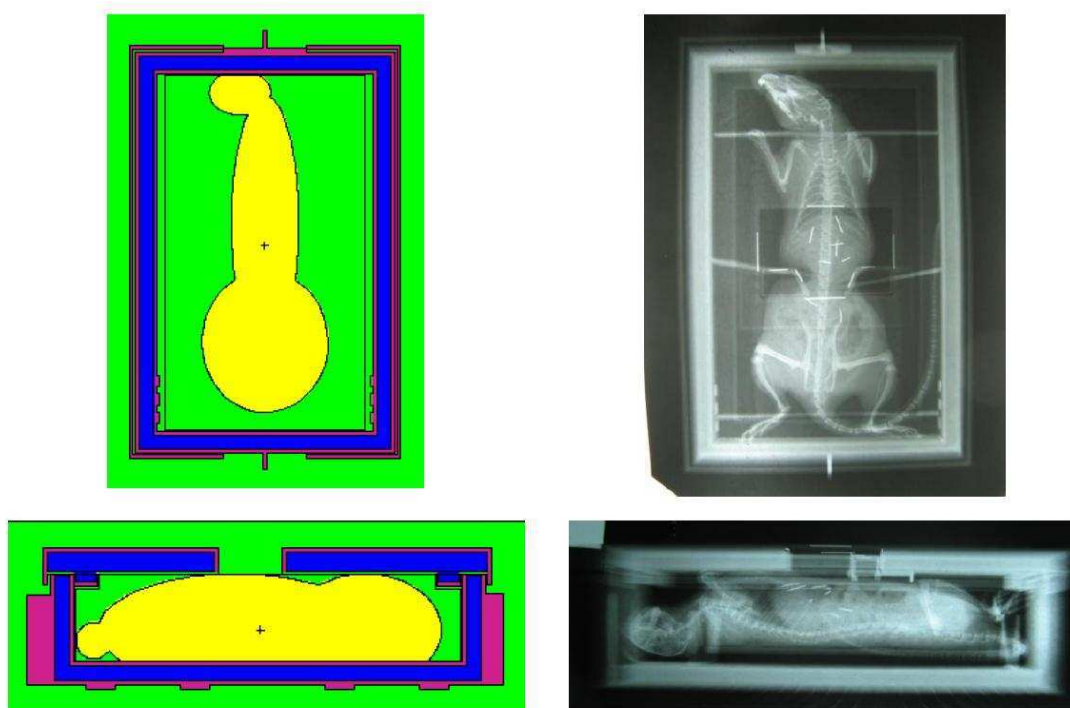
Tabla 3.2 Ejemplo de valores de dosis calculados para una irradiación en la FCCT con el reactor RA-3 operando a 8 MW de potencia. Se utilizan los factores de flujo relativos a la posición monitora indicados para cada situación. El caso seleccionado correspondería a un tratamiento con BPA-BNCT, protocolo BPA 46,5 mg ¹⁰B/Kg i.p.+i.v., (Garabalino et al 2011), para una prescripción de fluencia de neutrones en hígado de 4 E+12 n cm⁻².

Flujo monitor externo	4,23 E+9 n cm ⁻² s ⁻¹						
Tejido / ubicación en el blindaje	Factor relativo	Flujo térmico	Dosis gamma	Dosis ¹⁴ N	[¹⁰ B]	Dosis Boro	Dosis total
	a monitor externo (Fw)	n cm ⁻² min ⁻¹	Gy	Gy	ppm	Gy	Gy
Hígado	0,72	1,83E+11	2,4	0,84	17,4	5,3	8,5
Riñón (zona blindada)	0,15	3,81E+10	2,4	0,18	91	5,7	8,3
Riñón (zona sin blindar)	0,6	1,52E+11	2,4	0,70	91	22,9	26,0
Intestino (zona blindada)	0,15	3,81E+10	2,4	0,13	21	1,3	3,9
Intestino (zona cerca hígado)	0,72	1,83E+11	2,4	0,62	21	6,2	9,3
Intestino (zona blindada) con ppm del líquido i.p.	0,15	3,81E+10	2,4	0,13	60 ^a	3,4	6,0
Intestino (zona cerca hígado) con ppm del líquido i.p.	0,72	1,83E+11	2,4	0,62	60 ^a	16,5	19,6
Estómago (zona cerca hígado inf)	0,52	1,32E+11	2,4	0,61	24	5,3	8,3
Estómago (zona cerca hígado sup)	0,72	1,83E+11	2,4	0,84	24	7,3	10,6
Pulmón (zona del mismo que haya quedado en la ventana)	0,32	8,12E+10	2,4	0,37	16	2,1	4,9
Pulmón (zona blindada)	0,1	2,54E+10	2,4	0,12	16	0,7	3,2

^a Se toma como referencia el valor medido para el protocolo BPA 46,5 mg ¹⁰B/Kg i.p.+i.v., aunque se ha observado un rango muy variable entre 10 y 150 ppm (Garabalino et al 2011)

En un trabajo llevado adelante a posteriori a la construcción del blindaje, el Dr. Rubén Farías y col. realizaron una simulación computacional mediante el código MCNP de la distribución de flujo neutrónico dentro del blindaje colocado en la fuente de la columna térmica del RA-3 (Farías 2010). En la Figura 3.12 se muestran los planos del blindaje simulado.

Figura 3.12 Planos centrales en Z e Y de un fantoma de rata realizado en MCNP (gentileza del Dr. Rubén Farías y col.) y la placa de Rx correspondiente sobre la que se basó el modelo. El fantoma fue realizado con tejido equivalente a músculo.



En la Figura 3.13, se muestra la distribución de flujo neutrónico en diferentes puntos, presentados en forma relativa a un flujo máximo modelado para la fuente de aproximadamente $9,3 \times 10^9 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

En las isocurvas de flujo longitudinales y transversales en el plano medio del blindaje se observa sobre la abertura las curvas correspondientes al 40%, 30%, 20% y 10% de flujo neutrónico relativo a un máximo externo y la forma con que estas ingresan al contenedor para el caso estudiado (Figura 3.13). Considerando el flujo asociado con la curva del 40% (aprox. $3,72 \times 10^9 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) como el flujo máximo en la posición más expuesta de la piel de la rata, se obtuvo la relación del flujo con respecto a este máximo en puntos sobre las curvas que se encuentran a mayor profundidad en la abertura del blindaje. Estos valores se indican en la Tabla 3.3.

Como dato comparativo, consignamos que en las 4 irradiaciones con ratas reales se obtuvo una atenuación promedio de 80% en la posición donde se encontraría el nódulo tumoral (72% en la posición del lóbulo lateral izquierdo del hígado para el caso de la rata de masa de 213g, presentado en la Tabla 3.1). Se estima que está posición se ubica aproximadamente a 5 mm de profundidad de la superficie externa de la piel. Si bien no se puede establecer una comparación directa (ya que para ello se requiere un modelado y una experiencia definiendo posiciones fijas y reproducibles), el modelado corrobora la distribución relativa del flujo neutrónico en la apertura colimada y la protección que ofrece el blindaje al cuerpo del animal, alcanzando en todos los casos valores aceptables para la realización de los experimentos proyectados.

Figura 3.13 Iso-superficie de Flujo longitudinal sobre el plano medio a) longitudinal y b) transversal, del blindaje conteniendo un fantoma de rata. Los porcentajes indican el flujo relativo a un máximo entregado por la fuente. Gentileza del Dr. Rubén Farías y col.

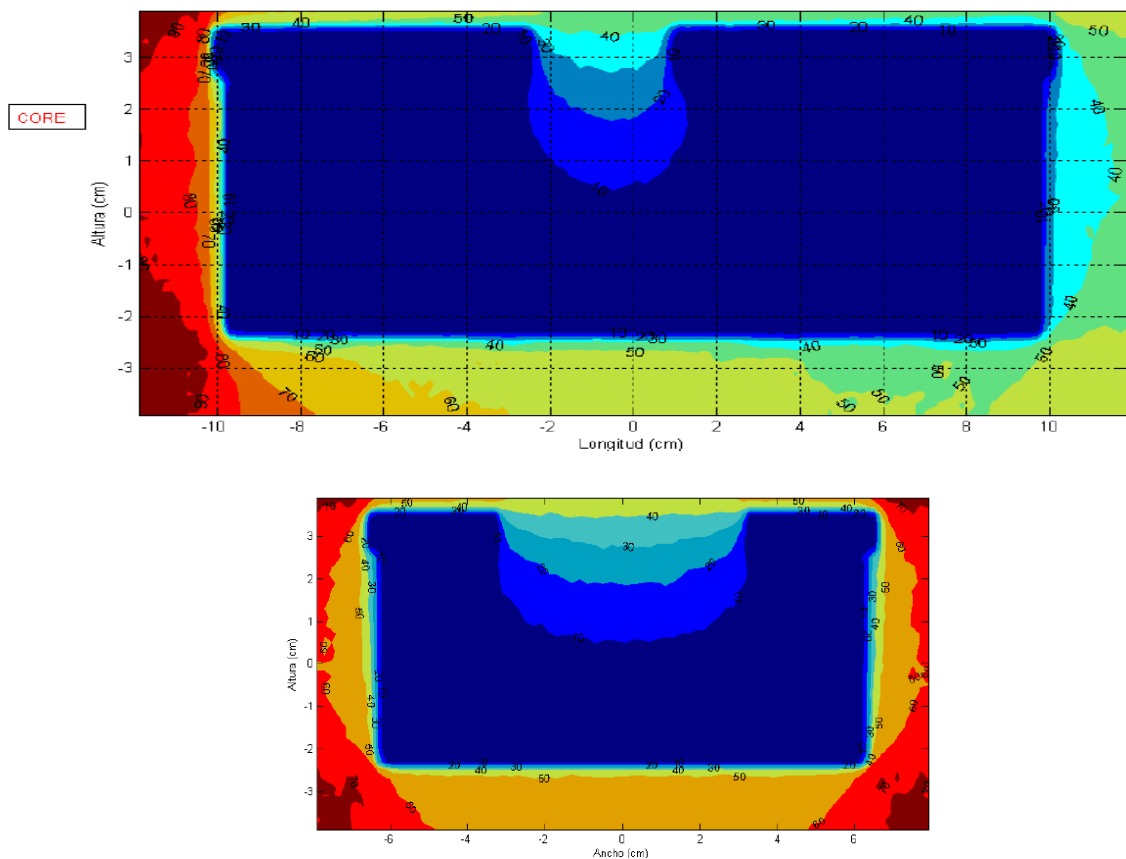
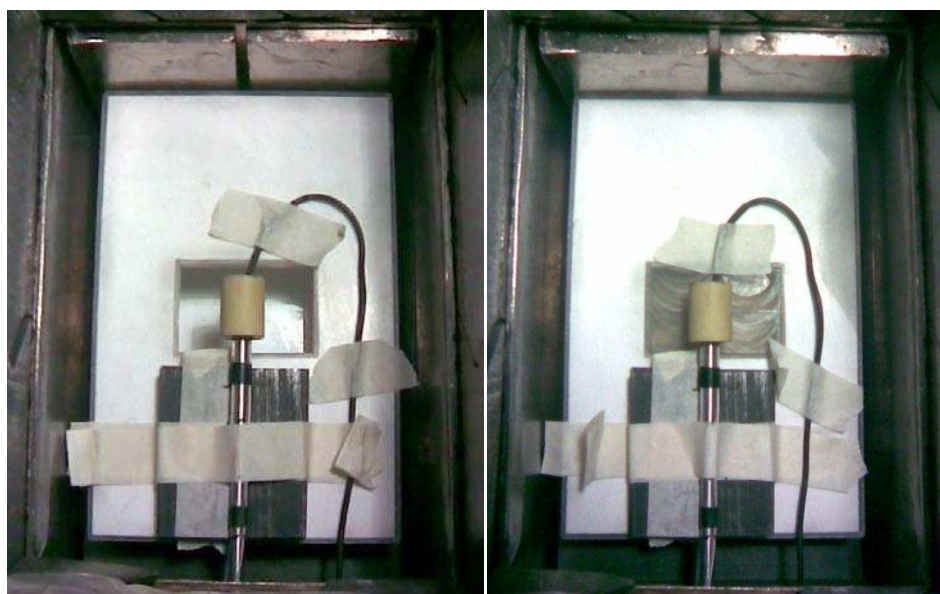


Tabla 3.3 Datos relevados de la Figura 3.13 obtenida por simulación de la distribución de flujo neutrónico dentro del blindaje colocado en la FCCT del RA-3.

Profundidad aprox. en el centro de la apertura	Isocurva de flujo simulado (relativo al máximo de la fuente)	Flujo en la simulación	Relación a posición 0 mm
0 mm	40%	3.72E+09	100%
8 mm	30%	2.79E+09	75%
17 mm	20%	1.86E+09	50%
30 mm	10%	9.30E+08	25%

La tasa de dosis gamma fue medida previamente en aire para el sistema de irradiación. Se utilizó una cámara de ionización de grafito (modelo IC-18G, Far West Technology) blindada de neutrones térmicos en su parte sensible con un capuchón de FLi (95 % enriquecido en ^6Li). Se posicionó por encima del blindaje, a la altura de la ventana donde se colocó un fantoma de acrílico para simular la presencia del cuerpo del animal posicionado dentro del blindaje (Figura 3.14).

Figura 3.14 Experiencia de medición de tasa de dosis gamma en la posición de irradiación con el blindaje de neutrones para el modelo de metástasis hepáticas en ratas. Se muestra el posicionamiento de la cámara de ionización (CI). Se repitió la misma configuración con (foto derecha) o sin (foto izquierda) un fantoma (un bloque de acrílico), para estimar la contribución gamma que aporta el cuerpo del animal.



Se asumió una tasa de dosis homogénea para todos los tejidos. Se consideró que este criterio era conservativo, ya que la posición donde se ubica la cámara de ionización es la que presentaría el valor más alto debido a la mayor contribución a la dosis gamma por la reacción ${}^1\text{H}(n, \gamma){}^2\text{H}$, que se produce por la captura de neutrones térmicos en el hidrógeno presente en el cuerpo del animal (fantoma de acrílico). La tasa de dosis gamma también fue relativizada al flujo térmico medido con un SPND en una posición monitora (ya que presentan una relación constante), de modo de poder actualizar su valor con sólo monitorear el flujo neutrónico previamente a cada experiencia de irradiación.

3.8.3 Conclusiones relativas al desarrollo del blindaje

Se desarrolló un blindaje de neutrones adaptado al modelo de metástasis hepático seleccionado previamente para realizar estudios de BNCT *in vivo* utilizando la FCCT del RA-3. Se determinó el posicionamiento anatómico del animal dentro del blindaje que permitiría maximizar el flujo de neutrones térmicos en la zona de metástasis hepáticas, minimizando el flujo en riñón y pulmón. Se caracterizó el blindaje y se obtuvieron factores de atenuación de flujo neutrónico dentro del mismo para ser utilizados en la estimación de dosis en diferentes órganos de interés. El método particular de determinación del flujo neutrónico en el blanco de tratamiento a ser evaluado (nódulo tumoral e hígado circundante) y el correspondiente cálculo de dosis, se describen posteriormente en la sección correspondiente a cada ensayo *in vivo*.

3.9 Estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de metástasis hepáticas en el reactor nuclear RA-3

3.9.1 Primera etapa: evaluación de la eficacia terapéutica

Se definió que se evaluaría la eficacia terapéutica de un protocolo de BPA-BNCT a las 2 y 3 semanas de la aplicación de la terapia en el modelo de metástasis hepáticas basado en la implantación de células de cáncer de colon (DHD/K12/TRb) en el hígado de ratas BDIX. Se consideró posible encontrar una respuesta de los tumores 2-3 semanas post-tratamiento, sobre la base de resultados previos de respuesta tumoral al BNCT evaluada en otros modelos experimentales (Kreimann et al. 2001b, Trivillin et al. 2004a, 2006). Se evaluaron dos niveles de dosis, comenzando por un nivel más conservativo de modo de no superar límites de radiotolerancia conocidos, y luego aumentando la prescripción de dosis a la luz de los primeros resultados.

3.9.1.1 Materiales y métodos

Se utilizaron un total de 98 ratas BDIX macho o hembra adultas, de entre 170-250 g de masa corporal (m.c.), a las cuales se le implantaron 0.5 millones de células en 10 µl de medio F10-DMEM en el lóbulo lateral izquierdo del hígado, para inducir el desarrollo de nódulos tumorales sub-capsulares que simulan metástasis en una zona delimitada (según lo descrito anteriormente en la sección 3.7). Los animales fueron alojados en jaulas individuales, en una habitación con temperatura controlada y ciclos de 12 hs de luz/oscuridad. Se pesaron y evaluaron clínicamente en forma diaria a partir del momento de la cirugía. Luego de 13 +/- 1 días de la inoculación, 100% de los animales desarrollaron los nódulos tumorales de las características previamente definidas, y fueron asignados en forma aleatoria a los siguientes protocolos experimentales:

- a) **Grupo BPA-BNCT (n=32):** Los animales fueron inyectados con solución de BPA-fructosa a una dosis de 46,5 mg ¹⁰B/kg m.c. Tres horas luego de la administración del compuesto borado, los animales fueron expuestos a la irradiación con neutrones en la FCCT del RA-3.

- b) Grupo Sólo Haz (n=25):** Se irradió con la misma fluencia de neutrones que el grupo BPA-BNCT, pero sin administración previa del compuesto borado, para estudiar el efecto de la dosis de fondo.
- c) Grupo Sham (n=27):** Control sin irradiar, expuesto a la misma manipulación que los grupos tratados (inoculación de células tumorales y laparoscopia 2 semanas post-inoculación).

El compuesto BPA fue preparado de acuerdo al método estándar previamente descrito (Garabalino et al. 2011), para obtener una solución inyectable 0,42 M de BPA-fructosa. La solución se preparó utilizando agua mili-Q y p-borofenilalanina (BPA, L- enantiómero, >98 % enriquecida en ^{10}B de Boron Biologicals, Inc. Raleigh, NC) conteniendo 4,9% de ^{10}B por mol de BPA. Luego, esta solución se llevó a pH 10 con NaOH 10 M y NaOH 1 M (para el ajuste fino) en constante agitación. Una vez alcanzado el valor de pH, se le agregó fructosa en una relación molar 1:1 con el BPA, para formar el complejo BPA-fructosa y así aumentar la solubilidad del BPA. Este complejo disminuye el pH, por lo que nuevamente se llevó la solución a pH 10 agitando durante 20 minutos para que todos los sólidos se solubilizaran. Finalmente, se ajustó el pH a valores fisiológicos de 7,2-7,4 con HCl 6 N y 0,6 N (para el ajuste fino), también bajo agitación. La solución obtenida resultó transparente (Yoshino, 1989, LaHann, 1993) y se purificó por filtración con un filtro de tamaño de poro de 0,2 μm . La solución se conservó a 4°C, en oscuridad, hasta su utilización. La solución fue preparada el mismo día de su utilización ya que por encontrarse sobresaturada posee poca estabilidad y precipita fácilmente, no siendo recomendable su almacenamiento. El volumen de inyección asociado a la dosis de compuesto administrada (46,5 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$ m.c.) es 1,03 ml/100 g de m.c., es decir, aproximadamente 2 ml de solución de BPA 0,42M considerando una rata “promedio” de 200g de m.c. En un estudio piloto inicial, se intentó suministrar el volumen total mediante inyección intravenosa (i.v.), simulando la ruta de administración que se utiliza normalmente en el tratamiento de pacientes humanos. Sin embargo, el gran volumen inyectado en bolo fue pobremente tolerado por los animales. Por lo tanto, para los experimentos, se optó por inyectar la mitad del volumen intraperitonealmente (i.p.) y la otra mitad del volumen por vía i.v. El protocolo de administración del compuesto borado fue seleccionado en base a datos de biodistribución reportados previamente (Garabalino et al. 2011). En la Tabla 3.4 se muestran los valores de concentración de boro para este protocolo, el cuál cumple

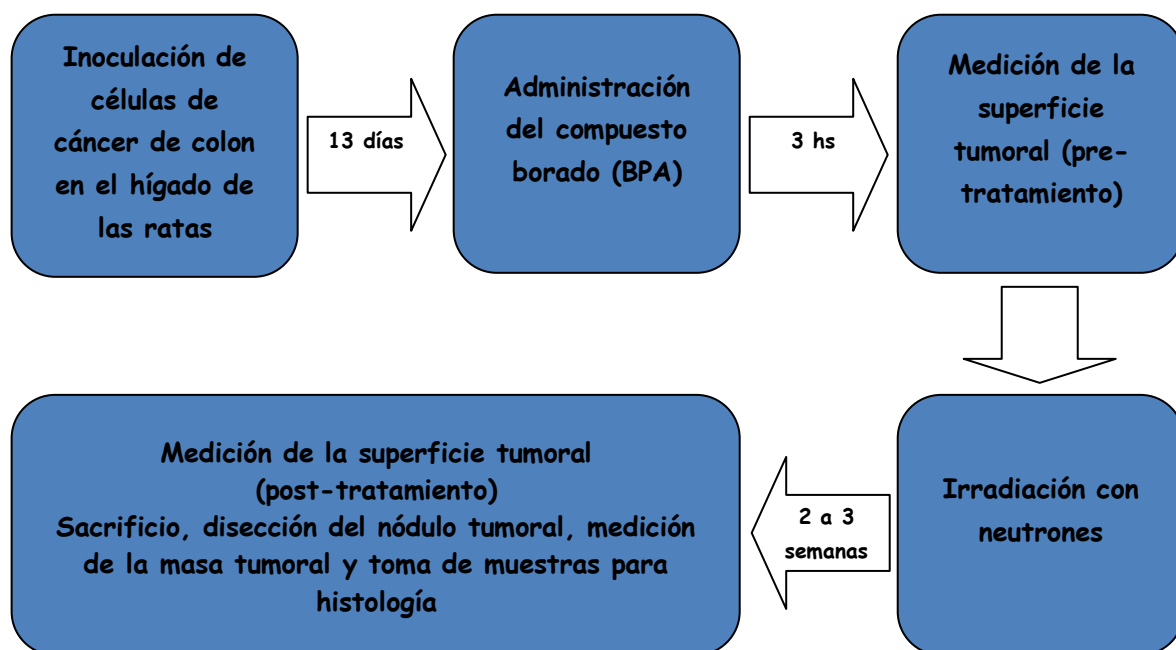
con los requisitos para considerar que tiene potencial terapéutico y amerita ser evaluado en estudios radiobiológicos. Estos requisitos son que el compuesto no manifieste toxicidad, que la concentración absoluta de boro en tumor sea ≥ 20 ppm, y que la relación de concentración de boro en tumor/hígado sea ≥ 1 (Garabalino 2011 y sección 1.7.2). La selección del tiempo post-administración de BPA al cual se realizó la irradiación con neutrones en el grupo BPA-BNCT (para optimizar el contenido de boro en tumor y maximizar la relación concentración de boro en tumor/tejido), se realizó en base a estudios previos de biodistribución realizados por nuestro grupo de trabajo, no incluidos en esta tesis (Garabalino et al. 2011).

En el esquema de la **Figura 3.15** se presenta un resumen general del procedimiento aplicado al grupo BPA-BNCT.

Tabla 3.4 Valores de concentración de boro correspondientes al protocolo de administración de BPA (i.p. + i.v.) a una concentración de 46,5 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$ m.c. (extraído de Garabalino et al. 2011).

Tejido	BPA i.p. + i.v. (46,5 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$) [ppm]
Sangre	15,0 \pm 3,8 (n=8)
Tumor	32 \pm 10 (n=25)
Hígado	17,4 \pm 5,2 (n=8)
Riñon	91 \pm 22 (n=8)
Intestino	20,7 \pm 5,1 (n=7)
Líquido Intraperitoneal	60 \pm 15 (n=7)
Estomago	24 \pm 10 (n=8)
Bazo	26,0 \pm 6,1 (n=7)
Piel	15,7 \pm 5,2 (n=6)
Pulmón	15,6 \pm 5,4 (n=8)
Lengua	19,6 \pm 8,3 (n=8)
Médula espinal	6,4 \pm 1,0 (n=5)
Tumor / Hígado	1,8 \pm 0,3
Tumor / Sangre	2,1 \pm 0,5

Figura 3.15 En el diagrama se describen en forma general los pasos seguidos para la aplicación del protocolo BPA-BNCT en el modelo experimental descrito. Nótese que para el caso del grupo Solo Haz se sigue el mismo procedimiento omitiendo el paso de administración del compuesto borado, y en el caso del grupo Sham también se omite el paso de irradiación con neutrones.



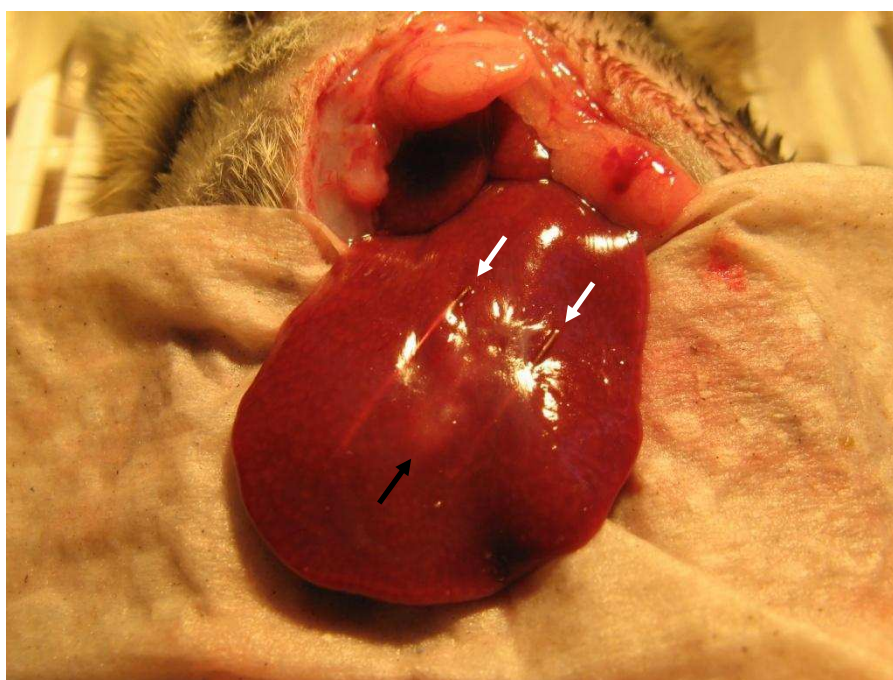
Los cálculos dosimétricos se realizaron en forma análoga a lo descrito previamente en la primera parte de esta tesis, considerando las características particulares del caso (diseño del blindaje y modelo experimental). Sintéticamente, en la FCCT, el campo neutrónico está muy bien termalizado, siendo despreciable la componente proveniente de protones recoil del hidrógeno presente en los tejidos (dosis de neutrones rápidos) (Miller et al. 2009). De este modo, las dosis reportadas en las tablas de dosis incluyen tres componentes: una dosis de protones proveniente de la captura del nitrógeno, una dosis gamma y la contribución de la reacción de boro informada como Gy por ppm de boro en masa^t. A fin de obtener la dosis boro, está última contribución debería ser multiplicada por la correspondiente concentración de boro. En cada irradiación se realizó una medición en una posición monitora, para ajustar el flujo neutrónico y la tasa de dosis gamma a potenciales variaciones de potencia del reactor, y finalmente determinar el tiempo de exposición para alcanzar la dosis prescrita para cada caso.

^t Para el boro y el nitrógeno, los factores kerma térmicos utilizados para los cálculos fueron los mismos que se describieron anteriormente en la sección 2.5.

Dado que actualmente no disponemos de una técnica no invasiva de seguimiento del crecimiento del tumor en el hígado, cada animal fue sometido a otra laparotomía en el momento previo a la irradiación para verificar la presencia del nódulo tumoral y medir sus dimensiones superficiales. Con estas mediciones se calculó el área ocupada superficialmente por el nódulo (superficie pre-tratamiento), valor de referencia con el que se puede evaluar la respuesta individual para cada animal tratado.

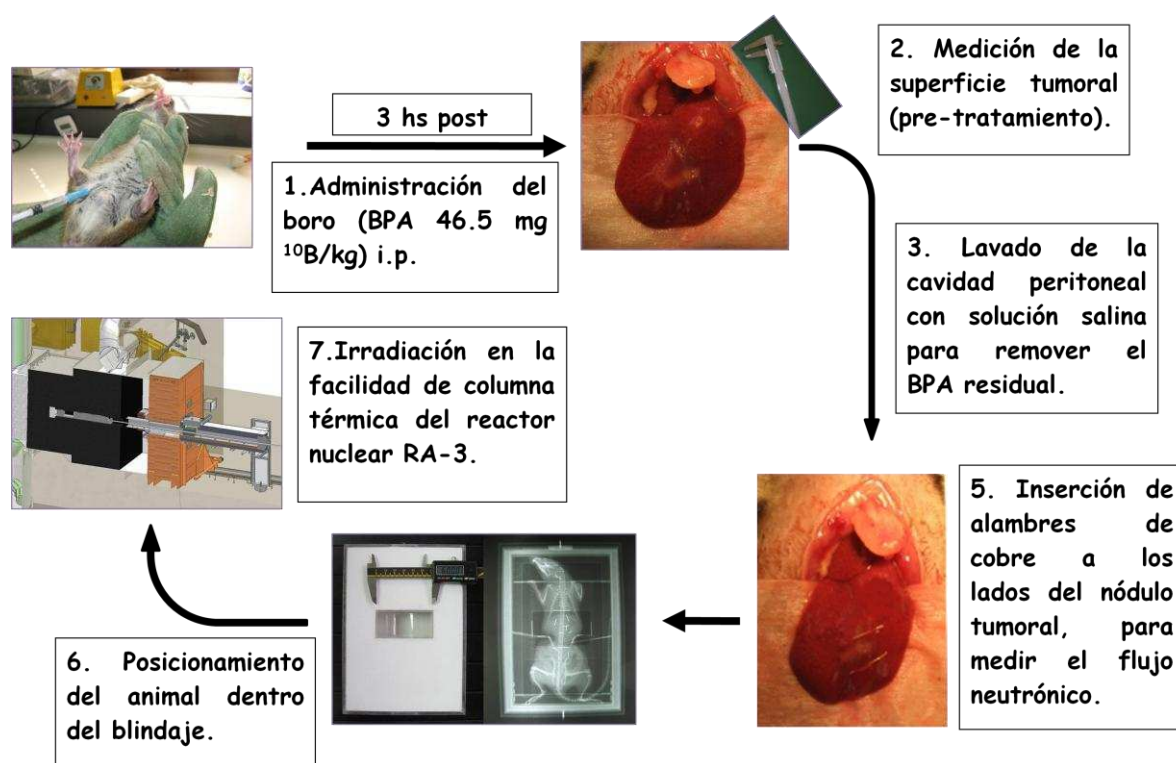
Adicionalmente, en el grupo BPA-BNCT, la cavidad intraperitoneal fue lavada con solución salina tibia para remover todo el BPA residual que pudiera haber quedado en el líquido intraperitoneal, y así prevenir un daño adicional al intestino. Durante la misma intervención, se colocaron en forma sub-capsular en el lóbulo lateral izquierdo del hígado de 33/57 de los animales irradiados (grupos BPA-BNCT y Solo Haz), dos alambres de cobre (0,25 mm de diámetro y aproximadamente 7 mm de largo), a los lados del nódulo tumoral, para medir el flujo neutrónico in situ por la técnica de activación neutrónica, y a la vez obtener el factor de proporcionalidad (Fw) entre dicho valor y el que se mide en la posición monitora utilizando el SPND. En la Figura 3.16 se muestra en detalle un par de alambres colocados a los lados de nódulo tumoral implantado en el hígado de una de las ratas tratadas.

Figura 3.16 Detalle de los alambres implantados a los lados del nódulo tumoral para la determinación experimental del flujo neutrónico. Las flechas blancas indican las posiciones de los alambres de cobre y la flecha negra la posición del inóculo.



En el esquema de la **Figura 3.17** se presenta en detalle el procedimiento completo aplicado al grupo BPA-BNCT.

Figura 3.17 En el diagrama se describen detalladamente los pasos seguidos para la aplicación del protocolo BPA-BNCT en el modelo experimental descrito, luego de transcurridas las 2 semanas post-inoculación de las células tumorales en el lóbulo lateral izquierdo del hígado.



Para los casos de irradiaciones en las que se midió el flujo neutrónico in situ con alambres, la dosis en tumor e hígado fue calculada en forma retrospectiva utilizando directamente el flujo promedio obtenido de ambos alambres. Para los casos en que no se midió el flujo por este método (24/57), la dosis se estimó utilizando el valor de flujo medido con el monitor externo (SPND), afectado por el valor promedio de Fw considerando todas las relaciones obtenidas para la configuración de irradiación usada.

Luego de la irradiación, se retiraron los alambres para medición de flujo neutrónico, y los animales fueron nuevamente suturados (en todos los casos los animales fueron irradiados con el abdomen cerrado al igual que los animales sin monitor de flujo interno). Los alambres se comenzaron a medir inmediatamente por espectrometría gamma para determinar el flujo neutrónico en la zona del tumor. Los rayos gamma de los alambres activados fueron medidos utilizando un detector de

germanio de alta pureza (HPGe) previamente calibrado utilizando una fuente comercial de Europio (^{152}Eu) de actividad certificada (certificado de calibración N° 76044A-440, Eckert & Ziegler Analytics, Inc., 30 octubre de 2007. Analytics mantiene trazabilidad al National Institute of Standards and Technology). Como el material del alambre utilizado fue cobre puro (99,95%), solo se consideró el rayo gamma de 511KeV de la reacción $^{63}\text{Cu}(n,\gamma)^{64}\text{Cu}$, con una sección eficaz de 4,5 barns para neutrones de energía 0,0253 eV. Los alambres fueron medidos a la mayor distancia disponible del detector, de forma de satisfacer la condición de fuente puntual. La eficiencia para el pico de activación de 511 KeV en la posición elegida fue 0.000891 ($\pm 5\%$) cps/ γ , haciendo posible obtener en tiempos de adquisición razonables, un número total de cuentas con incertezas menores al 1%. El flujo neutrónico promedio en la posición del lóbulo hepático inoculado, obtenido de la activación de los alambres insertados a los lados del tumor, fue $(2,3 \pm 0,5) \times 10^9 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Como criterio de prescripción de dosis, se realizó un primer ensayo a una dosis absorbida en hígado de 7,4 Gy, tratando de no exceder las dosis de tolerancia en este tejido de acuerdo a datos bibliográficos (Pinelli et al. 2001, Koivunoro et al. 2004) y la experiencia lograda por nuestro grupo en experimentos anteriores utilizando otro modelo experimental (Cardoso et al. 2007). De esta forma se prescribió una dosis absorbida a hígado de (7 ± 1) Gy, logrando una dosis en tumor de (10 ± 3) Gy (Dosis I). Luego de evaluar los resultados y confirmar la radiotolerancia de hígado y la ausencia de complicaciones clínicas al nivel de Dosis I, se repitió el ensayo a un nivel de dosis mayor (Dosis II = dosis absorbida total para protocolo BPA-BNCT de (9 ± 2) Gy en hígado y (13 ± 3) Gy en tumor). Las dosis absorbidas totales para cada protocolo, se presentan en la Tabla 3.5. Finalmente, se realizó un nuevo ensayo prescribiendo al nivel de Dosis II, pero aumentando el tiempo de seguimiento de la respuesta post-terapia.

Los valores de dosis reportados para otros tejidos, se estimaron de la misma forma que para el tumor o hígado, pero estimando el flujo de neutrones en cada posición a partir del valor medido con el SPND en la posición de referencia afectado por los factores Fw (Tabla 3.2), de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente en la caracterización del blindaje.

Tabla 3.5 Dosis física total para cada protocolo.

Tejido	Dosis física total absorbida [Gy]			
	BPA-BNCT I	BPA-BNCT II	Sólo Haz I	Sólo Haz II
Tumor	10 ± 3	13 ± 3	3,0 ± 0,2	4,3 ± 0,2
Hígado	7 ± 1	9 ± 2	3,0 ± 0,2	4,3 ± 0,2
Piel	11 ± 3	14 ± 3	4,1 ± 0,2	5,7 ± 0,2
Riñón	9 ± 2	11 ± 2	2,6 ± 0,2	3,8 ± 0,2
Intestino	4,0 ± 0,4	5,3 ± 0,5	2,5 ± 0,2	3,7 ± 0,2
Pulmón	5 ± 1	6 ± 1	2,8 ± 0,2	4,0 ± 0,2

En la Tabla 3.6 se presentan las dosis absorbidas de las diferentes componentes de radiación para el nivel de Dosis II. El tiempo de irradiación para alcanzar las dosis prescritas fue de (23 ± 1) min para la Dosis I y (27 ± 1) min para la Dosis II. En ambos casos, las dosis de los grupos Solo Haz, se corresponden con una exposición a la misma fluencia neutrónica (el mismo tiempo de exposición) que el respectivo grupo BPA-BNCT comparable para cada caso.

Los animales fueron evaluados por 2 semanas (Dosis I y II) ó 3 semanas (Dosis II). Durante este tiempo, se monitorearon la masa corporal y los signos clínicos regularmente.

Al final de cada experiencia (2 ó 3 semanas post-tratamiento), se practicó la eutanasia de los animales y se midió nuevamente la superficie tumoral que ocupaban los nódulos en ese tiempo post-tratamiento. A su vez, se evaluó la masa de los nódulos tumorales disecados, separando todo el tejido hepático circundante previamente a la determinación de la masa en una balanza de laboratorio. Otro grupo adicional de animales con tumores (n=14) fue sacrificado al momento en que se hubiera realizado la irradiación (pre-tratamiento) para determinar la masa promedio de los nódulos disecados al tiempo inicial (T_0).

Luego, se tomaron muestras de tumor, hígado adyacente y piel en zona expuesta a la radiación para su análisis histológico. Las muestras se fijaron en formol al 4% en PBS a temperatura ambiente. Las muestras fueron procesadas por

un método convencional para su inclusión en parafina, corte con micrótopo y tinción con hematoxilina-eosina.

Tabla 3.6 Valores de las componentes de dosis absorbidas utilizadas para la prescripción de Dosis II (mayor nivel de dosis ensayado). La dosis boro se expresa por ppm de ^{10}B en masa de tejido, la cual se debe multiplicar por la concentración de ^{10}B correspondiente a cada tejido (segunda columna), para obtener la dosis absorbida debida a esta componente. Los valores se expresan como media \pm DS.

Tejido	$[\mu\text{g/g B}^{10}]$	Fluencia de neutrones $[\text{n cm}^{-2}]$	Dosis gamma [Gy]	Dosis protones (N^{14}) [Gy]	Dosis Boro [Gy $\mu\text{g/g}^{-1}$]
Tumor	32 \pm 10	(3,8 \pm 0,6) $\times 10^{12}$	3,5 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	0,28 \pm 0,04
Hígado	17,4 \pm 5,2	(3,8 \pm 0,6) $\times 10^{12}$	3,5 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	0,28 \pm 0,04
Piel	15,7 \pm 5,2	(7 \pm 1) $\times 10^{12}$	3,5 \pm 0,2	2,1 \pm 0,4	0,54 \pm 0,09
Riñón	91 \pm 22	(1,1 \pm 0,2) $\times 10^{12}$	3,5 \pm 0,2	0,23 \pm 0,04	0,08 \pm 0,01
Intestino	20,7 \pm 5,1	(1,1 \pm 0,2) $\times 10^{12}$	3,5 \pm 0,2	0,17 \pm 0,03	0,08 \pm 0,01
Pulmón	15,6 \pm 5,4	(2,2 \pm 0,4) $\times 10^{12}$	3,5 \pm 0,2	0,48 \pm 0,08	0,16 \pm 0,03

Los parámetros de evaluación de la respuesta tumoral fueron, el cociente de la superficie externa del nódulo tumoral sub-capsular post-/pre-tratamiento y la masa del nódulo tumoral disecado. El indicador del cociente entre la superficie post-/pre-tratamiento presenta la ventaja de ser un parámetro determinado para cada animal evaluado, es decir, que permite estimar la respuesta individual de cada animal. Sin embargo, es un indicador indirecto del tamaño tumoral.

Por el contrario, la masa del nódulo tumoral post-tratamiento es un estimador directo del tamaño, pero solo puede ser comparado con un valor promedio de la masa tumoral pre-tratamiento ya que naturalmente no se puede disponer del valor real de masa tumoral pre-tratamiento de cada animal. Así, ambos indicadores contribuyen de forma complementaria a evaluar la respuesta tumoral.

La radiotoxicidad fue evaluada en términos del estado clínico general de los animales por inspección visual diaria, cambios en la masa corporal y la cicatrización

de la herida expuesta a la radiación. Se evaluaron alteraciones en el hígado a nivel macroscópico y/o histológico en los tiempos de seguimiento.

Estos estudios se desarrollaron de acuerdo a las normas éticas locales e institucionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

En los casos relevantes, el análisis estadístico de los datos se realizó por análisis de la varianza (ANOVA) de un factor. El nivel de significancia estadística se estableció en $p = 0,05$.

3.9.1.2 Resultados

La relación entre la superficie externa post-/pre-tratamiento y la masa de los nódulos tumorales 2 y 3 semanas posteriores a las irradiaciones se muestran en la Tabla 3.7. El promedio de la masa del nódulo tumoral previo a la irradiación (grupo To) fue de (48 ± 19) mg ($n=14$).

A las 2 semanas, la respuesta post-/pre-superficie tumoral correspondiente al grupo Sham fue de $2,7 \pm 1,1$. Este valor indica que, sin tratamiento, la superficie tumoral se incrementa en promedio aproximadamente 3 veces en un período de 2 semanas. Para el caso de las irradiaciones con Sólo Haz, los valores de superficie tumoral post-/pre-tratamiento fueron de $2,9 \pm 1,3$ para la Dosis I y $2,3 \pm 1,8$ para la Dosis II, no mostrando diferencias significativas entre ellos. Estos valores tampoco mostraron diferencias significativas con el grupo Sham sin irradiar, indicando que los niveles de dosis de fondo evaluados, son insuficientes para impedir el crecimiento tumoral a las dos semanas post-tratamiento. Sin embargo, el valor correspondiente al grupo BPA-BNCT fue $0,74 \pm 0,47$ para la irradiación de menor dosis (Dosis I) de BPA-BNCT y $0,76 \pm 0,41$ para el caso del mismo tratamiento con mayor dosis (Dosis II), mostrando una diferencia significativa con los grupos control Sham y Solo Haz ($p < 0,02$). La diferencia de respuesta entre ambos puntos de dosis de BPA-BNCT no fue significativa cuando se evaluó este indicador de respuesta.

Tabla 3.7 Respuesta tumoral 2 y 3 semanas post-tratamiento, expresada como superficie del nódulo tumoral post-/pre-tratamiento y masa del nódulo tumoral para los protocolos estudiados. n es el número de animales evaluados en cada caso. El promedio de la masa del nódulo tumoral pre-tratamiento (grupo To) fue de (48 ± 19) mg (n=14). Con fluencia I y II, se indica el nivel de fluencia de neutrones térmicos suministrada en cada caso, según se corresponde con lo detallado en el texto y las Tablas 3.5 y 3.6. Los valores se expresan como [media \pm DS].

Tiempo post-tratamiento	Tratamiento	Post-/Pre- superficie nódulo tumoral	Masa del nódulo tumoral post-tratamiento [mg]
2 semanas	fluencia I	BPA-BNCT I n = 10	89 \pm 62
		Solo Haz I n = 4	150 \pm 64
	fluencia II	BPA-BNCT II n = 12	28 \pm 16
		Solo Haz II n = 10	72 \pm 51
	Sham n = 14	200 \pm 160	
	3 semanas	fluencia II	BPA-BNCT II n = 10
Solo Haz II n = 10			150 \pm 100
Sham n = 13		350 \pm 300	
			4,5 \pm 3,1

Otro parámetro utilizado para evaluar la respuesta fue el promedio de las masas de los nódulos disecados, determinadas para cada tratamiento y tiempo evaluado. Al cabo de las dos primeras semanas, la masa del nódulo tumoral medida

en el grupo Sham fue aproximadamente cuatro veces mayor que la correspondiente al control pre-tratamiento (la masa del nódulo tumoral aumentó de (48 ± 19) mg en T_0 a (200 ± 160) mg en el Grupo Sham 2 semanas más tarde ($p = 0,002$)). En el caso del grupo Solo Haz I, la masa tumoral creció tres veces con respecto al control pre-tratamiento (T_0) alcanzando un promedio de (150 ± 64) mg ($p = 0,000$) y aumentó (aunque de forma no significativa) a (72 ± 51) mg en el grupo Solo Haz II. La diferencia entre ambos grupos Solo Haz fue estadísticamente significativa ($p = 0,01$). Este resultado indicaría un efecto del aumento de la dosis de fondo sobre el crecimiento tumoral luego de dos semanas de la realización del tratamiento. El valor promedio de masa tumoral del grupo BPA-BNCT fue (89 ± 62) mg y (28 ± 16) mg, para los tratamientos con menor y mayor dosis, respectivamente, mostrando una diferencia significativa ($p < 0,005$) entre ambos grupos. A diferencia de la evaluación con el parámetro relativo a la superficie tumoral externa, empleando la masa del nódulo tumoral como indicador de respuesta se puede observar un efecto significativo del aumento de la dosis en la respuesta dos semanas después del tratamiento. El tratamiento con BPA-BNCT controló el crecimiento tumoral en el caso del grupo tratado con la Dosis I, y para el caso del tratamiento con Dosis II la masa tumoral se redujo aproximadamente a la mitad del valor medio pre-tratamiento. Algo para resaltar, es que luego de 2 semanas del tratamiento con la mayor dosis de BPA-BNCT, se alcanzó un 86% de reducción ($1 - [28/200]$) en la masa tumoral respecto de los tumores no tratados (grupo Sham).

Solo los grupos que recibieron mayor dosis mostraron una masa tumoral significativamente menor que el grupo Sham (BPA-BNCT II vs Sham, $p = 0,001$ y Sólo Haz II vs Sham, $p < 0,03$), siendo también significativa la diferencia entre el grupo BPA-BNCT II y el correspondiente grupo Solo Haz II ($p = 0,01$).

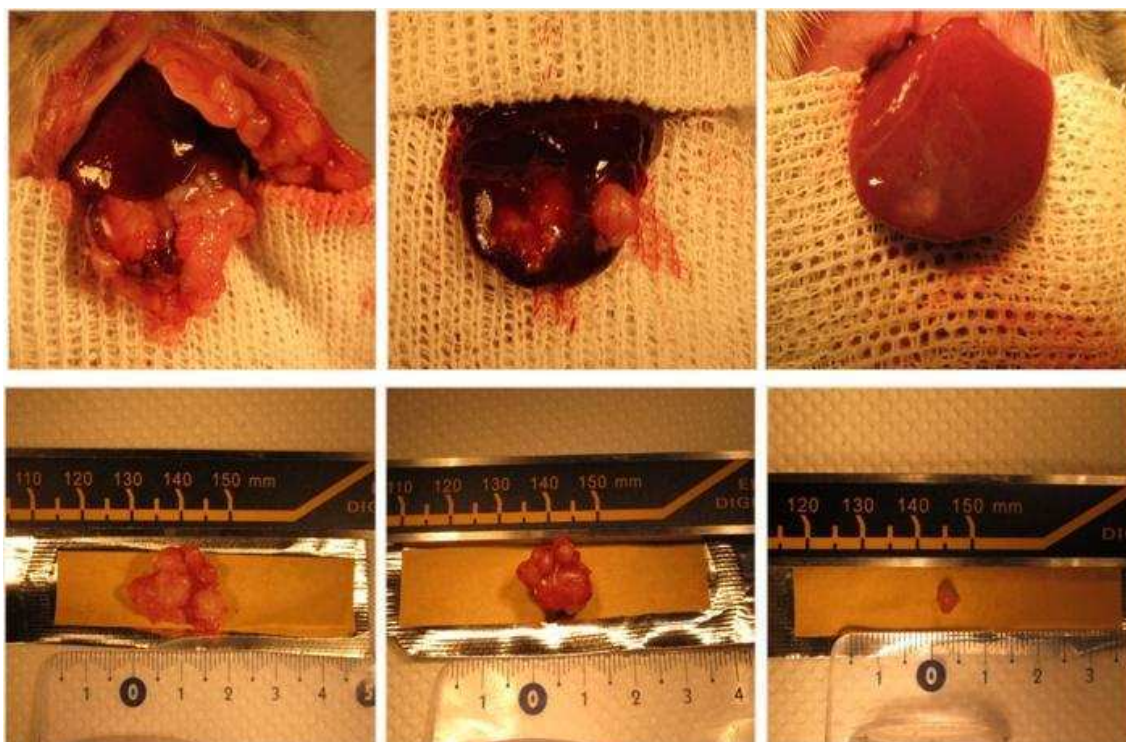
En el estudio que se extendió **por 3 semanas de seguimiento** (todos los tratamientos con irradiación realizados con fluencia de neutrones al nivel II), el desarrollo tumoral progresó en los grupos Sham y Solo Haz. Por el contrario, la remisión tumoral fue más pronunciada en el grupo que recibió el tratamiento con BPA-BNCT. El valor de superficie Post/Pre para el grupo Sham fue $4,5 \pm 3,1$ y en el caso del grupo Solo Haz fue $2,7 \pm 1,8$, mientras que para el grupo tratado con BPA-BNCT, el valor promedio fue $0,47 \pm 0,20$, significativamente menor con respecto a

ambos controles ($p < 0,003$). La diferencia entre los grupos Sham y Solo Haz no alcanzó una significancia estadística.

Comparado con el valor del grupo control pre-tratamiento, la masa promedio del nódulo tumoral aumentó aproximadamente 7 veces en el grupo Sham, (48 ± 19) mg vs (346 ± 302) mg ($p = 0,001$), y 3 veces en el grupo Solo Haz, (48 ± 19) mg vs (147 ± 102) mg ($p = 0,002$). En el caso del tratamiento con BPA-BNCT, la masa promedio del nódulo tumoral fue (19 ± 16) mg, disminuyendo significativamente con respecto al grupo pre-tratamiento ($p = 0,001$), y alcanzando una reducción del 95 % si se compara con el grupo Sham ($1 - [19/346]$).

La diferencia en la masa promedio del nódulo tumoral entre el grupo BPA-BNCT y los grupos Sham y Solo Haz fueron estadísticamente significativas ($p < 0,003$). La diferencia entre los grupos Sham y Solo Haz no alcanzó significancia estadística. En la Figura 3.18 se ilustran estas diferencias con imágenes de ejemplos representativos de nódulos tumorales in situ y tumores disecados, para cada uno de los tratamientos.

Figura 3.18 Ejemplos representativos de nódulos tumorales en el hígado, 3 semanas post-tratamiento. En los paneles superiores se muestran nódulos tumorales “in situ”, mientras que los paneles inferiores corresponden a nódulos de tumor disecados. Izquierda: Sham. Centro: Solo Haz II, Derecha: BPA-BNCT II.



La Tabla 3.8 muestra para los diferentes grupos tratados con el nivel de fluencia II, el porcentaje de animales cuyos tumores exhibieron una remisión parcial, en términos de algún grado de reducción de la superficie tumoral pre-tratamiento (PR: % de animales con parámetro superficie tumoral post/pre tratamiento < 1), y el porcentaje de animales cuyos tumores exhibieron una reducción a menos que el 50% de la superficie tumoral pre-tratamiento (PR_{0,5}: % de animales con parámetro superficie tumoral post/pre tratamiento < 0,5). La remisión parcial fue 0% para los grupos Sham y Solo Haz para ambos tiempos, mientras que el BPA-BNCT indujo una remisión parcial en 67% y 100 % de los animales luego de 2 y 3 semanas del tratamiento, respectivamente.

Tabla 3.8 Porcentaje de animales cuyos tumores exhibieron una respuesta parcial, en términos de reducción de la superficie tumoral pre-tratamiento, 2 ó 3 semanas post-tratamiento para los diferentes protocolos correspondientes a la irradiación con mayor nivel de fluencia de neutrones. **PR**: % de animales cuyos tumores exhibieron algún grado de reducción de la superficie tumoral pre-tratamiento. **PR_{0,5}**: % de animales cuyos tumores exhibieron una reducción a menos que el 50% de la superficie tumoral pre-tratamiento.

Tiempo post-tratamiento / Protocolo	BPA-BNCT II		Solo Haz II	Sham
	PR	PR _{0,5}	PR	PR
	[%]	[%]	[%]	[%]
2 semanas	67%	25%	0%	0%
3 semanas	100%	50%	0%	0%

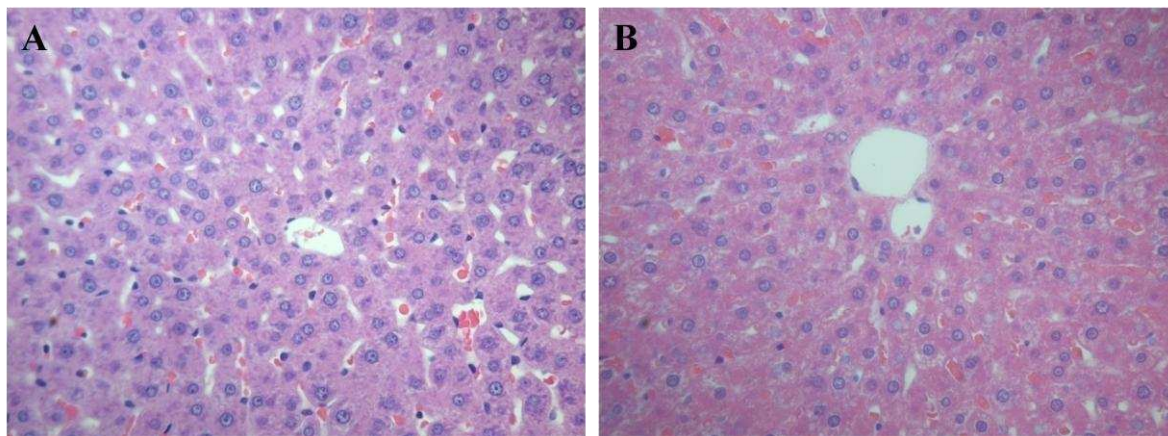
A nivel histológico, tanto a las 2 y 3 semanas posteriores al tratamiento con BPA-BNCT, se pudieron distinguir dos efectos generales con respecto a los controles (pre-tratamiento y Sham) descriptos previamente:

- Aumento de la proporción de núcleos “bizarros” o con signos de daño (pleomórficos, hipercromáticos) versus núcleos de apariencia viables (forma conservada, leptocrómicos).

- Aumento de la proporción estroma versus el parénquima tumoral, con mayores zonas de fibrosis y ausencia de típicas formaciones glandulares observadas en los controles.

No se observaron cambios en hígado a nivel macroscópico ni histológico, en ninguno de los grupos experimentales durante los períodos evaluados. La Figura 3.19 ilustra la ausencia de alteraciones histológicas en hígado en un caso representativo de tratamiento con BPA-BNCT, comparado con el grupo Sham a las tres semanas de seguimiento.

Figura 3.19 Área circundante a la vena central de un lóbulo hepático luego de tres semanas de seguimiento. **A: Sham; B: BPA-BNCT**. Notar la ausencia de alteraciones luego del tratamiento con BPA-BNCT. Tinción con hematoxilina-eosina, magnificación original 400x.



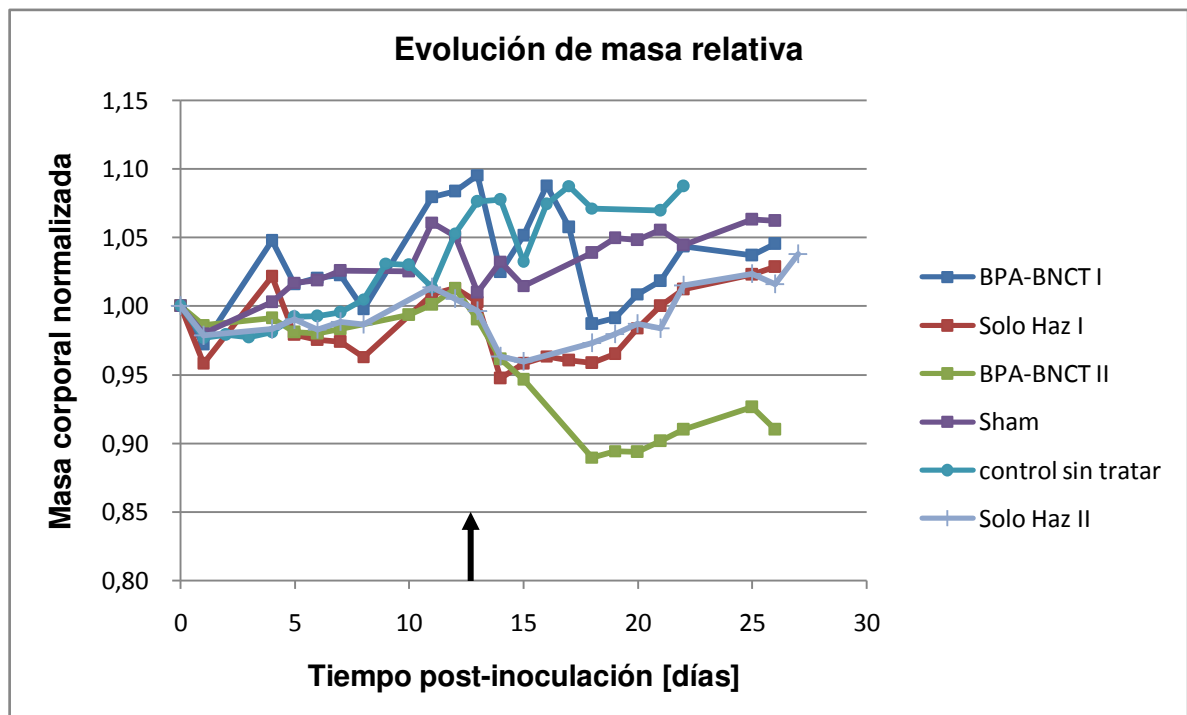
Los animales presentaron una buena recuperación clínica general luego de los tratamientos (irradiación y/o cirugía). No se observaron signos graves de radiotoxicidad en los grupos irradiados, como ser diarrea persistente o alteraciones neurológicas (falta de coordinación y/o cambios de comportamiento) a lo largo de todo el periodo de seguimiento.

Vale la pena notar que los animales irradiados recibieron una dosis en cuerpo entero (zonas con y sin blindaje) y dosis mayores en la zona expuesta del blindaje. Dados los niveles de dosis involucrados (4 Gy o más en forma parcial en órganos de la zona abdominal, Tabla 3.5), no se puede descartar la posibilidad de existencia de otros signos asociados con síndrome hematopoyético o gastrointestinal. Sin embargo, no se vieron signos clínicos ostensibles de estos síndromes.

Se observaron varios casos de animales con problemas de cicatrización e infección de las heridas quirúrgicas en la zona de piel expuesta del grupo tratado con BPA-BNCT II. En todos los casos se observó una resolución de nivel aceptable que no comprometió el estado clínico de los animales. También se registraron casos de falta de recuperación capilar en la porción de piel ubicada en la ventana del blindaje de los grupos BPA-BNCT (todos los animales fueron rasurados en el abdomen previamente a cada cirugía). Estos efectos no se observaron en los grupos Sham o Solo haz.

En la mayoría de los casos estudiados se registró una falta de apetito luego de la aplicación de los tratamientos (irradiación y/o cirugía, ambos procedimientos realizados bajo anestesia). Esto se traduce en una disminución en la ganancia de la masa corporal los primeros días post-tratamiento. En la Figura 3.20 se muestra la evolución de la masa relativa al inicio para los grupos de tratamiento con seguimiento a dos semanas donde se puede observar esta tendencia.

Figura 3.20 Masa corporal normalizada al momento de la inoculación de células en el hígado (t_i) (masa a tiempo t / masa a tiempo t_i) para los diferentes grupos tratados con seguimiento de 2 semanas post-tratamiento. Se omiten los errores para una mejor visualización, siendo el desvío promedio del 10%. La flecha negra vertical indica los 13 +/- 1 días post-inoculación, momento en el cuál se aplica el tratamiento correspondiente a cada grupo.



En todos los casos el efecto observado sobre la variación de la masa corporal fue transitorio y los animales se estabilizaron luego de 5 días post-tratamiento (aprox. 18 días post-inoculación en el gráfico de la Figura 3.20). Si bien este efecto es esperable para este primer período de recuperación luego del estrés debido a cada tratamiento, la tendencia fue más pronunciada en los grupos tratados con BPA-BNCT con el nivel de dosis más alta, registrándose una disminución en la masa promedio relativa del 10% hacia el final del seguimiento (Figura 3.20).

En el ANEXO V se muestran los gráficos de masa individual en función del tiempo para todos los grupos evaluados de 2 y 3 semanas de seguimiento. En los grupos de 3 semanas de seguimiento se observaron resultados similares a los descriptos para grupos con 2 semanas de seguimiento post tratamiento (ANEXO V).

3.9.1.3 Discusión

El hígado es el sitio más común de aparición de metástasis de carcinoma de colon (Robertson et al. 2009), y el tratamiento de estas metástasis hepáticas es aún un desafío sin resolver. Aunque la resección completa de las metástasis ofrece la mayor probabilidad de cura con una tasa de supervivencia a 5 años de entre 25-58 %, solo entre el 10 y 20 % de todos los pacientes son candidatos para cirugía según el tamaño, número o localización de las metástasis (Adam et al. 2011, Bentrem et al. 2005). Incluso, la recurrencia local luego de la cirugía ocurre en la mayoría de los pacientes, debido a la enfermedad microscópica residual (Ruan and Warren 2005). Varias opciones terapéuticas incluyendo la administración de nuevos protocolos y drogas citostáticas, y técnicas loco-regionales como la crioterapia, la ablación con radiofrecuencia y las micro-esferas radiactivas, han ofrecido algún beneficio terapéutico en este contexto (por ej., Wittig et al. 2008, Malafosse et al. 2001, Curley and Izzo 2002, Kerr et al. 2003, Stuart 2003, Salem and Thurston 2006). La radiosensibilidad del hígado limita la posibilidad de tratar efectivamente las metástasis hepáticas sin exceder la radiotolerancia del hígado (por ej., Jirtle et al. 1984). Incluso, el hígado tiene poca tolerancia a la exposición de los grandes volúmenes de tratamiento involucrados en la radioterapia convencional utilizando fotones o electrones (Suzuki et al. 2000). Avances más recientes en radioterapia externa con fotones, incluyendo radioterapia conformada tridimensional (3DC-RT) o radioterapia de intensidad modulada (IMRT), han contribuido a eludir parcialmente

estos defectos (por ej., Suzuki et al. 2007, Kim et al. 2005, Thomas et al. 2005), reportándose resultados prometedores para el tratamiento de tumores de hígado con 3DC-RT (Kim et al. 2005, Cheng et al. 2000, Seong et al. 2003, Schefter et al. 2005).

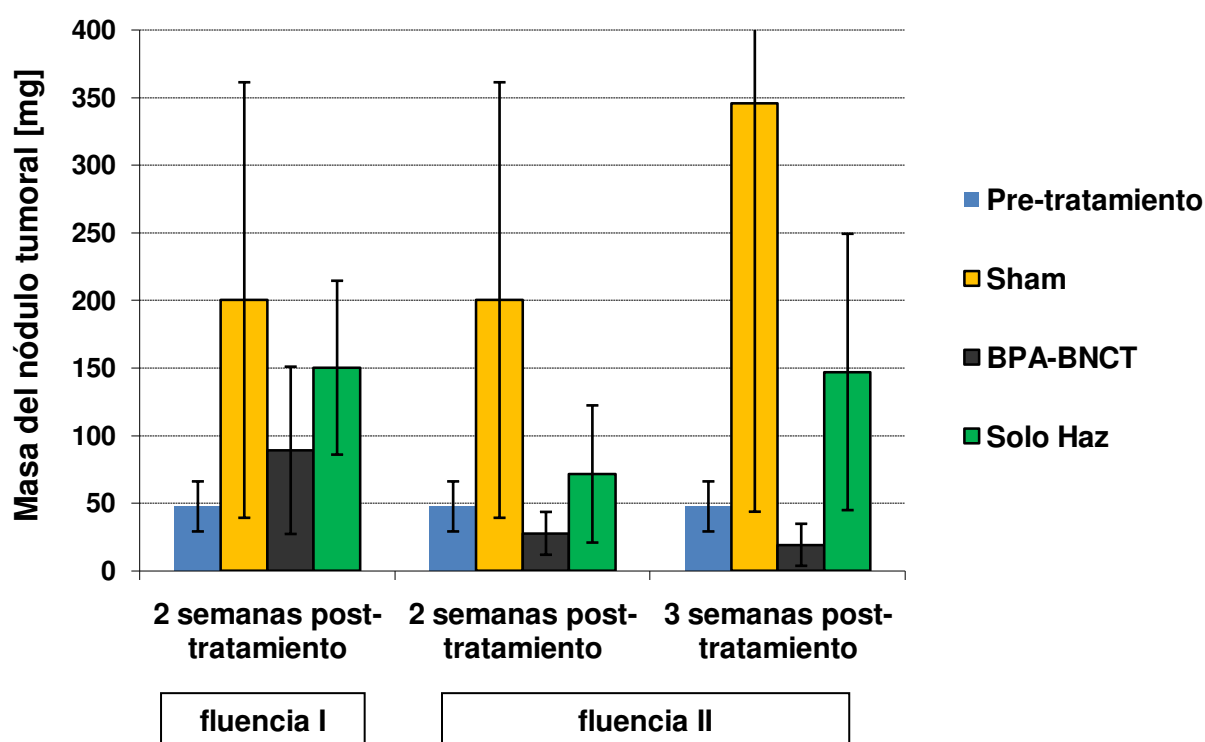
Las terapias dirigidas capaces de matar las células tumorales selectivamente mientras se preserva el tejido normal, podrían mejorar la eficacia terapéutica y reducir la toxicidad. Dentro de este contexto, la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) podría ser una técnica atractiva para el tratamiento de metástasis de hígado derivadas de carcinoma colorectal, que se presenten multifocales, en ambos lóbulos, y que no respondan a la quimioterapia ni sean resecables.

Con BNCT, el daño selectivo al tumor se logra por una entrega selectiva de boro a las células tumorales más que por una conformación del haz. En este sentido, BNCT ofrece un mecanismo de ataque a micrometástasis no detectables que causarían más del 40% de las recurrencias, solamente en hígado, de pacientes luego de la resección quirúrgica (Kavolius et al. 1996). Estas nociones han estimulado esfuerzos internacionales para contribuir a la aplicación segura y eficaz de esta técnica en términos de diseño, montaje y dosimetría de haces de neutrones, planificación de tratamientos y geometrías de irradiación (por ej., Allen et al. 1997, Nievaart et al. 2006, Hopewell et al. 2011).

El presente estudio revela que la aplicación de BNCT mediado por el portador de boro BPA indujo una respuesta terapéutica a nivel experimental, dando lugar a una remisión significativa de nódulos tumorales colorectales en el hígado en un modelo en rata, 2 y 3 semanas posteriores al tratamiento. Para una mejor interpretación, en la Figura 3.21 se grafican los valores de masa de los nódulos tumorales disecados de la Tabla 3.7, mostrando la evolución, a diferentes fluencias y tiempos post-tratamiento, de los diferentes grupos experimentales con respecto al control pre-tratamiento. El grupo Sham mostró un crecimiento progresivo de los nódulos tumorales de 2 a 3 semanas post-tratamiento. El tratamiento con Solo Haz a dosis baja (grupo Solo Haz I, fluencia de neutrones I) también mostró crecimiento tumoral a las 2 semanas respecto del grupo control pre-tratamiento, del mismo orden de magnitud que el crecimiento observado en el grupo Sham. Los tumores irradiados con el nivel de fluencia II (Solo Haz II) mostraron cierto grado de respuesta respecto del grupo Sham a las dos semanas. A las 3 semanas se siguió observando un menor crecimiento tumoral en el grupo Solo Haz II respecto del Grupo Sham. Sin

embargo, se observó crecimiento tumoral progresivo en el grupo Solo Haz II de las 2 a las 3 semanas. Este hallazgo sugeriría una respuesta parcial transitoria en el grupo Solo Haz II. Por el contrario, el grupo tratado con BPA-BNCT a un nivel de dosis promedio de 13 Gy (fluencia II), mostró una reducción significativa de la masa tumoral que prosiguió de 2 a 3 semanas post-tratamiento.

Figura 3.21 Masa del nódulo tumoral [media \pm DS] del grupo pre-tratamiento comparado con los diferentes grupos de 2 y 3 semanas post-tratamiento. En los grupos Solo Haz y BNCT, las fluencias I y II, corresponden a los niveles de fluencia de neutrones utilizadas para irradiar los animales.



Considerando el otro parámetro estudiado (superficie externa tumoral pre y post tratamiento), luego de tres semanas de seguimiento, 100% de los animales del grupo BPA-BNCT II presentaron remisión tumoral, comparado con 0% de los animales tratados con Solo Haz II o los animales del grupo Sham (Tabla 4).

Los signos de toxicidad en piel irradiada en el grupo BPA-BNCT II, fueron atribuidos al hecho que este grupo recibió la mayor dosis absorbida total en piel (Tabla 3.5). En particular, este nivel de dosis involucra una alta componente de dosis boro (aprox. 65% de la dosis total, Tablas 3.5 y 3.6), siendo ésta la componente asociada con una mayor eficacia biológica (Coderre and Morris 1999).

No se observaron cambios en el hígado dentro del período de estudio. Este resultado sugiere la posibilidad de realizar un tratamiento a mayor dosis de forma segura si se prescribe a este órgano como limitante. Sin embargo, la toxicidad tardía en hígado no puede ser descartada en base a los resultados de este estudio, siendo necesaria la realización de ensayos específicos, en parte considerados en la discusión final de este capítulo.

3.9.1.4 Conclusión

Mediante los ensayos realizados se pudo demostrar que el tratamiento con BPA-BNCT induce una remisión parcial de nódulos colorectales experimentales en hígado de ratas BDIX a las dos y tres semanas post-tratamiento. Los valores de control tumoral a los dos tiempos evaluados mostraron un efecto terapéutico progresivo. La ausencia de cambios agudos en hígado al nivel evaluado, sugiere la factibilidad de escalar la dosis y lograr una potencial mejora en el control tumoral sin exceder la tolerancia del hígado en el modelo bajo estudio. Sin embargo, la toxicidad hepática tardía no puede ser descartada con el presente estudio y debe ser monitoreada cuidadosamente.

3.9.2 Segunda etapa: Control tumoral en función de la dosis de BNCT luego de 5 semanas de seguimiento

Habiendo demostrado que BPA-BNCT indujo la remisión parcial en el 100% de los nódulos tumorales evaluados 3 semanas post tratamiento, prescribiendo 13 Gy de dosis absorbida total en tumor, los objetivos de este trabajo fueron: extender el tiempo de seguimiento a 5 semanas post tratamiento y evaluar el efecto considerando potenciales variaciones en las dosis administradas en torno a un intervalo de prescripción. Teniendo en cuenta potenciales diferencias entre la dosis prescrita y la dosis realmente administrada, realizamos una evaluación retrospectiva de la dosis absorbida en cada animal tratado con BPA-BNCT. La hipótesis de trabajo fue que las diferencias entre la dosis prescrita y la dosis administrada en el modelo experimental de estudio, podría estar dada por la dispersión conocida de los valores de concentración de boro (por ej. Garabalino et al. 2011), variaciones en el flujo neutrónico en el tumor (principalmente debidas al posicionamiento del animal dentro del blindaje) y problemas de reproducibilidad en la administración intraperitoneal de drogas (BPA en este caso) (Gaines Das y North, 2007). En este trabajo, el flujo neutrónico en el tumor fue medido in situ y la concentración de boro fue evaluada en muestras de sangre tomadas previamente a cada irradiación, con el fin de realizar el cálculo retrospectivo de dosis para cada animal.

De esta manera fue posible estudiar el efecto del tratamiento sobre el tumor luego de 5 semanas, en función de la dosis administrada individualmente en el tumor de cada rata. A partir de los resultados observados según este procedimiento, intentamos establecer un posible umbral de dosis para el control tumoral. A su vez, se realizó el análisis histológico de los tumores remanentes luego del período de seguimiento, para establecer un grado de respuesta histológica empleando una escala semi-cuantitativa.

3.9.2.1 Materiales y Métodos

En este estudio se utilizaron un total de 44 ratas machos o hembras BDIX adultas de entre 170 - 250g de masa corporal (m.c.) (Charles River Lab., MA, USA). Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales en una habitación con ciclos de luz-oscuridad de 12hs. A cada uno de los animales se le practicó una laparotomía

bajo anestesia (ketamina (36,5 mg/kg m.c.) + xylazina (5,4 mg/kg m.c.)) y se expuso el lóbulo lateral derecho del hígado (LLD) de acuerdo al método descrito anteriormente para el modelo experimental de estudio (ver sección 3.7). Luego, se inocularon en forma sub-capsular, 10 μ l de medio de cultivo F10-DMEM (GIBCO) con aproximadamente 5×10^5 células singeneicas de cáncer de colon DH/DK12/TRb (ECACC, UK). Dos semanas luego de la inoculación, el 100% de los animales desarrolló nódulos tumorales medibles y vascularizados, sin diseminación intraperitoneal ni pulmonar como se describió anteriormente.

Los animales portadores de tumor en el hígado fueron utilizados para estudios de BNCT *in vivo* de acuerdo a lo descrito anteriormente, utilizando como fuente de neutrones la facilidad de columna térmica del reactor nuclear RA-3. Se utilizó el blindaje de carbonato de litio (95 % enriquecido en Li-6), para proteger el cuerpo de cada animal del flujo de neutrones térmicos.

Los cálculos dosimétricos se realizaron de la misma forma a lo descrito anteriormente (sección 3.9.1.1). Sintéticamente, las dosis reportadas incluyen tres componentes: la dosis debida a protones producto de la reacción de captura en nitrógeno; una componente de dosis gamma que se asumió homogénea en todos los tejidos (medida en forma separada para el mismo sistema de irradiación con una cámara de ionización de grafito (Far West Technology, 0,1 cm³ de volumen de aire)); y la contribución de la dosis boro.

Durante cada irradiación, se realizaron mediciones en una posición monitorea usando detectores de neutrones auto-energizados (SPND), para evaluar potenciales variaciones en el flujo neutrónico y estimar los tiempos de irradiación necesarios para llegar a las dosis prescritas.

Los animales se dividieron aleatoriamente en 3 grupos experimentales como en el estudio precedente. Un grupo **BPA-BNCT** (n=19), a los cuales se les administró una dosis de 46,5 mg ¹⁰B/kg del compuesto BPA (L-enantiomero, >98% enriquecido en ¹⁰B) preparado en el día como una solución acuosa 0,42 M de BPA-fructosa, según se describió anteriormente (sección 3.9.1.1). En 2 de las ratas la administración del compuesto fue en forma (i.p. + i.v.) como en el estudio anterior (mitad del volumen de inyección administrado intraperitonealmente y la mitad restante por vía intravenosa (i.v.)). En las 17 ratas restantes del grupo, la vía de administración fue 100% en forma intraperitoneal (i.p.). El protocolo de

administración i.p. fue seleccionado, como el anterior, en base a los datos de biodistribución reportados anteriormente (Garabalino et al. 2011). Este protocolo también cumple con los lineamientos establecidos de potencial valor terapéutico (sin toxicidad, concentración de boro absoluta en tumor >20 ppm, relación de concentración de boro tumor/hígado ≥ 1) (Garabalino et al. 2011). En la Tabla 3.9 se muestran los valores reportados de concentración de boro para este protocolo. Si bien los valores absolutos de concentración media de boro resultan levemente superiores a los valores correspondientes al protocolo i.p. + i.v. empleado en el estudio anterior, la diferencia no fue significativa. En el caso de este modelo experimental, el protocolo i.p. resulta más sencillo de implementar, siendo ventajoso en cuanto a la logística del procedimiento, ya que no es necesario anestesiarse al animal para la administración del compuesto borado. Como se describe más adelante, el control individual de la concentración de boro en sangre permite el uso de una u otra vía de administración. Tres horas post-administración del compuesto borado, los animales fueron expuestos a la irradiación con neutrones. Un grupo **Sólo Haz** (n=8), fue expuesto a la misma fluencia de neutrones que el grupo BPA-BNCT, sin administrar el compuesto borado para estudiar el efecto de la dosis de fondo. En el caso del grupo **Sham** (n=7), los animales fueron sometidos a la misma manipulación (inoculación de células tumorales y laparotomía 2 semanas post-inoculación) pero sin tratamiento.

Tabla 3.9 Valores de concentración de boro y factores de relación tejido/sangre usados para los cálculos dosimétricos empleados para prescribir la dosis. Los valores se expresan como [media \pm DS].

Datos de biodistribución (Garabalino et al. 2011)	
Tejidos	BPA (46,5 mg $^{10}\text{B/kg}$) i.p.
Tumor	(39 \pm 10) ppm (n=15)
Hígado	(15,1 \pm 6,5) ppm (n=10)
Sangre	(16,5 \pm 3,1) ppm (n=10)
Hígado / Sangre	0,8 \pm 0,2
Tumor /Sangre	1,9 \pm 0,4

Previamente a la irradiación los animales fueron sometidos a una laparotomía para medir el área superficial pre-tratamiento del nódulo tumoral. En el grupo BPA-BNCT, se lavó la cavidad peritoneal con solución salina tibia para remover el BPA residual en el líquido intraperitoneal, que pudiera ocasionar reacciones de captura neutrónica con el boro y contribuir a la radiotoxicidad intestinal. También se tomaron muestras de sangre de cada animal previamente a la irradiación, para realizar mediciones posteriores del contenido de boro. Las muestras de sangre fueron procesadas y medidas según protocolos estándar (Garabalino et al. 2011, Heber et al. 2012) para la evaluación del contenido de boro por ICP-OES (Optima 3100 XL, UV, axial, Perkin Elmer) o ICP-MS (ELAN DRC2, Perkin Elmer).

Adicionalmente, a todos los animales a ser irradiados, se les insertó en forma sub-capsular en el hígado, a cada lado del nódulo tumoral, dos alambres de cobre de 0,25 mm de diámetro y aproximadamente 7 mm de largo para medir el flujo neutrónico térmico existente en la posición del tumor y evaluar la relación con la posición de monitoreo externo con el SPND (monitor externo). Los animales fueron suturados y, luego de la irradiación, el abdomen fue abierto nuevamente para retirar los alambres y finalmente fue re-suturado (en dos planos, la capa muscular en un plano y en otro plano la piel). Los alambres fueron medidos por espectrometría gamma para obtener el flujo térmico en el área del tumor, de acuerdo con lo descrito anteriormente (sección 3.9.1.1).

En el grupo BPA-BNCT, la fluencia de neutrones térmicos fue prescrita para entregar una dosis absorbida en el rango de 6 Gy a 15 Gy. La estimación de la componente de dosis boro se basó en el supuesto que la concentración de boro en el tumor era 39 ± 10 ppm (Tabla 3.9), de acuerdo con los estudios de biodistribución publicados (Garabalino et al. 2011). La dosis absorbida en tumor para cada animal, fue determinada retrospectivamente en base a la determinación experimental del flujo térmico en el área del tumor y la concentración de boro inferida a partir de la concentración de boro respectiva de la sangre en el momento previo a la irradiación. La relación de concentración tumor/sangre utilizada para la estimación de la concentración de boro en tumor a partir de la medición de sangre fue $1,9 \pm 0,4$, tomada de los datos previos reportados para el protocolo de administración empleado en la mayoría de los animales en este trabajo (Tabla 3.9).

Asumiendo que el hígado que rodea al tumor fue expuesto al mismo flujo neutrónico que el tumor, y utilizando la relación de la concentración de boro en hígado/sangre de $0,8 \pm 0,2$ (Tabla 3.9) para estimar la concentración de boro en hígado a partir de la concentración medida en sangre, se calculó la dosis en hígado retrospectivamente para cada uno de los animales. Cabe aclarar, que esta dosis para hígado, corresponde solo a una porción de hígado y no debe interpretarse como la dosis entregada en todo el órgano, ya que, debido al blindaje, una gran proporción del hígado se expuso a un flujo neutrónico menor. En la Tabla 3.10 se presentan los valores de dosis absorbidas prescritos a cada órgano y/o tejido, discriminando la contribución de cada componente de dosis. Para estos tejidos las dosis se calcularon a modo de un ejemplo representativo a partir del valor promedio de fluencia entregada para los 19 casos tratados del grupo BPA-BNCT.

Tabla 3.10 Componentes de dosis absorbida para cada órgano/tejido, calculadas a partir de un valor promedio de fluencia para los 19 casos tratados del grupo BPA-BNCT. Los valores se expresan como el promedio \pm desvío estándar.

Tejido	Fluencia de neutrones [n cm ⁻²]	Dosis gamma [Gy]	Dosis protones (N ¹⁴) [Gy]	Dosis Boro ^a [Gy µg/g ⁻¹]	Dosis absorbida sin boro [Gy]
Tumor	(3,3±0,8)E+12	3,2 ± 0,3	0,69 ± 0,16	0,25 ± 0,06	3,9 ± 0,4
Hígado^b	(3,3±0,8)E+12	3,2 ± 0,3	0,69 ± 0,16	0,25 ± 0,06	3,9 ± 0,4
Piel^c	(6,7±0,6)E+12	3,2 ± 0,3	1,95 ± 0,16	0,50 ± 0,04	5,2 ± 0,4
Riñon	(1,01±0,08)E+12	3,2 ± 0,3	0,21 ± 0,02	0,075 ± 0,006	3,4 ± 0,3
Intestino	(1,01±0,08)E+12	3,2 ± 0,3	0,156 ± 0,013	0,075 ± 0,006	3,4 ± 0,3
Pulmón	(2,0±0,2)E+12	3,2 ± 0,3	0,43 ± 0,04	0,150 ± 0,012	3,6 ± 0,3

^a La dosis boro se expresa por ppm de ¹⁰B en masa de tejido.

^b Hígado en la posición del nódulo tumoral.

^c Piel expuesta sin blindaje.

En todos los casos, la exposición del grupo Solo Haz se realizó a la misma fluencia prescrita al grupo BPA-BNCT. Posteriormente, se re-calcularon las dosis en base a las determinaciones individuales de flujo obtenidas de la activación de los alambres de cobre.

Los animales se siguieron por 5 semanas post-tratamiento. Durante este tiempo, se monitorearon regularmente los signos clínicos y la masa corporal. Cuando se detectaron casos de animales con disminución marcada del peso corporal de acuerdo a la tendencia observada en el estudio previo (seguimiento por 3 semanas), se suplementó la alimentación de los animales con la misma comida (pellet de alimento balanceado) humedecida con agua y alimento líquido completo (Ensure, Abbott). Para casos que presentaron infección de las heridas luego de las cirugías, se suministró una dosis diaria en forma inyectable (i.p.) de antibiótico (Enrofloxacin 5% p/v) durante 5 días, y antibiótico por vía oral (Clorhidrato de oxitetraciclina 5,5% p/p) en el agua de bebida, durante 10 días.

Al término del experimento (5 semanas post-tratamiento), se realizó una laparotomía bajo anestesia y se midió nuevamente el área del nódulo tumoral. Luego se realizó la eutanasia de los animales. Los nódulos tumorales fueron disecados y pesados. Las muestras de los nódulos tumorales remanentes (cuando la masa fue suficiente para muestrear) y de hígado, fueron fijadas en formol-buffer 10% para realizar el análisis histológico de la respuesta tumoral y la toxicidad en hígado. Un grupo adicional de animales portadores de tumor (n=10) fueron sacrificados 2 semanas post-inoculación para determinar la masa tumoral promedio antes del tratamiento (tiempo inicial = T_0).

Al igual que en el estudio anteriormente descrito, los parámetros de evaluación de la respuesta tumoral fueron el cociente post-/pre-tratamiento de la superficie externa del nódulo tumoral sub-capsular y la masa del nódulo tumoral disecado.

Adicionalmente, cuando fue posible, se realizó una evaluación de las características histológicas del tumor, para establecer un grado de respuesta a nivel microscópico. Se empleó una escala semi-cuantitativa en base a las siguientes características o indicadores de respuesta: la relación parénquima/estroma, la persistencia de diferenciación glandular, la proporción de núcleos de apariencia viables (forma conservada, leptocromáticos) versus núcleos “bizarros” o con signos de daño (pleomórficos, hipercromáticos), y la presencia de mitosis. La respuesta histológica para cada rata fue graduada como **nivel bajo**, **intermedio** o **alto**, en base a la observación bajo microscopio óptico de los cortes de parafina de tumor teñidos con hematoxilina y eosina, por un solo observador entrenado. Los

preparados de cada muestra fueron barridos en toda su extensión, considerando todas las zonas de la muestra para la asignación del nivel de respuesta correspondiente. En los casos en los cuales la masa de tumor remanente no fue suficiente para tomar una muestra para la evaluación histológica, la respuesta fue considerada alta.

La radiotoxicidad fue evaluada en términos de signos clínicos generales, cambios en la masa corporal, cicatrización de la piel irradiada y alteraciones macroscópicas/histológicas en el hígado.

En los casos relevantes, el análisis estadístico fue realizado por Análisis de Varianza (ANOVA). La significancia estadística fue considerada a $p=0,05$.

3.9.2.2 Resultados

El flujo térmico promedio en el lóbulo del hígado inoculado, obtenido de la activación de los alambres de cobre insertados a los lados del tumor, fue $(2,3 \pm 0,5) \times 10^9 \text{ n cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$, donde la mayor contribución a la incerteza proviene de la dispersión estadística de los datos obtenidos. El rango de los valores individuales de boro en sangre fue de 1,2 a 16,2 ppm, mostrando una gran amplitud. En particular, en los tres casos con menor valor de concentración medido, se registraron errores técnicos durante la administración i.p. del compuesto. Retrospectivamente, se estableció que la dosis absorbida total administrada con **BPA-BNCT** fue de $(4,5 \pm 0,3) \text{ Gy}$ a $(16 \pm 4) \text{ Gy}$ en tumor y de $(4,2 \pm 0,4) \text{ Gy}$ a $(11 \pm 2) \text{ Gy}$ en hígado circundante al tumor. La dosis correspondiente a la componente boro fue de $(0,7 \pm 0,2) \text{ Gy}$ a $(12 \pm 4) \text{ Gy}$ en tumor, y de $(0,5 \pm 0,2) \text{ Gy}$ a $(7 \pm 2) \text{ Gy}$ en hígado. En la Tabla 3.11 se muestran las determinaciones de concentración de boro en sangre y el factor de flujo obtenido para cada animal. La dosis absorbida total y la componente de dosis boro entregada en hígado y en tumor, estimada retrospectivamente como se describió previamente, se muestra para cada caso. Excluyendo los 3 casos registrados con administración incorrecta del compuesto borado, el promedio de concentración de boro en sangre fue de $(13 \pm 3) \text{ ppm}$, inferior al reportado anteriormente (Tabla 3.9, $(16,5 \pm 3,1) \text{ ppm}$) aunque no significativamente. El valor promedio del factor obtenido entre el valor promedio de la determinación de flujo con alambres y el flujo neutrónico medido con el monitor (SPND) fue $0,55 \pm 0,11$, similar al promedio histórico registrado $(0,56 \pm 0,12)$. Como se puede observar, surge una notable variación en la dosis absorbida

ajustada retrospectivamente, como resultado de considerar la concentración de boro y el flujo neutrónico medidos individualmente. La dosis absorbida promedio calculada retrospectivamente del grupo **Solo Haz** fue de $(3,6 \pm 0,3)$ Gy.

Tabla 3.11 Valores de dosis absorbida calculados en forma retrospectiva para cada animal tratado con BPA-BNCT. Se muestran los valores individuales medidos de concentración de boro en sangre y el factor de flujo, utilizados para realizar los cálculos (ver texto). Los valores de dosis absorbida [Gy] se expresan como media \pm SD.

# rata	Determinaciones individuales		Dosis Absorbida [Gy]			
	Conc. boro en sangre [ppm]	Factor de flujo alambre a monitor	Hígado		Tumor	
			Dosis Total	Dosis Boro	Dosis Total	Dosis Boro
R66	1,2	0,69	4,1 \pm 0,4	0,3 \pm 0,3	4,5 \pm 0,3	0,7 \pm 0,2
R50	2,0	0,69	4,2 \pm 0,4	0,5 \pm 0,3	4,8 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3
R4	3,1	0,62	5,1 \pm 0,5	0,8 \pm 0,7	6,1 \pm 0,6	1,8 \pm 0,5
R82	9,0	0,46	5,0 \pm 0,8	1,4 \pm 0,7	6,8 \pm 0,9	3,3 \pm 0,9
R81	11,1	0,39	5,0 \pm 0,8	1,5 \pm 0,7	6,9 \pm 1,0	3,5 \pm 0,9
R73	14,6	0,41	5,5 \pm 1,0	2,0 \pm 1,0	8,1 \pm 1,3	4,7 \pm 1,2
R83	14,2	0,42	5,6 \pm 1,0	2,1 \pm 1,0	8,3 \pm 1,3	4,8 \pm 1,3
R95	10,6	0,47	6,2 \pm 1,0	2,0 \pm 1,0	8,8 \pm 1,3	4,6 \pm 1,2
R94	11,6	0,44	6,2 \pm 1,0	2,0 \pm 1,0	8,8 \pm 1,3	4,7 \pm 1,2
R61	6,3	0,70	6,9 \pm 0,9	2,5 \pm 0,9	8,9 \pm 1,5	4,5 \pm 1,5
R77	13,6	0,52	6,0 \pm 1,2	2,4 \pm 1,2	9,2 \pm 1,5	5,6 \pm 1,5
R76	13,7	0,54	6,1 \pm 1,2	2,5 \pm 1,2	9,4 \pm 1,5	5,8 \pm 1,5
R51	15,2	0,58	6,6 \pm 1,5	3,0 \pm 1,5	10,5 \pm 1,8	6,9 \pm 1,8
R86	13,5	0,51	7,0 \pm 1,4	2,8 \pm 1,4	10,6 \pm 1,7	6,3 \pm 1,7
R80	16,1	0,56	6,8 \pm 1,5	3,1 \pm 1,5	10,9 \pm 1,9	7,2 \pm 1,9
R85	13,0	0,57	7,3 \pm 1,5	3,0 \pm 1,5	11,2 \pm 1,8	7 \pm 2
R60	16,2	0,58	7,0 \pm 1,6	3,3 \pm 1,6	11 \pm 2	7,5 \pm 1,8
R84	15,0	0,56	7,7 \pm 1,7	3,4 \pm 1,7	12 \pm 2	8 \pm 2
R62	15,0	0,77	11 \pm 2	7 \pm 2	16 \pm 4	12 \pm 4

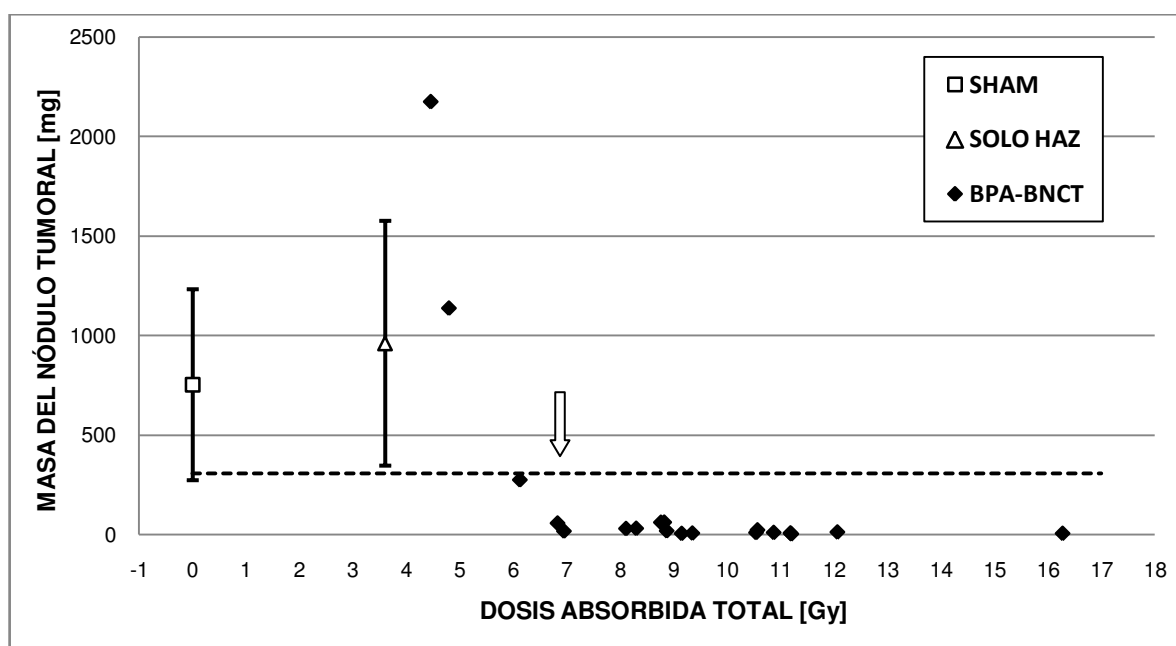
La relación entre la superficie externa post-/pre-tratamiento (Sup. Post/ Pre) y la masa de los nódulos tumorales a las 5 semanas posteriores al tratamiento con **BPA-BNCT** para cada uno de los animales se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12 Respuesta tumoral expresada como superficie del nódulo tumoral post-/pre-tratamiento y masa del nódulo tumoral. Los valores de dosis absorbida se expresan como media \pm SD. La incerteza asociada con la determinación de superficie tumoral post-/pre tratamiento fue del 10%, y la incerteza asociada con la masa tumoral se estimó en 5%.

Dosis Absorbida en tumor [Gy]				
# rata	Dosis Total	Dosis Boro	Superficie tumoral Post/Pre	Masa tumoral [mg]
R66	4,5 \pm 0,3	0,7 \pm 0,2	17	2200
R50	4,8 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	13	1140
R4	6,1 \pm 0,6	1,8 \pm 0,5	4,0	270
R82	6,8 \pm 0,9	3,3 \pm 0,9	3,1	55
R81	6,9 \pm 1,0	3,5 \pm 0,9	0,34	15,2
R73	8,1 \pm 1,3	4,7 \pm 1,2	1,7	28
R83	8,3 \pm 1,3	4,8 \pm 1,3	0,88	29
R95	8,8 \pm 1,3	4,6 \pm 1,2	0,95	59
R94	8,8 \pm 1,3	4,7 \pm 1,2	1,2	60
R61	8,9 \pm 1,5	4,5 \pm 1,5	2,3	16,7
R77	9,2 \pm 1,5	5,6 \pm 1,5	0,33	3,3
R76	9,4 \pm 1,5	5,8 \pm 1,5	0,31	4,9
R51	10,5 \pm 1,8	6,9 \pm 1,8	0,65	7,7
R86	10,6 \pm 1,7	6,3 \pm 1,7	0,69	21
R80	10,9 \pm 1,9	7,2 \pm 1,9	0,55	8,2
R85	11,2 \pm 1,8	7 \pm 2	0,22	5,6
R60	11,2 \pm 2	7,5 \pm 1,8	0,25	0,9
R84	12 \pm 2	8 \pm 2	0,73	10,4
R62	16 \pm 4	12 \pm 4	0,32	3,6

En las Figuras 3.22 y 3.23 se grafican estos resultados comparados con la media \pm DS de los valores obtenidos de las mediciones realizadas en los grupos **Sham** y **Solo Haz**. Teniendo en cuenta como indicador de respuesta la masa tumoral, si se considera el Intervalo de Confianza (IC) que incluya el 95% de los valores obtenidos para el grupo **Sham** [307 – 1195] mg y para el grupo **Solo Haz** [446 – 1474] mg, se consideraría que las ratas 66 y 50 no responden según este criterio, porque los valores correspondientes de masa del nódulo tumoral en estos dos casos caen dentro del IC del 95% para ambos grupos control.

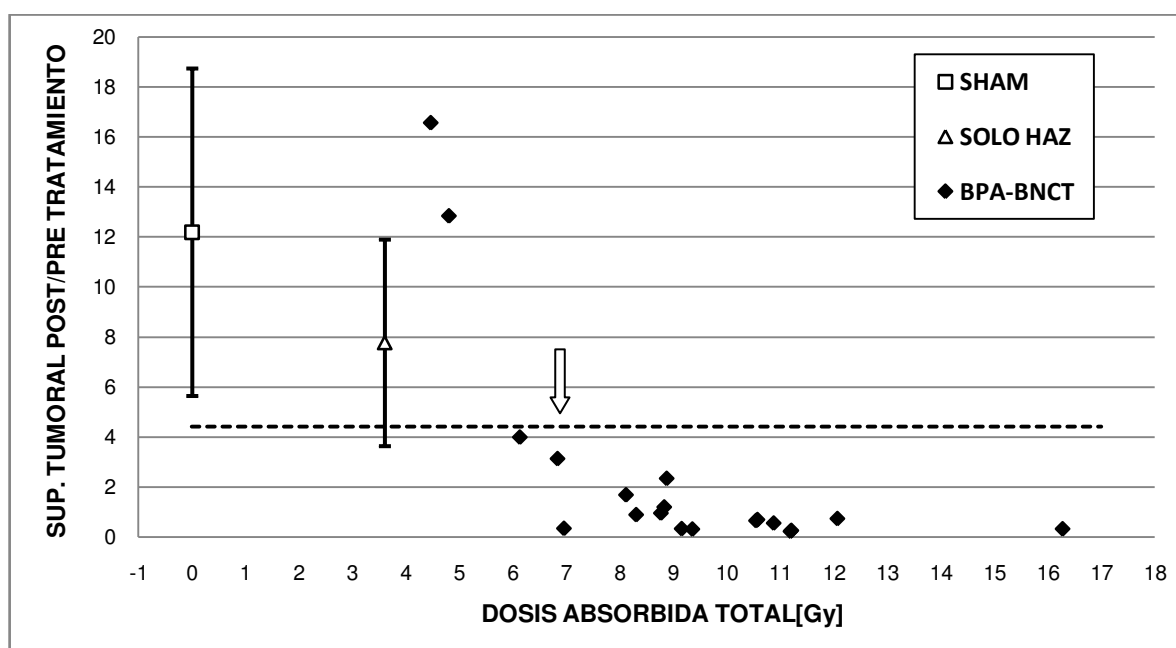
Figura 3.22 Masa del nódulo tumoral medida en cada animal 5 semanas post-tratamiento con BPA-BNCT, en función de la dosis total absorbida en tumor. Los resultados se comparan con la media \pm DS de los valores obtenidos de las mediciones realizadas en los grupos Sham y Solo Haz. **Línea punteada:** marca el límite inferior del intervalo de confianza que agrupa el 95% de los datos de los grupos Solo Haz y Sham. La **flecha** indica el límite de dosis absorbida total, según el criterio propuesto (ver texto), a partir del cual se observa algún grado de respuesta del tumor.



Análogamente, considerando como parámetro de respuesta la superficie tumoral Post/Pre y un IC del 95% para los valores del grupo **Sham** [6,1 – 18,3] y para el grupo **Solo Haz** [4,4 – 11,2], se podría considerar que las ratas 66 y 50 tampoco respondieron. Siguiendo este criterio de evaluación el resto de los animales habrían respondido al tratamiento, y la menor dosis que induce algún grado de control tumoral considerando ambos indicadores de respuesta sería 6,1 Gy (Rata 4).

Este análisis sugiere un potencial umbral de dosis para algún grado de respuesta a $\geq 6,1$ Gy de dosis absorbida total y a $\geq 1,8$ Gy de dosis boro.

Figura 3.23 Respuesta tumoral 5 semanas post-tratamiento con BPA-BNCT, medida como la relación de la superficie tumoral Post-/Pre-tratamiento en cada animal, en función de la dosis total absorbida en tumor. Los resultados se comparan con los valores promedio \pm DS obtenidos de las mediciones realizadas en los grupos Sham y Solo Haz. **Línea punteada:** marca el límite inferior del intervalo de confianza que agrupa el 95% de los datos de los grupos Solo Haz y Sham. La **flecha** indica el límite de dosis absorbida total en tumor, según el criterio propuesto (ver texto), a partir del cual se observa algún grado de respuesta del tumor.



A los fines del análisis estadístico, los datos del tratamiento BPA-BNCT fueron agrupados en **BPA-BNCT I**: dosis absorbida total en tumor de 4,5 Gy a 8,9 Gy (dosis boro en tumor entre 0,7 Gy y 4,5 Gy; N = 10), y **BPA-BNCT II**: dosis absorbida total en tumor de 9,2 Gy a 16 Gy (dosis boro en tumor entre 5,6 Gy y 11,8 Gy; N = 9).

En la Tabla 3.13 se muestran los datos agrupados para **BPA-BNCT I**, **BPA-BNCT II**, **Solo Haz** y **Sham**. Para el grupo **Sham**, 5 semanas post-tratamiento, la relación de superficie Post/Pre promedio fue $12,2 \pm 6,6$. Este valor indica que sin tratamiento, la superficie tumoral se incrementa en promedio 12 veces sobre un periodo de 5 semanas. En el caso del grupo **Solo Haz** la relación de superficie Post/Pre fue $7,8 \pm 4,1$. La diferencia entre los grupos **Sham** y **Solo Haz** no fue estadísticamente significativa. En el caso del subgrupo **BPA-BNCT I**, la superficie

Post/Pre fue $4,4 \pm 5,6$, Este valor fue significativamente menor que el valor correspondiente al grupo **Sham** ($p < 0,02$), pero no hubo diferencia significativa con el grupo **Solo Haz**. Para el subgrupo **BPA-BNCT II** el valor de superficie Post/Pre fue $0,45 \pm 0,20$, significativamente menor que para el grupo **Sham** ($p = 0,000$), el grupo **Solo Haz** ($P = 0,001$) y el grupo **BPA-BNCT I** ($p < 0,05$).

La masa tumoral pre-tratamiento fue (34 ± 17) mg. A las 5 semanas post-tratamiento, la masa tumoral creció significativamente ($p = 0,0002$) a (750 ± 480) mg en el grupo **Sham** y (960 ± 620) mg en el grupo **Solo Haz**; creció (pero no significativamente) a (390 ± 720) mg para el subgrupo **BPA-BNCT I** y cayó significativamente ($p = 0,0003$) a ($7,3 \pm 5,9$) mg para el subgrupo **BPA-BNCT II**. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos **Sham** y **Solo Haz**, ni entre el grupo **BPA-BNCT I** y los grupos **Sham** o **Solo Haz**. Por el contrario, se observaron diferencias altamente significativas entre el grupo **BPA-BNCT II** y los grupos **Sham** y **Solo Haz** ($p = 0,000$).

Tabla 3.13 Respuesta tumoral 5 semanas post-tratamiento expresada como superficie del nódulo tumoral Post/Pre-tratamiento y masa del nódulo tumoral, considerando los subgrupos **BPA-BNCT I** y **BPA-BNCT II** (ver detalle en el texto). La masa tumoral pre-tratamiento fue (34 ± 17) mg. Los valores se expresan como [media \pm DS].

Tratamiento	Superficie post/pre tratamiento	Masa tumoral post-tratamiento [mg]
Sham	$12,2 \pm 6,6$ n = 7	750 ± 480 n = 7
Solo Haz	$7,8 \pm 4,1$ n = 8	960 ± 620 n = 8
BPA-BNCT I	$4,4 \pm 5,6$ n = 10	390 ± 720 n = 10
BPA-BNCT II	$0,45 \pm 0,20$ n = 9	$7,3 \pm 5,9$ n = 9

Aunque las medias correspondientes a los subgrupos **BPA-BNCT I** y **BPA-BNCT II** difirieron ampliamente ((390 ± 720) Gy vs $(7,3 \pm 5,9)$ Gy respectivamente), la diferencia no alcanzó significancia estadística, principalmente debido a la gran

dispersión de los valores en cada grupo, producto del reagrupamiento de animales que recibieron dosis muy dispares.

Pese a estas amplias variaciones, es importante destacar que el subgrupo de tratamiento **BPA-BNCT II** alcanzó un 99% de reducción (1-[7,3/750]) de la masa tumoral comparado con el valor promedio que alcanzaron los tumores sin tratamiento (grupo **Sham**), mientras que el subgrupo **BPA-BNCT I** alcanzó un 48% de reducción (1-[390/750]).

En conjunto, el análisis de los datos agrupados mostró una respuesta estadísticamente significativa (versus los grupos Sham y Solo Haz) para el tratamiento BPA-BNCT II. Sin embargo, la respuesta tumoral no alcanzó significancia estadística para el BPA-BNCT I, sugiriendo la existencia de un límite de dosis absorbida total de 9.2 Gy (dosis boro = 5,6 Gy), para lograr un control tumoral estadísticamente significativo en este modelo experimental.

A nivel histológico, los grupos Sham y Solo Haz presentaron características similares a las observadas en el grupo pre-tratamiento (T_0): formaciones nodulares constituidas por epitelio con diferenciación glandular. Los acinos estaban compuestos por células con diferentes grados de atipia y figuras mitóticas, dispuestos en forma compacta, con escaso estroma y bien vascularizados.

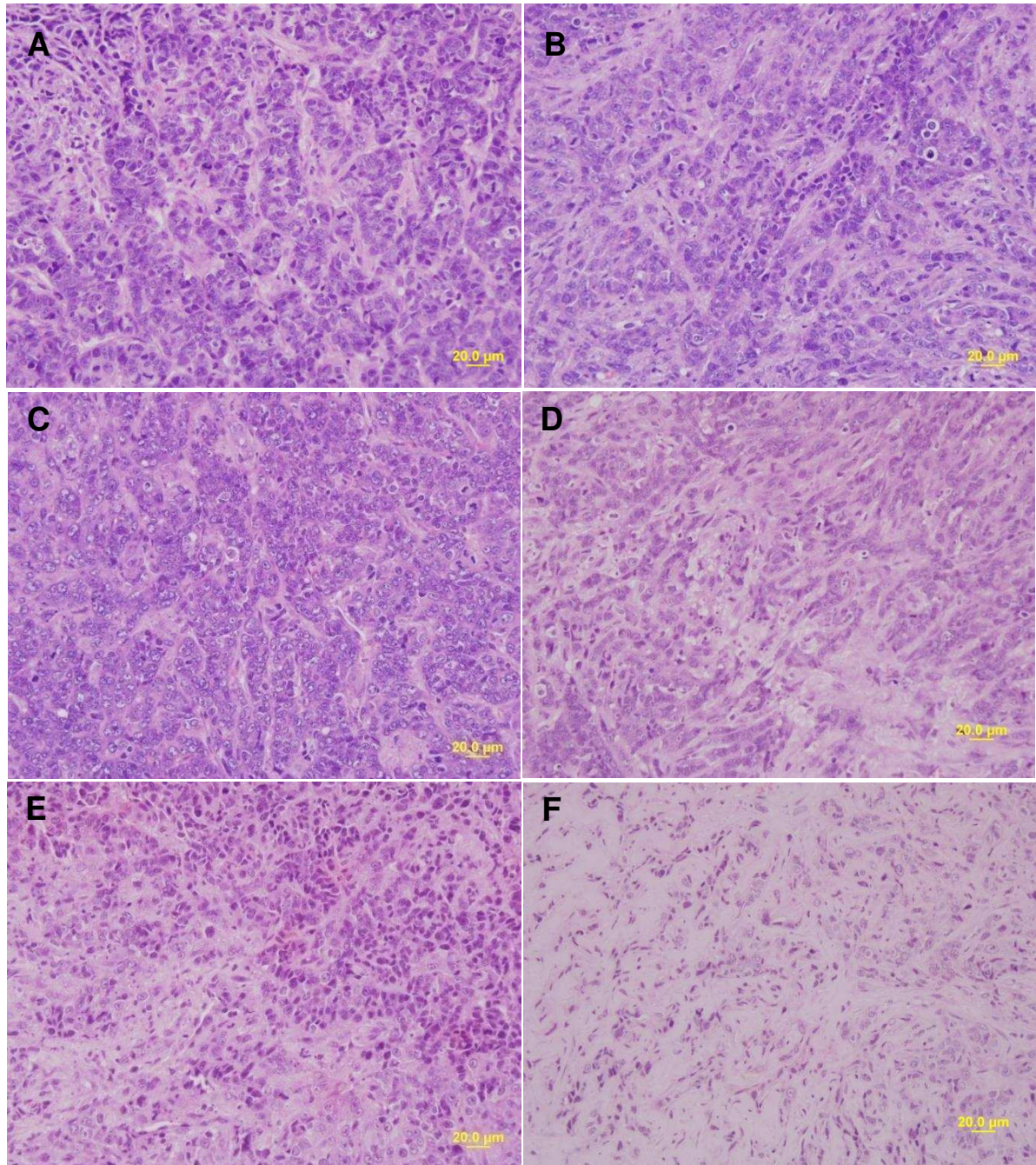
La Tabla 3.14 muestra el grado histológico asignado a la respuesta del tumor para cada rata del grupo BPA-BNCT disponible para la evaluación (N = 16; en 3 de los 19 casos, hubo fallas técnicas en el procesamiento de las muestras (fijación deficiente) que hicieron poco confiable la evaluación y no fueron considerados). Los animales que recibieron las dosis más bajas, mostraron baja respuesta histológica con características semejantes a las observadas en el grupo Sham. En los animales que recibieron los niveles de dosis más altos la respuesta a nivel microscópico se evidenció por la presencia de acinos glandulares atróficos separados por abundante estroma fibroso y constituidos por células con distintos cuadros de daño nuclear (hipercromatismo y polimorfismo). La gradación histológica semi-cuantitativa se correlacionó con la respuesta macroscópica evaluada mediante los indicadores descriptos anteriormente.

Tabla 3.14 Grado histológico asignado a la respuesta del tumor para cada animal del grupo BPA-BNCT disponible para la evaluación (3 casos fueron descartados por fallas técnicas en el procesamiento de las muestras). El grado de respuesta del tumor se definió según una escala semi-cuantitativa en **bajo**, **intermedio** o **alto**, basado en la evaluación subjetiva de cortes teñidos con hematoxilina-eosina (ver sección MyM y Figura 3.24).

# rata	Dosis absorbida total [Gy]	Grado histológico de respuesta tumoral
R66	4,5 ± 0,3	Bajo
R50	4,8 ± 0,4	Bajo
R4	6,1 ± 0,6	Intermedio
R82	6,8 ± 0,9	Bajo
R81	6,9 ± 1,0	Bajo
R73	8,1 ± 1,3	Intermedio
R83	8,3 ± 1,3	Intermedio
R95	8,8 ± 1,3	Intermedio
R94	8,8 ± 1,3	Intermedio
R61	8,9 ± 1,5	Intermedio
R77	9,2 ± 1,5	Alto
R76	9,4 ± 1,5	Alto
R51	10,5 ± 1,8	Alto
R80	10,9 ± 1,9	Alto
R60	11,2 ± 1,8	Alto
R62	16 ± 4	Alto

En la Figura 3.24 se muestran microfotografías representativas de los grupos tratados y los tres grados de respuesta descriptos.

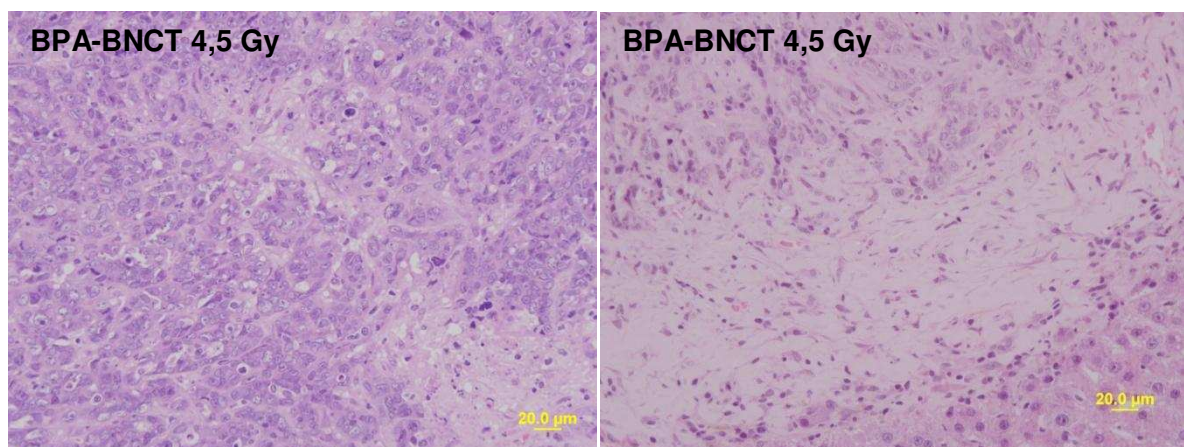
Figura 3.24 Ejemplos representativos de cuadros histológicos correspondientes a los diferentes grupos: **A) Pre-tratamiento (T₀), B) Sham y C) Solo Haz** con características similares: adenocarcinoma bien diferenciado con formaciones glandulares compactas y escaso estroma; **D) BPA-BNCT nivel de respuesta bajo**, persistencia de formaciones glandulares con estroma escaso; **E) BPA-BNCT nivel de respuesta intermedio**, proporción similar de parénquima y estroma tumoral, zonas de fibrosis, y numerosos núcleos picnóticos; **F) BPA-BNCT nivel de respuesta alto**, extensas áreas de estroma fibrohalino con parénquima tumoral remanente constituido por células con núcleos picnóticos.



Cuatro de los seis animales considerados con nivel alto de respuesta en la evaluación histológica, se consideraron en ese nivel debido a que la masa de los

tumores remanentes no permitió tomar muestras de tamaño suficiente para realizar el procesamiento y análisis definido. Cabe aclarar que estos cuatro casos, R60, R62, R76 y R77, presentaron las máximas respuestas de control tumoral según el indicador de la masa tumoral post-tratamiento, con masas inferiores a los 5 mg (Tabla 3.12). En la Figura 3.25, se observan en forma comparativa las características a nivel histológico de los niveles bajo y alto de respuesta, de dos casos del grupo BPA-BNCT con dosis absorbidas en tumor de 4,5 Gy y 10,9 Gy, respectivamente.

Figura 3.25 Comparación de cuadros histológicos correspondientes a los casos tratados con BPA-BNCT nivel de dosis en tumor 4,5 Gy (R66, panel izquierda) y 10.9 Gy (R80, panel derecha). **Nivel de respuesta bajo (izquierda):** alta relación parénquima/estroma, persistencia de diferenciación glandular, alta proporción de núcleos de apariencia viables (forma conservada, leptocromáticos) y presencia de mitosis. **Nivel de respuesta alto (derecha):** baja proporción de parénquima en relación con el estroma, células pocos viables con forma poco conservada y pérdida de diferenciación glandular, núcleos con signos de daño (pleomórficos, hipercromáticos).

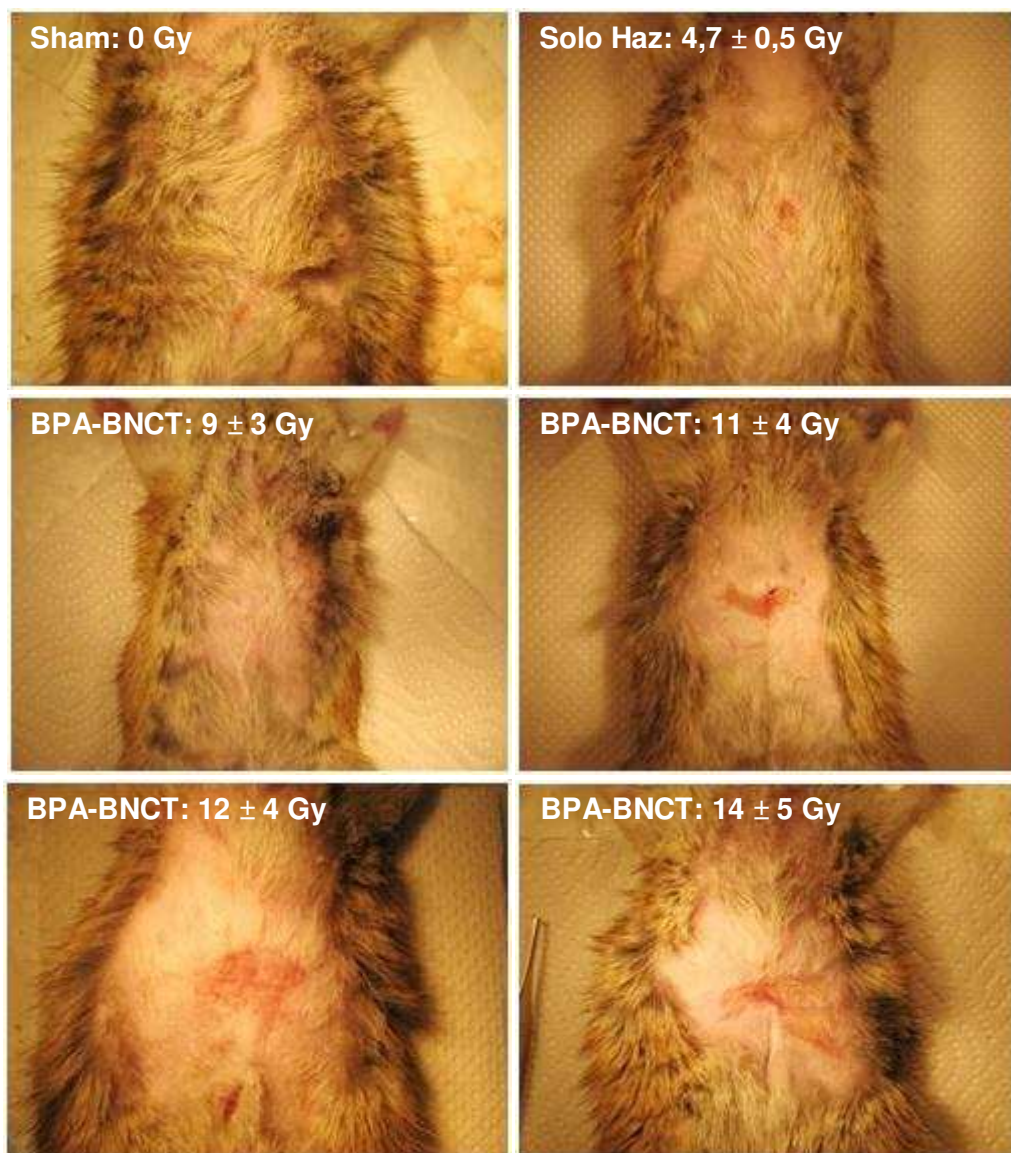


Durante el período de seguimiento, no se observaron cambios a nivel macroscópico o histológico en el hígado irradiado en ninguno de los grupos evaluados. No se observaron daños ostensibles a nivel histológico sino solamente moderada vacuolización citoplasmática y congestión en los hepatocitos.

Al igual que en el estudio previo, se registraron varios casos de ausencia de recuperación del pelaje (zona rasurada) o pérdida de pelo (alopecia), con problemas de cicatrización e infección de las heridas quirúrgicas, principalmente en la piel de la zona expuesta de los animales tratados con BPA-BNCT. En algunos casos la zona de la piel expuesta exhibió signos de inflamación y eritema reversible. A nivel histológico se observaron folículos pilosos atrofiados. En la Figura 3.26 se muestran

imágenes de casos representativos de piel irradiada 5 semanas luego de la aplicación de los diferentes tratamientos. Desde el punto de vista experimental, los daños observados alcanzaron un nivel límite dentro de lo admisible para el manejo de los animales. El efecto en piel se exacerbó con el aumento de la dosis y se circunscribió a la piel expuesta en la ventana del blindaje.

Figura 3.26 Imágenes representativas de la piel de animales 5 semanas luego de la exposición a los diferentes tratamientos estudiados. En cada una de las fotos se informa el tratamiento recibido y el nivel de dosis absorbida en piel. En los casos tratados con BPA-BNCT, las dosis en piel fueron calculadas retrospectivamente introduciendo una corrección en base a las mediciones de boro medidas en sangre para cada animal, de forma análoga a la estimación de dosis en el tumor y el hígado normal.



A nivel clínico general, los animales presentaron una buena recuperación de los tratamientos. Las curvas de masa corporal mostraron una evolución similar a la observada en los estudios previos (ANEXO V).

3.9.2.3 Discusión

Las metastasis de cáncer colorectal se manifiestan comúnmente en el hígado (Robertson et al. 2009), y su tratamiento continúa siendo un desafío. Aunque la resección completa de las metástasis ofrece el mejor pronóstico con una tasa de supervivencia a 5 años de 25-58 % (Adam et al. 2011), solo el 10-25 % de los pacientes son candidatos para cirugía dado el número y/o la localización de las metástasis (Bentrem et al. 2005; Zendel et al. 2014).

En los últimos 5 años, se han reportado regímenes combinados de quimioterapia neoadyuvantes, pre-operativos, para facilitar la reducción del tamaño de las metástasis hepáticas colorectales y hacer resecables metástasis inicialmente irresecables (Nordlinger et al. 2007, Adam et al. 2011, Zendel et al. 2014). Un problema adicional es la alta incidencia de recurrencia local luego de la cirugía. La enfermedad microscópica residual (Ruan and Warren 2005) es la causa de que más del 40% de los pacientes desarrollen recurrencias solo en hígado luego de la resección quirúrgica (Kavolius et al. 1996, Cardoso et al. 2007). En este sentido, el BNCT ofrece un mecanismo para el tratamiento de micro-metástasis hepáticas no detectables, mientras que con las modalidades de radioterapia externa conformada de fotones, solo pueden ser tratados los tumores visibles que son delineados en el plan de tratamiento. Adicionalmente, mediante BNCT se plantea tratar múltiples tumores en hígado sin exceder la tolerancia en hígado dado el factor selectivo asociado al compuesto borado que se utilice, mientras que cuando se aplica radioterapia conformada 3D al tratamiento de más de 3 tumores hepáticos, el riesgo de insuficiencia hepática es una limitación (Suzuki et al. 2007).

En el estudio precedente pudimos demostrar a nivel experimental *in vivo*, que mediante la aplicación de BPA-BNCT, 3 semanas post tratamiento, se puede inducir la remisión parcial en el 100% de los nódulos tumorales tratados (Pozzi et al. 2012). En este estudio, evaluamos la respuesta 5 semanas post-tratamiento con BPA-BNCT en el mismo modelo experimental en rata, en un rango de dosis determinado a partir de una evaluación dosimétrica retrospectiva individual para cada animal tratado. En la Tabla 3.15 se puede ver una comparación entre ambos estudios. En el

estudio de seguimiento por 3 semanas, la dosis absorbida prescrita a tumor fue 13 ± 3 Gy. Este rango de dosis se superpone con el rango de dosis del grupo BPA-BNCT II del estudio con 5 semanas de seguimiento. La relación de superficie tumoral externa post/pre tratamiento, se incrementó significativamente de tres a cinco semanas para los grupos Sham ($p = 0.002$) y Solo Haz ($p = 0.003$), pero se mantuvo igual para el grupo BPA-BNCT II. Del mismo modo, la masa tumoral se incrementó significativamente para los grupos Sham ($p = 0,03$) y Solo Haz ($p = 0,001$), pero disminuyó significativamente para el grupo BPA-BNCT II ($p = 0,049$).

Tabla 3.15 Comparación de la respuesta tumoral observada a diferentes tiempos post-tratamiento con BPA-BNCT, Solo Haz (irradiación sin compuesto borado) o Sham (sin tratamiento). Los valores se expresan como [media \pm DS].

Protocolo/Tiempo	3 semanas post-tratamiento (BPA-BNCT: dosis total absorbida a tumor 13 ± 3 Gy)		5 semanas post-tratamiento (BPA-BNCT II: dosis total absorbida a tumor entre 9-16 Gy)	
	Post/Pre Sup.	Masa (mg)	Post/Pre Sup.	Masa (mg)
Sham	$4,5 \pm 3,1$ (n=13)	346 ± 302 (n=13)	$12,2 \pm 6,6$ (n=7)	751 ± 480 (n=7)
Solo Haz	$2,7 \pm 1,8$ (n=10)	147 ± 102 (n=10)	$7,8 \pm 4,1$ (n=8)	960 ± 615 (n=8)
BPA-BNCT	$0,5 \pm 0,2$ (n=10)	19 ± 16 (n=10)	$0,4 \pm 0,2$ (n=9)	7 ± 6 (n=9)

Considerando el subgrupo de mayor dosis evaluado en este trabajo, se observó que 5 semanas post tratamiento se mantuvo el control tumoral, mientras que en los controles (grupos Solo Haz y Sham), los tumores crecieron significativamente ($p < 0,05$). La relación porcentual de masa tumoral (BPA-BNCT / Sham) luego de 5 semanas del tratamiento fue 1 %, cayendo desde 6 % observado a las 3 semanas de seguimiento.

Otra forma de observar la resupuesta luego de 5 semanas de seguimiento se representa en la Tabla 3.16, donde se muestra la incidencia de respuesta tumoral parcial (PR) y la respuesta tumoral parcial a menos del 50 % ($PR_{0,5}$) de la superficie tumoral inicial para cada uno de los grupos considerados en este estudio (misma evaluación de la Tabla 3.8, estudio 3 semanas de seguimiento). Los grupos Sham y

Solo Haz no presentaron respuesta tumoral (0%). En el caso del BPA-BNCT, respondieron el 100 % de los tumores que recibieron dosis mayores (BPA-BNCT II), mientras que en el grupo de menor rango de dosis respondieron 30 % de los tumores.

Tabla 3.16 Porcentaje de animales, 5 semanas post-tratamiento, cuyos tumores exhibieron una remisión parcial, en términos de algún grado de reducción (PR) o reducción mayor al 50% ($PR_{0,5}$) del área tumoral pre-tratamiento. La incidencia de remisión parcial fue de 0% para los grupos Sham y Solo Haz para ambos parámetros, mientras que el BPA-BNCT II indujo una RP en el 100% de los casos y una $RP_{0,5}$ en el 56% de los casos.

Sham	Solo Haz	BPA-BNCT I		BPA-BNCT II	
PR	PR	PR	$PR_{0,5}$	PR	$PR_{0,5}$
0%	0%	30%	10%	100%	56%

Nuestra hipótesis de trabajo fue que las diferencias entre la dosis absorbida prescrita y la realmente suministrada se deberían principalmente a la conocida dispersión en los valores de concentración de boro (por ej. Garabalino et al., 2011), a las variaciones en el flujo neutrónico que recibe el tumor (principalmente como resultado de diferencias de posicionamiento de los animales dentro del dispositivo de irradiación), y la potencial falta de reproducibilidad en la administración intraperitoneal de compuestos. El procedimiento de estimar la dosis en forma retrospectiva aplicado en este estudio, permitió evaluar la respuesta en función de la dosis absorbida total realmente entregada. De este modo, fue posible establecer experimentalmente, un potencial umbral de dosis absorbida para alcanzar algún grado de respuesta tumoral en 6,1 Gy (dosis boro alrededor de 1,8 Gy), y un potencial umbral de dosis absorbida total para alcanzar un grado de control tumoral estadísticamente significativo en alrededor de 9,2 Gy (dosis boro aproximada de 5,6 Gy).

El control tumoral progresó desde el rango de baja a altas dosis, sin presentar cambios agudos en hígado en ninguno de los casos tratados en el período de evaluación. Luego del tratamiento con BPA-BNCT, no se observaron efectos tóxicos radio-inducidos a nivel clínico general que afecten la recuperación de los animales. Sin embargo, sería útil realizar un estudio radiobiológico orientado específicamente a la evaluación de los efectos en piel y potenciales alteraciones en la cicatrización de

la herida quirúrgica. Asimismo, sería necesario realizar estudios diseñados para evaluar la potencial toxicidad en hígado a largo plazo.

En un informe relacionado a la radiotolerancia del hígado, el Dr. Szejnberg y col., en colaboración con el grupo de investigadores de la Universidad de Pavia, realizaron una revisión de diversas publicaciones sobre irradiación de hígado durante tratamientos de radioterapia con fotones, y concluyeron que la dosis de tolerancia de hígado completo a una única fracción (FU, homogénea), sería de 8 y 10 Gy para tratamientos de cáncer primario y metástasis, respectivamente (Szejnberg et al. 2013). Por consiguiente, sugirieron que serían dichos valores los que habría que usar como referencia como dosis equivalente de tolerancia para la aplicación de BNCT a nivel clínico, hasta que se realicen estudios específicos para obtener los valores correspondientes a BNCT.

El impacto de reducir la dosis de tolerancia del hígado afecta la dosimetría para un dado tratamiento, ya que la dosis máxima que se puede entregar a tumor está limitada por la dosis máxima tolerable por el tejido no tumoral en el volumen de tratamiento. En la clínica, la enfermedad hepática inducida por radiación, RILD, es un síndrome clínico de hepatomegalía anictérica, ascitis y elevación de los niveles de enzimas hepáticas (particularmente fosfatasa alcalina) que ocurre típicamente entre dos semanas y cuatro meses después de completar un tratamiento de radioterapia convencional (Dawson et al. 2001). Un punto importante que se destaca, es que el riesgo de ocurrencia o no de RILD, depende fuertemente de la proporción del total del hígado que se vea afectada por el tratamiento. Es decir, existiría un volumen crítico para el cual, si se prescribe un valor de dosis por debajo del límite, definiría un tratamiento seguro. Entonces, la utilización de distribuciones de dosis no uniformes en BNCT podría permitir aumentar las dosis a tumor mientras se protege el tejido normal (volumen crítico) (Szejnberg et al. 2013, Pan et al. 2010). Sin embargo, la aplicación de BNCT para el tratamiento de metástasis hepáticas, por definición, justamente requiere una distribución de dosis lo más homogénea posible en el intento de controlar micro-metástasis de forma selectiva (debido al efecto y/o distribución diferencial del compuesto borado).

En el presente trabajo, las dosis absorbidas suministradas a hígado en el modelo experimental en rata se encuentran cercanas al límite de tolerancia de dosis equivalente a fotones para ese órgano según el informe anterior (10 Gy). Si se

considera que la equivalencia a fotones de las componentes de dosis de alto LET, aumentaría considerablemente el valor de la conversión a dosis equivalentes de las dosis absorbidas suministradas, seguramente el límite de 10 Gy equivalente en hígado haya sido superado.

Una revisión particular del caso nos lleva a considerar detalles que podrían explicar la ausencia de efectos radiotóxicos. Como se mencionó en la sección 3.9.2.1, las dosis reportadas surgen de un cálculo retrospectivo que considera la concentración de boro en sangre y el flujo neutrónico de manera individual para cada animal. Estas dosis son la mejor estimación que pudimos lograr de la dosis en tumor y en el hígado circundante al tumor. Si bien no se puede asegurar que la dosis en la posición del nódulo tumoral sea la máxima recibida en todo el hígado, el lóbulo inoculado se presenta hacía el centro de la apertura del blindaje y, por diseño, se estudió el modelo intentando que sea la zona más expuesta. A la inversa, siguiendo la misma línea de pensamiento, se puede asegurar que una gran parte del hígado recibe una dosis menor a la que se reporta en las Tablas 3.11 y 3.12.

Por otro lado, del trabajo de simulación del blindaje realizado por Farías (apartado 3.8.2) se concluye que para el volumen de hígado modelado se observa una diferencia relativa entre el valor máximo y mínimo de flujo del 70%, y que el flujo neutrónico medio sobre el volumen corresponde al 23% del flujo máximo entregado por el reactor en la posición de irradiación (Farías 2010). Es decir, claramente una gran parte del hígado en posiciones más internas del blindaje sobre la ventana, se ve expuesto a un flujo neutrónico menor que las posiciones más externas.

Otra cuestión que debe analizarse es la equivalencia de la componente de dosis gamma proveniente de la fuente de irradiación. Como se mencionó en este trabajo, hay autores que establecen que dicha componente debería ser corregida por un factor de reducción ($DFR < 1$), debido a la baja tasa de dosis gamma que presentan las fuentes de reactores utilizadas en BNCT, en comparación con la tasa de dosis utilizada en radioterapia con fotones (rango de comparación: 0,13 Gy/min vs 1 Gy/min) (Hopewell et al. 2012). La justificación de esta corrección se basa en la mayor probabilidad de reparación de daño subletal que se asocia con la exposición a una tasa de dosis menor. En las irradiaciones realizadas en este estudio, la componente gamma representa alrededor del 50% de la dosis absorbida total, con lo cual un factor de reducción (considerado aproximadamente en un rango de 0,5 a

0,7) determinaría una dosis equivalente menor asociada a la componente de dosis absorbida gamma de la fuente.

En conjunto, estas consideraciones permiten sostener la idea de que en el modelo experimental estudiado, gran parte del hígado recibe una dosis mucho menor a la prescrita al nódulo tumoral y a la que recibe el hígado que rodea al mismo. La irradiación heterogénea del órgano en los experimentos evitaría que el hígado reciba una dosis superior a los límites considerados, o por lo menos evitaría que el hígado reciba una dosis global en el órgano que provoque una disfunción irreversible. Sin embargo, vale la pena remarcar que no se puede descartar la existencia de algún grado de daño hepático de acuerdo a lo concluido en este trabajo. Sería necesario realizar un estudio cuidadoso orientado a tal fin, quizás basado en estudios de la función hepática a través del seguimiento de niveles de enzimas asociadas (principalmente transaminasas y fosfatasa alcalina), del seguimiento a largo plazo con evaluación histológica de diferentes regiones del hígado, y realizando una dosimetría por modelado computacional, que permita establecer la distribución de dosis-volumen que recibe el órgano. A su vez, quedaría por definir la forma más representativa de valorar la dosis equivalente para el caso del hígado, tema no resuelto hasta el momento y que resulta imprescindible si finalmente se quieren comparar resultados con los derivados del tratamiento con fotones.

La extrapolación de estudios a un escenario clínico es característicamente limitada. En este sentido, el presente estudio proporciona datos sobre las dosis terapéuticamente útiles, calculadas retrospectivamente a partir de la medición de la concentración de boro en sangre y el flujo de neutrones térmicos en el sitio del tumor. Sin embargo, el modelo experimental no permite analizar las complejidades de la distribución de flujo en un hígado humano para el caso de tratamiento con BNCT ex-situ (p/ej. Zonta et al. 2006) o in-situ (p/ej. Suzuki et al. 2007). El desafío de alcanzar un flujo térmico homogéneo y terapéuticamente útil en un hígado humano debe ser abordado en cada caso, utilizando diferentes estrategias como la irradiación con haces de neutrones epitérmicos, el uso de materiales tejido-equivalente, rotación del órgano en el caso de BNCT ex-situ, tratamiento de múltiples campos y/o doble aplicación de BNCT, entre otras. Dentro de este contexto, BNCT sería una técnica potencialmente atractiva para tratar metástasis

hepáticas multifocales, no resecables, bilobares derivadas de cáncer colorrectal, que no responden a la quimioterapia (por ejemplo, Zonta et al. 2006). El presente estudio presenta evidencia inequívoca de la eficacia terapéutica de BNCT para el tratamiento de metástasis hepáticas en un modelo experimental, sin toxicidad detectable en hígado durante el tiempo de seguimiento, y proporciona información radiobiológica que sería fundamental para el diseño de protocolos clínicos potencialmente útiles.

3.9.2.4 Conclusión

El tratamiento con BPA-BNCT induce una remisión parcial de nódulos colorectales experimentales en hígado de ratas BDIX 5 semanas post-tratamiento, manteniendo la tendencia de respuesta observada en el estudio anterior a menor tiempo de seguimiento. Los valores de control tumoral al tiempo evaluado muestran un efecto terapéutico progresivo con el aumento de la dosis. El análisis de los datos agrupados demostraron una respuesta significativa del subgrupo de tratamiento BPA-BNCT II (mayores dosis) comparada con los grupos control (Solo Haz y Sham), mientras que la respuesta tumoral del subgrupo BPA-BNCT I (menores dosis) no alcanzó niveles de significancia estadística. Este resultado sugiere un potencial umbral de dosis total absorbida en tumor por encima de 9 Gy (dosis boro ≥ 5.6 Gy), para lograr inducir un control tumoral estadísticamente significativo en este modelo experimental, 5 semanas post-tratamiento.

Capítulo 4

4 Discusión final

En este trabajo de tesis se abordan dos estudios radiobiológicos a nivel experimental sobre la aplicación de BNCT: para el tratamiento de cáncer bucal y metástasis hepáticas.

El cáncer se considera una de las principales causas de muerte a nivel mundial y la incidencia de esta enfermedad seguramente seguirá creciendo a la par del aumento de la expectativa de vida. El conocimiento actual sobre la complejidad del desarrollo del cáncer y su origen multifactorial demuestran la imposibilidad de apoyarse en un único tratamiento y justifican el avance en el desarrollo de nuevas estrategias, orientadas principalmente a resolver los casos que no responden a las terapias estándar, disminuir la toxicidad del tratamiento, mejorar la calidad de vida del paciente y evitar cirugías mutilantes.

La radioterapia es uno de los principales métodos de tratamiento que en los últimos años se ha perfeccionado con el avance de nuevas tecnologías, principalmente con el desarrollo de mejores equipos y sistemas que permiten el suministro más exacto y preciso de la dosis de radiación ionizante que se prescribe. Estos avances tecnológicos también permiten que hoy exista un gran avance en la aplicación de tratamientos con iones y partículas cargadas, aprovechando el beneficio del uso de la radiación de alto LET.

La Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT), es una modalidad terapéutica binaria dentro de la radioterapia, que combina el direccionamiento bioquímico del agente terapéutico al tumor (compuesto borado) y la irradiación con neutrones, dando lugar a la aplicación de radiación de alto LET preferencialmente en el tumor. Esta estrategia permite dañar al tumor preservando los tejidos normales. Asimismo, debido al direccionamiento bioquímico del compuesto borado a las células tumorales, BNCT permite el tratamiento de micrometástasis y células infiltrantes no identificables por estudios de imágenes. El estudio y aplicación de BNCT requiere del dominio de diversas áreas de conocimiento, y Argentina se encuentra entre uno de los pocos países con un proyecto que cuenta con recursos humanos en todas ellas.

Una de estas disciplinas es la radiobiología, que contribuye al desarrollo de la radioterapia aportando una base conceptual, identificando los mecanismos y procesos involucrados en la respuesta de los tumores y tejidos normales a la radiación, y promoviendo el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. Este trabajo de tesis se encuadra dentro de este contexto, con el objetivo específico de promover el desarrollo de la radiobiología en el marco de las necesidades del proyecto de BNCT de Argentina, contribuir al conocimiento de la radiobiología de BNCT para optimizar su eficacia terapéutica para distintas patologías y articular los estudios experimentales con la clínica.

A nivel internacional se observa un creciente interés en profundizar las investigaciones sobre la eficacia y seguridad de la aplicación BNCT para cáncer avanzado o recurrente de cabeza y cuello, entre los que se incluye el cáncer bucal. A lo largo del segundo capítulo de la tesis, se describe el trabajo de adaptación de la fuente de neutrones del reactor RA-3 para la realización de estudios *in vivo* en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster. Se demuestra la eficacia terapéutica de la aplicación de BNCT en este modelo y la factibilidad del uso de la facilidad de irradiación del RA-3 para la realización de este tipo de estudios. Este trabajo hizo posible el desarrollo de nuevas líneas de investigación en BNCT en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, que se ven reflejadas en varios trabajos de tesis, presentaciones a congresos y publicaciones de nuestro grupo de trabajo.

Si bien en BNCT se intenta maximizar la componente boro de la dosis que afecta preferencialmente al tumor, el tratamiento inevitablemente involucra una combinación de componentes de dosis de radiación de bajo y alto LET que afectan al tumor y al tejido normal en forma similar. A partir de la comparación de resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en ensayos similares con el modelo de cáncer bucal experimental de la bolsa de la mejilla del hámster, utilizando distintas fuentes con diferentes espectros neutrónicos (reactores RA-1, RA-3 (esta tesis) y RA-6), se plantea la necesidad de realizar estudios a futuro que permitan evaluar la influencia que pueden tener las diferentes componentes de dosis de fondo sobre la respuesta tumoral y la respuesta del tejido normal, así como la posible existencia de sinergismos con la componente boro del BNCT.

En cuanto a los casos de metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorectal, hoy en día existen gran cantidad de pacientes sin una alternativa de tratamiento debido al tamaño, la localización y/o el número de las metástasis que los afectan. Considerando el interés local e internacional de aplicar la técnica de BNCT para el tratamiento de metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorectal, en esta tesis se propuso evaluar, de forma sistemática a nivel experimental, la eficacia terapéutica de la aplicación de BNCT en un modelo de metástasis hepática de adenocarcinoma de colon en ratas, y la potencial radiotoxicidad del tratamiento en el hígado. En el capítulo 3 se describe la puesta a punto de un modelo experimental y un sistema de irradiación adaptado para la fuente de irradiación de la columna térmica del reactor RA-3. Se demuestra que mediante la aplicación de BPA-BNCT, se puede inducir de forma progresiva la remisión parcial en el 100% de los nódulos tumorales tratados a las 3 y 5 semanas post-tratamiento. A partir del procedimiento de estimación retrospectiva de la dosis absorbida en tumor aplicado en el estudio a 5 semanas de seguimiento, se sugiere la existencia de un potencial umbral de dosis absorbida total para alcanzar algún grado de respuesta tumoral en 6,1 Gy (dosis boro alrededor de 1,8 Gy), y un potencial umbral de dosis absorbida total para alcanzar un grado de control tumoral estadísticamente significativo en alrededor de 9,2 Gy (dosis boro aproximada de 5,6 Gy).

A nivel macroscópico e histológico no se observaron efectos radiotóxicos en hígado en ninguno de los casos para todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, surge la necesidad de realizar un estudio a futuro orientado a evaluar la existencia de algún grado de daño hepático, principalmente a largo plazo, no evaluable en el presente trabajo. A su vez, considerando que para el modelo experimental y el sistema de irradiación utilizado, la distribución de dosis absorbida fue heterogénea en el volumen total del hígado, sería interesante la realización de una dosimetría por modelado computacional, que permita establecer la distribución de dosis-volumen que recibe el órgano y asociar esa distribución de dosis con la evaluación de radiotoxicidad.

Los dos compuestos borados evaluados en esta tesis (BPA y GB-10), junto con el BSH, son los únicos compuestos aprobados para su utilización en humanos. La optimización de la biodistribución de los compuestos borados actualmente autorizados para su uso en el hombre es una excelente estrategia a corto y medio

plazo, con un menor costo para su implementación. Esto puede ayudar a reducir la brecha entre la investigación y la aplicación clínica, a la vez que se adquiere conocimiento que puede ser aplicable si a futuro, se aprueban nuevos portadores de boro más perfectos. A su vez, la perspectiva del uso creciente de aceleradores como fuente de neutrones para BNCT haría prever la posibilidad de realización de nuevos ensayos clínicos para distintas patologías. En este contexto, cobran especial relevancia los estudios radiobiológicos de BNCT en modelos experimentales *in vivo*, orientados a optimizar la eficacia terapéutica de BNCT para distintas patologías y diseñar protocolos de tratamientos seguros y eficaces.

5 Referencias

Adam R, Hoti E, Bredt LC. Oncosurgical strategies for metastatic liver cancer. *CIR ESP* 89(1):10-19, (2011).

Aihara T, Hiratsuka J, Morita N, Uno M, Sakurai Y, Maruhashi A, Ono K, Harada T. First clinical case of boron neutron capture therapy for head and neck malignancies using ^{18}F -BPA PET. *Head Neck* 28(9):850-5, (2006).

Aiyama H, Nakai K, Yamamoto T, Nariai T, Kumada H, Ishikawa E, Isobe T, Endo K, Takada T, Yoshida F, Shibata Y, Matsumura A. A clinical trial protocol for second line treatment of malignant brain tumors with BNCT at University of Tsukuba. *Appl Radiat Isot* 69(12):1819-22, (2011).

Allen BJ, Wallace SA, Carolan MG. Can epithermal boron neutron capture therapy treat primary and metastatic liver cancer? In: Larson B, Crawford J, Wienreich R (eds) *Advances in neutron capture therapy*. Volume 1, medicine and physics p118-121, (1997).

Altieri S, Braghieri A, Bortolussi S, Bruschi P, Fossati F, Pedroni P, Pinelli T, Zonta A, Ferrari C, Prati U, Roveda L, Barni S, Chiari P, Nano R. Neutron radiography of human liver metastases after BPA infusion. In: *Proceedings 11th world congress on neutron capture therapy*, (2004).

Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* 61(4):250-81, (2011).

Aleynik V, Burdakov A, Davydenko V, Ivanov A, Kanygin V, Kuznetsov A, Makarov A, Sorokin I, Taskaev S. BINP accelerator based epithermal neutron source. In: *New Challenges in Neutron Capture Therapy 2010, Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy*, Buenos Aires, Argentina, (2010).

Aromando RF, Heber EM, Trivillin VA, Nigg DW, Schwint AE, Itoiz ME. Insight into the mechanisms underlying tumor response to boron neutron capture therapy in the hamster cheek pouch oral cancer model. *J Oral Pathol Med* 38(5):448-54, (2009).

Aromando RF, Trivillin VA, Heber EM, Pozzi ECC, Schwint AE, Itoiz ME. Early effect of boron neutron capture therapy mediated by boronophenylalanine (BPA-BNCT) on mast cells in premalignant tissue and tumors of the hamster cheek pouch. *Oral Oncol* 46:355-359, (2010).

Barth RF, Soloway AH, Fairchild RG. Boron neutron capture therapy of cancer. *Cancer Res* 50(4): 1061-70, (1990).

Barth RF, Coderre JA, Vicente MGH, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin Cancer Res* 11:3987-4002, (2005).

Barth RF. Boron neutron capture therapy at the crossroads: challenges and opportunities. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl):S3-6, (2009).

Barth RF, Vicente MG, Harling OK, Kiger WS 3rd, Riley KJ, Binns PJ, Wagner FM, Suzuki M, Aihara T, Kato I, Kawabata S. Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer. *Radiat Oncol* 7:146, (2012).

Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.*; 9(3):193-9, (2012).

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: 105-8, (1992).

Bennet BD, Mumford-Zisk J, Coderre JA and Morrison GM. Subcellular localization of pboronophenylalanine-delivered boron-10 in the rat 9l gliosarcoma, cryogenic preparation in vitro and in vivo. *Radiat Res* 140: 72-8, (1994).

Bentrem DJ, Dematteo RP, Blumgart LH. Surgical therapy for metastatic disease to the liver. *Annu Rev Med* 56:139–156, (2005).

Bortolussi S, Bakeine JG, Ballarini F, Bruschi P, Gadan MA, Protti N, Stella S, Clerici A, Ferrari C, Cansolino L, Zonta C, Zonta A, Nano R, Altieri S. Boron uptake measurements in a rat model for Boron Neutron Capture Therapy of lung tumours. *Appl Radiat Isot* 69(2):394-8, (2011a).

Bortolussi S, Pinto JM, Thorp SI, Farias RO, Soto MS, Szejnberg M, Pozzi ECC, Gonzalez SJ, Gadan MA, Bellino AN, Quintana J, Altieri S and Miller M.

Simulation of the neutron flux in the irradiation facility at RA-3 reactor. *Appl Rad Isot* 69:1924-27, (2011b).

Bregadze V, Semioshkin A, Sivaev I. Synthesis of conjugates of polyhedral boron compounds with tumor-seeking molecules for neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot* 69(12):1774-7, (2011).

Buchsbaum JC. Proton therapy - What is it and what can it do to help my patients? *Applied Radiation Oncology*, <http://appliedradiationoncology.com>, (2013).

Burlon AA. Aplicaciones de aceleradores a la terapia por captura neutrónica en boro BNCT (Boron Neutron Capture Therapy). Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencia y Tecnología (Mención Física), Instituto de Tecnología "Prof. Jorge A. Sabato", Universidad de General San Martín, (2001).

Busse PM, Harling OK, Palmer MR, Kiger III WS, Kaplan J, Kaplan I, Chuang CF, Goorley JT, Riley KJ, Newton TH, Santa Cruz GA, Lu X-Q, 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 Neuro-Oncol* 62:111-121, (2003).

Capuani S, Gili T, Bozzali M, Russo S, Porcari P, Cametti C, D'Amore E, Colasanti M, Venturini G, Mariaviglia B, Lazzarino G, Pastore FS. L-DOPA preloading increases the uptake of borophenylalanine in C6 glioma rat model: a new strategy to improve BNCT efficacy. *International Journal Radiation Oncology Biology Physics* 72(2):562-567, (2008).

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. *Int J Radiat Biol* 83(10):699-706, (2007).

Cardoso J, Nievas S, Pereira M, Schwint A, Trivillin V, Pozzi E, Heber E, Monti Hughes A, Sanchez P, Bumashny E, Itoiz M, Liberman S. Boron biodistribution study in colorectal liver metastases patients in Argentina. *Appl Radiat Isot*. 67(7-8 Suppl):S76-9, (2009).

Cartelli D, Baldo M, Bergueiro J, Castell W, Padulo J, Suárez Sandín JC, Igarzabal M, Capoulat ME, Minsky DM, Erhardt J, Mercuri D, Gagetti L, Suárez Anzorena M, del Grosso MF, Valda AA, Canepa N, Real N, Debray ME, Somacal

HR, Herrera MS, Gun M, Tacca H, Kreiner AJ. Present Status of Accelerator-Based BNCT. Proceedings of 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, Helsinki, Finland, (2014).

Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann J, Klatzmann D. Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of suicide gene. Proc Natl Acad Sci 90:7024-7028, (1993).

Ceballos C, Esposito J, Agosteo S, Colautti P, Conte V, Moro D, Pola A. Towards the Final BSA Modeling for the Accelerator-driven BNCT facility at INFN LNL. In: *New Challenges in Neutron Capture Therapy 2010* (Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy), Buenos Aires, Argentina, (2010).

Chanana AD, Capala J, Chadha M, Coderre JA, Diaz AZ, Elowitz EH, Iwai J, Joel DD, Liu HB, Ma R, Pendzick N, Peress NS, Shady MS, Slatkin DN, Tyson GW, Wielopolski L. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: interim results from the phase I/II dose-escalation studies. Neurosurgery 44(6):1182-92, (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. 315-20. Elsevier, Lausanne, (1997).

Chen YK y Lin LM. DMBA-induced hamster buccal pouch carcinoma and VX2-induced rabbit cancer as a model for human oral carcinogenesis. Expert Rev Anticancer Ther 10(9):1485-96, (2010).

Cheng JC, Chuang VP, Cheng SH, Huang AT, Ling Y, Cheng T, Yang P, You D, Jian JJ, Tsai SY, Sung JL, Horng C. Local radiotherapy with or without transcatheter arterial chemoembolization for patients with unresectable hepatocellular carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 47(2):435-442, (2000).

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, Chanana AD, Joel DD, Elowitz EH, Micca PL, Nawrocky MM, Chadha M, Gebbers JO, Shady M y Statkin DN. Biodistribution of

boronphenylalanine in patients with glioblastoma multiforme: boron concentration correlates with tumor cellularity. *Radiat Res* 149:163-170, (1998).

Coderre JA y Morris GM. The Radiation Biology of Boron Neutron Capture Therapy. *Radiat Res* 151:1-18, (1999).

Crawley V y Gadan M. Proyecto final: Caracterización preliminar de la facilidad de irradiación de muestras biológicas del reactor RA-3 para la implementación del tratamiento de metástasis en hígado con BNCT. Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Favaloro, (2007).

Crossley EL, Issa F, Scarf AM, Kassiou M, Rendina LM. Synthesis and cellular uptake of boron-rich pyrazolopyrimidines: exploitation of the translocator protein for the efficient delivery of boron into human glioma cells. *Chem Commun (Camb)* 47(44):12179-81, (2011).

Curado MP, Edwards B; Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publications N° 160 Vol. IX, (2007).

Curley SA y Izzo F. Radiofrequency ablation of primary and metastatic hepatic malignancies. *Int J Clin Oncol* 7(2):72-81, (2002).

Dawson LA, Ten Haken RK, Lawewnce TS. Partial Irradiation of the Liver. *Seminars in Radiation Oncology* 11(3):240-246, (2001).

Detta A y Cruickshank GS. L-amino acid transporter-1 and boronophenylalanine-based boron neutron capture therapy of human brain tumors. *Cancer Res* 69(5):2126-32, (2009).

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 Neuro-Oncol* 62:101-109, (2003).

De Jong GM, Aarts F, Hendriks T, Boerman OC, Bleichrodt RP. Animal models for liver metastases of colorectal cancer: research review of preclinical studies in rodents. *J Surg Res* 154:167-176, (2009).

Escobar J. Apunte de Radioterapia, Materia Medicina Nuclear, Carrera de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan. <http://dea.unsj.edu.ar/mednuclear/apuntert.pdf>, (2007).

Farías R. Simulación del flujo neutrónico en el contenedor para irradiación de ratas. Comparación del flujo de neutrones en diferentes situaciones. Informe técnico interno, CNEA, (2010).

Feng B, Tomizawa K, Michiue H, Miyatake S, Han XJ, Fujimura A, Seno M, Kiriata M, Matsui H. Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials* 30(9):1746-55, (2009).

Feng L y Wang Z. Chemopreventive effect of celecoxib in oral precancers and cancers. *Laryngoscope* 116(10): 1842-5, (2006).

Ferrari C, Zonta C, Cansolino L, Clerici AM, Gaspari A, Altieri S, Bortolussi S, Stella S, Bruschi P, Dionigi P, Zonta A. Selective uptake of p-boronophenylalanine by osteosarcoma cells for boron neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl): S341-4, (2009).

Figueras J, Torras J, Valls C, Ramos E, Lama C, Busquets J, Lladó L, Rafecas A, Fabregat J, Serrano T, López S, Martí-Rague J, Jaurrieta E. Resección de metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal. Índice de reseccabilidad y supervivencia a largo plazo. *Cirugía Española* 70(1):27-33, (2001).

Fokas E, Kraft G, An H y Engenhardt-Cabillic. Ion beam radiobiology and cancer: Time to update ourselves. *Biochimica et Biophysica Acta* 1796:216–229, (2009).

Fuji H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai M, Suzuki M, Asano T, Doki Y, Kiriata M, Ono K, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y, Lee CM. Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors in vivo. *Radiat Oncol* 6:8, (2011).

Fujimoto T, Andoh T, Sudo T, Fujita I, Imabori M, Moritake H, Sugimoto T, Sakuma Y, Takeuchi T, Sonobe H, Epstein AL, Akisue T, Kiriata M, Kurosaka M, Fukumori Y, Ichikawa H. Evaluation of BPA uptake in clear cell sarcoma (CCS) in vitro and development of an in vivo model of CCS for BNCT studies. *Appl Radiat Isot* 69(12):1713-6, (2011).

Gadan M, Crawley V, Thorp S, Miller M. Preliminary liver dose estimation in the new facility for biomedical applications at the RA-3 reactor. *Appl Radiat and Isot* 67:S206–S209, (2009).

Gaines Das y North. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. *Laboratory Animals* 41:312-320, (2007).

Garabalino MA, Monti Hughes A, Molinari AJ, Heber EM, Pozzi ECC, Cardoso JE, Colombo LL, Nievas S, Nigg DW, Aromando RF, Itoiz ME, Trivillin VA, Schwint AE. Boron neutron capture therapy (BNCT) for the treatment of liver metastases: biodistribution studies of boron compounds in an experimental model. *Radiat Environ Biophys* 50:199–207, (2011).

Garabalino MA, Heber EM, Monti Hughes A, Pozzi ECC, Molinari AJ, Nigg DW, Bauer W, Trivillin VA, Schwint AE. Boron biodistribution for BNCT in the hamster cheek pouch oral cancer model: Combined administration of BSH and BPA. *Appl Radiat Isot* 88:64-68, (2014).

GLOBOCAN 2008: Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers CD, Parkin D. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base N° 10, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (2008).

GLOBOCAN 2012a: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet: <http://globocan.iarc.fr>]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; (2013).

GLOBOAN 2012b: Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 132(5):1133-45, (2013).

González 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, Roth BM. First BNCT treatment of a skin melanoma in Argentina: dosimetric analysis and clinical outcome. *Appl Radiat Isot* 61(5):1101-5, (2004).

González SJ y **Santa Cruz GA**. The Photon-Isoeffective Dose in Boron Neutron Capture Therapy. *Radiat Res* 178:609-621, (2012).

Goorley JT, Kiger WS, Zamenhof RG. Reference dosimetry calculations for neutron capture therapy with comparison of analytical and voxel models. *Med. Phys.* 29(2):145-56, (2002).

Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26:638-48, (1953).

Green S. Developments in Accelerator based Boron Neutron Capture Therapy. *Radiat Phys Chem* 51(4-6): 561-9, (1998).

Gualdrini UA y **Iumato LE**. Cáncer colorrectal en la Argentina Organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control. <http://www.msal.gov.ar/inc/>, (2011).

Haapaniemi A, Kankaanranta L, Koivunoro H, Saarilahti K, Mäkitie A, Atula T, Joensuu H. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in the Management of Recurrent Laryngeal Cancer. Proceedings of 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, Helsinki, Finland, (2014).

Harker YD, Anderl RA, Becker GK, Miller LG. Spectral Characterization of the Epithermal Neutron Beam at the Brookhaven Medical Research Reactor. *Nuclear Science and Engineering*. 110:355-368, (1992).

Halfon S, Paul M, Arenshtam A, Berkovits D, Bisyakoev M, Eliyahu I, Feinberg G, Hazensprung N, Kijel D, Nagler A, Silverman I. High-Power Liquid Lithium Target Prototype for Accelerator-Based Boron Neutron Capture Therapy. In: *New Challenges in Neutron Capture Therapy 2010*, Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, Buenos Aires, Argentina, (2010).

Hanahan D y Weinberg RA. The hallmarks of cancer Cell 100(1):57-70, (2000).

Hanahan D y Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144(5):646-74, (2011).

Haritz D, Gabel D, Huiskamp R. Clinical phase-I study of Na²B¹²H¹¹SH (BSH) in patients with malignant glioma as a precondition for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). Int J Radiat Oncol Biol Phys 28:1175-81, (1994).

Harling OK. Fission reactor based epithermal neutron irradiation facilities for routine clinical application in BNCT-Hatanaka memorial lecture. Appl Radiat Isot 67(7-8 Suppl):S7-11, (2009).

Hashibe M, Ritz B, Le AD, Li G, Sankaranarayanan R, Zhang ZF. Radiotherapy for oral cancer as a risk factor for second primary cancers. Cancer Lett 220(2):185-95, (2005).

Hideghéty K, Sauerwein W, Wittig A, Götz C, Paquis P, Grochulla F, Haselsberger K, Wolbers J, Moss R, Huiskamp R, Fankhauser H, de Vries M, Gabel D. Tissue uptake of BSH in patients with glioblastoma in the EORTC 11961 phase I BNCT trial. J Neurooncol 62(1-2):145-56, (2003).

Hiramatsu R, Kawabata S, Miyatake S, Kuroiwa T, Easson MW, Vicente MG. Application of a novel boronated porphyrin (H₂OCP) as a dual sensitizer for both PDT and BNCT. Lasers Surg Med 43(1):52-8, (2011).

Heber E, Trivillin VA, Nigg D, Kreimann EL, Itoiz ME, Rebagliati RJ, Batistoni D, Schwint AE. Biodistribution of GB-10 (Na₂¹⁰B₁₀H₁₀) compound for boron neutron capture therapy (BNCT) in an experimental model of oral cancer in the hamster cheek pouch. Arch Oral Biol 49(4):313-24, (2004).

Heber EM, Trivillin VA, Nigg DW, Itoiz ME, Gonzalez BN, Rebagliati RJ, Batistoni D, Kreimann EL, Schwint AE. Homogeneous boron targeting of heterogeneous tumors for boron neutron capture therapy (BNCT): chemical analyses in the hamster cheek pouch oral cancer model. Arch Oral Biol 51(10): 922-9, (2006).

Heber EM, Monti Hughes A, Pozzi EC, Itoiz ME, Aromando RF, Molinari AJ, Garabalino MA, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE. Development of a model of tissue with potentially malignant disorders (PMD) in the hamster cheek pouch to explore the

long-term potential therapeutic and/or toxic effects of different therapeutic modalities. Arch Oral Biol 55(1):46-51, (2010).

Heber EM, Kueffer PJ, Lee MW Jr, Hawthorne MF, Garabalino MA, Molinari AJ, Nigg DW, Bauer W, Monti Hughes A, Pozzi EC, Trivillin VA, Schwint AE. Boron delivery with liposomes for boron neutron capture therapy (BNCT): biodistribution studies in an experimental model of oral cancer demonstrating therapeutic potential. Radiat Environ Biophys 51(2):195-204, (2012).

Heber EM, Hawthorne MF, Kueffer PJ, Garabalino MA, Thorp SI, Pozzi ECC, Monti Hughes A, Maitz CA, Jalisatgi SS, Nigg DW, Curotto P, Trivillin VA, Schwint AE. Therapeutic efficacy of Boron Neutron Capture Therapy mediated by boron rich liposomes for oral cancer in the hamster cheek pouch model. Proc Natl Acad Sci 111(45):16077-81, (2014).

Hopewell JW, Morris GM, Schwint A, Coderre JA. The radiobiological principles of Boron Neutron Capture Therapy: a critical review. Neutron Capture Therapy - Principles and Applications. Sauerwein WAG, Wittig A, Moss R, Nakagawa Y (Eds.), ISBN 978-3-642-31334-9, (2012).

Horiguchi H, Sato T, Kumada H, Yamamoto T, Sakae T. Estimation of relative biological effectiveness for boron neutron capture therapy using the PHITS code coupled with a microdosimetric kinetic model. Journal of Radiation Research 56:382-390, (2015).

Hopewell JW, Morris GM, Schwint A, Coderre JA. The radiobiological principles of boron neutron capture therapy: a critical review. Appl Radiat Isot 69(12):1756-1759, (2011).

Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. Int J Cancer 125(1):171-80, (2009).

<http://www.msal.gov.ar/>, (2014).

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>, (2015).

<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/prevencion/boca/HealthProfessional/page2#Reference2.10>, (2015).

IAEA-TECDOC-1223. Current status of neutron capture therapy, International Atomic Energy Agency (IAEA), (2001).

Iffland D, Grunewald C, Schütz C, Kratz JV, Langguth P, Hampel G. Determination of Boron Concentration in Liver and Colon Cancer Cells after Trans-stimulation with L-tyrosine. In: Proceedings of 6th Young Researchers BNCT Meeting, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, (2011).

Jain RK. Normalization of Tumor vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* 307:58-62, (2005).

Jham BC y da Silva Freire AR. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Braz J Otorhinolaryngol* 72(5):704-8, (2006).

Jirtle RL, Michalopoulos G, Strom SC, Deluca PM, Gould MN. The survival of parenchymal hepatocytes irradiated with low and high LET radiation. *Br J Cancer* 49(6):197-201, (1984).

Joiner M y van der Kogel A. Basic Clinical Radiobiology fourth edition. Hodder Education, ISBN 978 0 340 929 667, (2009).

Kabalka GW, Shaikh AL, Barth RF, Huo T, Yang W, Gordnier PM, Chandra S. Boronated unnatural cyclic amino acids as potential delivery agents for neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot* 69(12):1778-81, (2011).

Kageji T, Mizobuchi Y, Nagahiro S, Nakagawa Y, Kumada H. Clinical results of boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma. *Appl Radiat Isot* 69(12):1823-5, (2011).

Kageji T, Mizobuchi Y, Nagahiro S, Nakagawa Y, Kumada H. Correlation between radiation dose and histopathological findings in patients with glioblastoma treated with boron neutron capture therapy (BNCT). *Appl Radiat Isot* 88:20-22, (2014).

Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Saarilahti K, Atula T, Collan J, Salli E, Kortensniemi M, Uusi-Simola J, Mäkitie A, Seppänen M, Minn H, Kotiluoto P, Auterinen I, Savolainen S, Kouri M, Joensuu H. Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69(2):475-82, (2007).

Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Välimäki P, Beule A, Collan J, Korttesniemi M, Uusi-Simola J, Kotiluoto P, Auterinen I, Serèn T, Paetau A, Saarilahti K, Savolainen S, Joensuu H. L-boronophenylalanine-mediated boron neutron capture therapy for malignant glioma progressing after external beam radiation therapy: a Phase I study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80(2):369-76, (2011).

Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Saarilahti K, Atula T, Collan J, Salli E, Korttesniemi M, Uusi-Simola J, Välimäki P, Mäkitie A, Seppänen M, Minn H, Revitzer H, Kouri M, Kotiluoto P, Seren T, Auterinen I, Savolainen S, Joensuu H. Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head-and-neck cancer: final analysis of a phase I/II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 82(1):67-75, (2012).

Kato I, Ono K, Sakurai Y, Ohmae M, Maruhashi A, Imahori Y, Kirihata M, Nakazawa M, Yura Y. Effectiveness of BNCT for recurrent head and neck malignancies. *Appl Radiat Isot* 61(5):1069-73, (2004).

Kato I, Fujita Y, Ohmae M, Sakurai Y, Suzuki M, Murata I, Horiike H, Sumi T, Iwai S, Nakazawa M, Yoshiaki Yura and Ono K. Boron Neutron Capture Therapy in Patients with Recurrent Head and Neck Cancers Who Have No Other Treatment Options. Proceedings of 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, Helsinki, Finland, (2014).

Kassis AI y Adelstein SJ. Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. *The Journal of Nuclear Medicine* 46 Suppl 1, (2005).

Kastenbauer E y Wollenberg B. In search of new treatment methods for head-neck carcinoma. *Laryngorhinootologie* 78(1):31-5, (1999).

Kavolius J, Fong Y, Blumgart LH. Surgical resection of metastatic liver tumors. *Surg Oncol Clin N Am* 5(2):337-352, (1996).

Kerr DJ, McArdle CS, Ledermann J, Taylor I, Sherlock DJ, Schlag PM, Buckels J. Intrahepatic arterial versus intravenous fluorouracil and folinic acid for colorectal cancer liver metastases: a multicentre randomized trial. *Lancet* 361(9355):368-373, (2003).

Kiger JL, Kiger WS, Riley KJ, Binns PJ, Patel H, Hopewell JW, Harling OK, Busse PM, Coderre JA. Functional and Histological Changes in Rat Lung after Boron Neutron Capture Therapy. *Radiat Res* 170:60-69, (2008).

Kim DY, Park W, Lim DH, Lee JH, Yoo BC, Paik SW, Kho KC, Kim TH, Ahn YC, Huh SJ. Three-dimensional conformal radiotherapy for portal vein thrombosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 103:2419-2426, (2005).

Knoll, GF. Radiation Detection and Measurement. Wiley, New York, (1989).

Kobaek-Larsen M, Thorup I, Diederichsen A, Fenger C, Hoitinga MR. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: Comparative aspects with those in humans. *Comp Med* 50:16, (2000).

Koerting Wiese V y Queral Salazar C. Energía Nuclear ciclo de combustible. <https://ingenierosenapuros.files.wordpress.com/2012/09/en-tema2.pdf>, (2012).

Koivunoro H, Bleuel D, Nastasi U, Lou T, Reijonen J, Leung K. BNCT dose distribution in liver with epithermal D–D and D–T fusion-based neutron beams. *Appl Radiat Isot* 61(5):853-859, (2004).

Kononov O, Bokhovko M, Kononov V, Glotov A, Sevastianov V. Results of Multipurpose KG-2,5 Accelerator Based Neutron Source Certification and Measured Epithermal Neutron Source Characteristics. In: *New Challenges in Neutron Capture Therapy 2010 (Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy)*, Buenos Aires, Argentina, (2010).

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 Res* 61(24):8775-81, (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 Res* 61(24):8638-42, (2001b).

Kreimann EL, Miura M, Itoiz ME, Heber E, Garavaglia RN, Batistoni D, Rebagliati RJ, 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. *Arch Oral Biol* 48(3):223-32, (2003).

Kreiner AJ, Castell W, Di Paolo H, Baldo M, Bergueiro J, Burlon AA, Cartelli D, Vento VT, Kesque JM, Erhardt J, Ilardo JC, Valda AA, Debray ME, Somacal HR,

Sandin JC, Igarzabal M, Huck H, Estrada L, Repetto M, Obligado M, Padulo J, Minsky DM, Herrera M, Gonzalez SJ, Capoulat ME. Development of a Tandem-Electrostatic-Quadrupole facility for Accelerator-Based Boron Neutron Capture Therapy. *Appl Radiat Isot* 69(12):1672-5, (2011).

Kudo H y Tanaka K. Recoil ranges of 2.73 MeV tritons and yields of ^{18}F produced by the $^{16}\text{O}(t,n)^{18}\text{F}$ reaction in neutron-irradiated lithium compounds containing oxygen. *J Chem Phys* 72(5):3049-3052, (1980).

Kulvik M, Vähätalo J, Buchar E, Färkkilä M, Järviluoma E, Jääskeläinen J, Kriz O, Laakso J, Rasilainen M, Ruokonen I, Kallio M. Clinical implementation of 4-dihydroxyborylphenylalanine synthesised by an asymmetric pathway. *Eur J Pharm Sci* 18(2):155-63, (2003).

Kumada H, Matsumura A, Sakurai H, Sakae T, Yoshioka M, Kobayashi H, Matsumoto H, Kiyonagi Y, Shibata T, Nakashima H. New Challenge for Advanced BNCT in University of Tsukuba. In *Proceedings of 6th Young Researchers BNCT Meeting*, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, (2011).

LaHann TR, Lu DR, Daniell G, Kraft SL, Gavin PR, Bauer WF. Bioavailability of intravenous formulations of p-boronophenylalanine in dog and rat. In: Soloway A, Barth R, Carpenter D (eds), *Advances in Neutron Capture Therapy*, pp. 585-589. New York: plenum Press (1993).

Langan S. Informe de Beca Técnica tipo B-1, CNEA, (2006).

Laramore GE, Stelzer KJ, Risler R, Schwartz JL, Douglas JJ, Einck JP, Nigg DW, Wemple CA, Hartwell JK, Hawthorne MF. Neutron capture therapy (NCT) enhancement of fast neutron therapy: Application to non small cell lung cancer. In: *Application of accelerators in research and industry-sixteenth international conference* (JL Duggan y IL Morgan, Eds.) pp 881-884. American Institute of Physics, Denton, TX, (2001).

Letchoumy PV, Chandra Mohan KV, Kumaraguruparan R, Hara Y, Nagini S. Black tea polyphenols protect against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oncol Res* 16(4): 167-78, (2006).

Levin WP, Kooy H, Loeffler JS and DeLaneyTF. Proton beam therapy. *British Journal of Cancer* 93:849-854, (2005).

Li Y, Xia P, Wu X, Zou S, Peng D, Lu J, Hong JY, Zhang Z, Yong TL, Zhou M. Startup of In-Hospital Neutron Irradiator. 21st International Conference on Nuclear Engineering Volume 5: Paper No. ICONE21-15925, pp. V005T11A012; 7 pages doi:10.1115/ICONE21-15925, (2013).

Liao AH, Chou FI, Kuo YC, Chen HW, Kai JJ, Chang CW, Chen FD, Hwang JJ. Biodistribution of phenylboric acid derivative entrapped lipiodol and 4-borono-2-¹⁸F-fluoro-L-phenylalaninefructose in GP7 TB liver tumor bearing rats for BNCT. Appl Radiat Isot 68(3):422-426, (2010).

Liberman SJ, Dagrosa A, Jiménez Rebagliati RA, Bonomi MR, Roth BM, Turjanski L, Castiglia SI, González SJ, Menéndez PR, Cabrini R, Roberti MJ, Batistoni DA. Biodistribution studies of boronophenylalanine-fructose in melanoma and brain tumor patients in Argentina. Appl Radiat Isot 61(5):1095-100, (2004).

Locher GL. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons. Am J Roentgenol 36:1-13, (1936).

Loria DI, Lence Anta JJ, Guerra Yí M, Galán Y y colaboradores. Revista Cubana de Salud Pública, 36(2)115-125. U. S. Census Bureau: International Programs, (2010).

Maggiori L, Bretagnol F, Wagner M, Hatwell C, Panis Y. Bilobar colorectal liver metastases: a new model for preclinical studies. Int J Exp Path 93:414-420, (2012).

Malafosse R, Penna C, Sa Cunha A, Nordlinger B. Surgical management of hepatic metastases from colorectal malignancies. Ann Oncol 12(7):887-894, (2001).

Martinez J, Jarufe N, Gonzalez R, Alvarez M. Alternativas terapéuticas actuales de las metástasis hepáticas. Rev Méd Chile 136:376-384, (2008).

Masunaga S, Sakurai Y, Tanaka H, Suzuki M, Liu Y, Kondo N, Maruhashi A, Kinashi Y, Ono K. Effects of employing a 10B-carrier and manipulating intratumour hypoxia on local tumour response and lung metastatic potential in boron neutron capture therapy. Br J Radiol 85(1011):249-58, (2012).

Masunaga S-I, Sakurai Y, Tano K, Tanaka H, Suzuki M, Kondo N, Narabayashi M, Watanabe T, Nakagawa Y, Maruhashi A, Ono K. Effect of

bevacizumab combined with boron neutron capture therapy on local tumor response and lung metastasis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 8:291-301, (2014).

Matsumura A, Yamamoto T, Tsurubuchi T, Matsuda M, Shirakawa M, Nakai K, Endo K, Tokue K, Tsuboi K. Current practices and future directions of therapeutic strategy in glioblastoma: survival benefit and indication of BNCT. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl):S12-14, (2009).

Menéndez PR, Roth BM, Pereira MD, Casal MR, González SJ, Feld DB, Santa Cruz GA, Kessler J, Longhino J, Blaumann H, Jiménez Rebagliati R, Calzetta Larriou OA, Fernández C, Nievas SI, Liberman SJ. BNCT for skin melanoma in extremities: updated Argentine clinical results. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl):S50-3, (2009).

Miller ME, Mariani LE, Szejnberg Gonçalves-Carralves ML, Skumanic M, Thorp SI. Implantable self-powered detector for on-line determination of neutron flux in patients during NCT treatment. *Appl Radiat Isot* 61:1033-1037, (2004).

Miller M, Quintana J, Ojeda J, Langan S, Thorp S, Pozzi E, Szejnberg M, Estryk G, Nosal R, Saire E, Agrazar H, Graiño F. New irradiation facility for biomedical applications at the RA-3 reactor thermal column. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl):S226-229, (2009).

Miller T, Saad P, Martinez C y Calvo JJ. La nueva era demográfica en América Latina y el Caribe - La hora de la igualdad según el reloj poblacional. Documento de referencia del Centro Latinoamericano y Caribeño de Población y Desarrollo (CELADE)-División de Población de la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), (2014).

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}B -compound. *Lancet* 1:388-9, (1989).

Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Ogasawara T, Fujita K, Tanaka H, Sakurai Y, Maruhashi. In: *New Challenges in Neutron Capture Therapy 2010* (Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy), Buenos Aires, Argentina, (2010).

Molinari AJ, Pozzi EC, Monti Hughes A, Heber EM, Garabalino MA, Thorp SI, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Quintana J, Santa Cruz GA, Trivillin VA, Schwint AE. "Sequential" boron neutron capture therapy (BNCT): a novel approach to BNCT for the treatment of oral cancer in the hamster cheek pouch model. *Radiat Res* 175(4):463-72, (2011).

Molinari AJ, Pozzi EC, Monti Hughes A, Heber EM, Garabalino MA, Thorp SI, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE. Tumor blood vessel "normalization" improves the therapeutic efficacy of boron neutron capture therapy (BNCT) in experimental oral cancer. *Radiat Res* 177(1):59-68, (2012).

Monti Hughes A, Heber EM, Pozzi E, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Nievas SI, Aromando RF, Itoiz ME, Trivillin VA, Schwint AE. Boron neutron capture therapy (BNCT) inhibits tumor development from precancerous tissue: an experimental study that supports a potential new application of BNCT. *Appl Radiat Isot* 67(7-8Suppl):S313-7, (2009).

Monti Hughes A, Pozzi EC, Heber EM, Thorp S, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Molinari AJ, Garabalino MA, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in an oral precancer model: therapeutic benefits and potential toxicity of a double application of BNCT with a six-week interval. *Oral Oncol* 47(11):1017-22, (2011).

Monti Hughes A. Trabajo de tesis doctoral: Efecto terapéutico de la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) en tejido con cancerización de campo: Estudio radiobiológico en un modelo experimental de cáncer bucal. Universidad de Buenos Aires, (2012).

Monti Hughes A, Pozzi E, Thorp S, Garabalino M, Farías R, González S, Heber E, Itoiz M, Aromando R, Molinari A, Miller M, Nigg D, Curotto P, Trivillin V, Schwint A. Boron Neutron Capture Therapy for oral precancer: proof of principle in an experimental animal model. *Oral Dis* 19(8):785-95, (2013).

Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Dent Res* 40(1):3-15, (1961).

Nano R, Barni S, Chiari P, Pinelli T, Fossati F, Altieri S, Zonta C, Roveda L, Zonta A. Efficacy of boron neutron capture therapy on liver metastases of colon

adenocarcinoma: Optical and ultrastructural study in the rat *Oncol Rep* 11:149, (2004).

Nagini S, Letchoumy PV, Thangavelu A, Ramachandran CR. Of humans and hamsters: a comparative evaluation of carcinogen activation, DNA damage, cell proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis in oral cancer patients and hamster buccal pouch carcinomas. *Oral Oncol.* 45(6):e31-7, (2009).

Nakai K, Yamamoto T, Aiyama H, Takada T, Yoshida F, Kageji T, Kumada H, Isobe T, Endo K, Matsuda M, Tsurubuchi T, Shibata Y, Takano S, Mizumoto M, Tsuboi K, Matsumura A. Boron neutron capture therapy combined with fractionated photon irradiation for glioblastoma: a recursive partitioning analysis of BNCT patients. *Appl Radiat Isot* 69(12):1790-2, (2011).

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* 166(1 Pt 1):81-88, (2006).

Nigg DW, Wemple CA, Risler R, Hartwell JK, Harker YD, Laramore GE, Modification of the University of Washington Neutron Radiotherapy Facility for Optimization of Neutron Capture Enhanced Fast-Neutron Therapy. *Med Phys* 27:359-367, (2000).

Nigg DW, Schwint AE, Hartwell JK, Heber EM, Trivillin V, Castillo J, Wentzeis L, Sloan P, Wemple CA. Collaborative Physical and Biological Dosimetry Studies for Neutron Capture Therapy at the RA-1 Research Reactor Facility, Proceedings of the Americas Nuclear Energy Symposium, Miami Beach, Florida, October 3-6, (2004).

Nordlinger B, Van Cutsem E, Rougier P, Laus-Henning Köhne C, Ychou M, Sobrero A, Adam R, Arvidsson D, Carrato A, Georgoulas V, Giuliani F, Glimelius B, Gollig M, Gruenberger T, Tabernero J, Wasan H, Poston G, on behalf of European Colorectal Metastases Treatment Group. Does chemotherapy prior to liver resection increase the potential for cure in patients with metastatic colorectal cancer? A report from the European Colorectal Metastases Treatment Group. *Eur J Cancer* 43:2037–2045, (2007).

Ono K, Masunaga SI, Kinashi Y, Takagaki M, Akaboshi M, Kobayashi T, Akuta K. Radiobiological evidence suggesting heterogeneous microdistribution of boron compounds in tumors: its relation to quiescent cell population and tumor cure in neutron capture therapy. *Int J Rad Biol Phys* 34:1081-6, (1996).

Orecchia R, Fossati P, Rossi S. The National Center for Oncological Hadron Therapy: status of the project and future clinical use of the facility. *Tumori* 95(2):169-76, (2009).

Pan CC, Kavanagh BD, Dawson LA, Allen Li X, Das SK, Miften M, Ten Haken RK. Radiation-associated liver injury. *Int J Radiat Onc Biol Phys* 76(3):S94-S100, (2010).

Papaspyrou M, Feinendegen LE, Müller-Gärtner HW. Preloading with L-tyrosine increases the uptake of boronophenylalanine in mouse melanoma cells. *Cancer Res* 54(24):6311-4, (1994).

Perona M, Pontiggia O, Carpano M, Thomasz L, Thorp S, Pozzi E, Simian M, Kahl S, Juvenal G, Pisarev M, Dagrosa A. In vitro studies of cellular response to DNA damage induced by boron neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot* 69(12):1732-6, (2011).

Pinelli T, Altieri S, Fossati F, Zonta A, Ferrari C, Prati U, Roveda L, Ngnitejeu Tata S, Barni S, Chiari P, Nano R, Ferguson DM. Operative modalities and effects of BNCT on liver metastases of colon adenocarcinoma: a microscopical and ultrastructural study in the rat. In: *Frontiers in neutron capture therapy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p1427-1440, (2001).

Pisent A, Fagotti E, Colautti P. MUNES project: an intense Multidisciplinary Neutron Source for BNCT based on a high intensity RFQ accelerator. *Proceedings of 16th International Congress on Neutron Capture Therapy*, Helsinki, Finland, (2014).

Pozzi E, Nigg DW, Miller M, Thorp SI, Schwint AE, Heber EM, Trivillin VI, Zarza L, Estryk G. A small-animal irradiation facility for NCT research at the RA-3 research reactor. *Trans ANS* 97:309-11, (2007).

Pozzi E, Nigg DW, Miller M, Thorp SI, Heber EM, Zarza L, Estryk G, Monti Hughes A, Molinari AJ, Garabalino M, Itoiz ME, Aromando RF, Quintana J, Trivillin VA, Schwint AE. Dosimetry and radiobiology at the new RA-3 reactor boron neutron

capture therapy (BNCT) facility: application to the treatment of experimental oral cancer. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl):S309-12, (2009).

Pozzi E. Trabajo final: "Diseño y caracterización de un nuevo blindaje neutrónico para la aplicación de BNCT en un modelo experimental de cáncer bucal en el reactor RA-3", Carrera de Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares, Instituto Dan Beninson, UNSAM, (2012).

Pozzi EC, Cardoso JE, Colombo LL, Thorp S, Monti Hughes A, Molinari AJ, Garabalino MA, Heber EM, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Quintana J, Trivillin VA, Schwint AE. Boron neutron capture therapy (BNCT) for liver metastasis: therapeutic efficacy in an experimental model. *Radiat Environ Biophys* 51(3):331-9, (2012).

Pulkkanen KJ, Yla-Herttuala S. Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Mol Ther* 12(4):585-98, (2005).

Rao M, Trivillin VA, Heber EM, Cantarelli M de L, Itoiz ME, Nigg DW, Rebagliati RJ, Batistoni D, Schwint AE. BNCT of 3 cases of spontaneous head and neck cancer in feline patients. *Appl Radiat Isot* 61(5):947-52, (2004).

Robertson DJ, Stukel TA, Gottlieb DJ, Sutherland JM, Fisher ES. Survival after hepatic resection of colorectal cancer metastases: a national experience. *Cancer* 115(4):752-759, (2009).

Roveda L, Prati U, Bakeine J, Trotta F, Marotta P, Valsecchi P, Zonta A, Nano R, Facoetti A, Chiari P, Barni S, Pinelli T, Altieri S, Braghieri A, Bruschi P, Fossati F, Pedroni P. How to study boron biodistribution in liver metastases from colorectal cancer. *J Chem* 16:15-18, (2004).

Ruiz-Esquide G, Nervi B, Vargas A, Maiz A. Treatment and prevention of cancer treatment related oral mucositis. *Rev Med Chil* 139(3):373-81, (2011).

Ruan DT y Warren RS. Liver directed therapies in colorectal cancer. *Semin Oncol* 32(1):85-94, (2005).

Salem R y Thurston KG. Radioembolization with 90 Yttrium microspheres: a state-of-the-art brachytherapy treatment for primary and secondary liver malignancies. Part 1: technical and methodologic considerations. *J Vasc Interv Radiol* 17(8):1251-1278, (2006).

Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res* 33(2): 253-62, (1954).

Santa Cruz A. Reporte General Proyecto BNCT año 2014. Depto Coordinación BNCT, G Quím Nuclear y Cs de la Salud, GAATEN, CNEA. (2014).

Schefter TE, Kavanagh BD, Timmerman RD, Cardenes HR, Baron A, Gaspar LE. A phase I trial of stereotactic body radiation therapy (SBRT) for liver metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62(5):1371-1378, (2005).

Schwint AE y Trivillin VA. 'Close-to-ideal' tumor boron targeting for boron neutron capture therapy is possible with 'less-than-ideal' boron carriers approved for use in humans. *Ther Deliv* 6(3):269-272, (2015).

Seong J, Park HC, Han KH, Chon CY, Chu SS, Kim GE, Suh CO. Clinical results and prognostic factors in radiotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 158 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55:329-336, (2003).

Shklar G, Eisenberg E, Flynn E. Immunoenhancing agents and experimental leukoplakia and carcinoma of the buccal pouch. *Prog Exp Tumor Res* 24:269-82, (1979).

Shrivastav N, Li D, Essigmann JM. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis*. 31(1):59-70, (2010).

Siri S. Informe de Beca tipo A-1, Comisión Nacional e Energía Atómica, (2008).

Schulte-Herman R, Grasl-Kraupp B, Bursch W. Tumor development and apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol* 105:363-7, (1994).

Smith DR, Chandra S, Coderre JA, Morrison GH. Ion microscopy imaging of ^{10}B from pboronophenylalanine in a brain tumor model for boron neutron capture therapy. *Cancer Res* 56:4302-6, (1996).

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 brain tumors models for BNCT. In: *Advances in Neutron*

Capture Therapy. Vol II, Chemistry and Biology (B. Larsson, J. Cranford and R. Weinreich, Eds.) pp. 308-14. Elsevier, Lausanne, (1997).

Sonis ST. Oral mucositis in cancer therapy. *J Support Oncol* **2**(6 Suppl 3):3-8, (2004).

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, editor. *Frontiers in neutron capture therapy*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p.735-9, (2001).

Stuart K. Chemoembolization in the management of liver tumors. *Oncologist* **8**(5):425-437, (2003).

Suzuki M, Masunaga S, Kinashi Y, Takagaki M, Sakurai Y, Kobayashi T, Ono K. The effects of boron neutron capture therapy on liver tumors and normal hepatocytes in mice. *Jpn J Cancer Res* **91**:1058-1064, (2000).

Suzuki M, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Sakurai Y, Nakamatsu K, Nishimura Y, Maruhashi A, Ono K. Intra-arterial administration of sodium borocaptate (BSH)/lipiodol emulsion delivers B-10 to liver tumors highly selectively for boron neutron capture therapy: experimental studies in the rat liver model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**:260-266, (2004).

Suzuki M, Sakurai Y, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhashi A, Ono K. Feasibility of boron neutron capture therapy (BNCT) for malignant pleural mesothelioma from a viewpoint of dose distribution analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **1**;66(5):1584-9, (2006).

Suzuki M, Sakura Y, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhash A, Ono K. A Preliminary Experimental Study of Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Tumors Spreading in Thoracic Cavity. *Jpn J Clin Oncol* **37**(4)245-249, (2007).

Suzuki M, Endo K, Satoh H, Sakurai Y, Kumada H, Kimura H, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhashi A, Ono K. A novel concept of treatment of diffuse or multiple pleural tumors by boron neutron capture therapy (BNCT). *Radioth Oncol* **88**:192-195, (2008).

Suzuki M, Tanaka H, Sakurai Y, Kashino G, Yong L, Masunaga S, Kinashi Y, Mitsumoto T, Yajima S, Tsutsui H, Sato T, Maruhashi A, Ono K. Impact of

accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) on the treatment of multiple liver tumors and malignant pleural mesothelioma. *Radiother Oncol* 92(1):89-95, (2009).

Suzuki M, Kato I, Aihara T, Hiratsuka J, Yoshimura K, Niimi M, Kimura Y, Ariyoshi Y, Haginomori S, Sakurai Y, Kinashi Y, Masunaga S, Fukushima M, Ono K and Maruhashi A. Boron neutron capture therapy outcomes for advanced or recurrent head and neck cancer. *Journal of Radiation Research* 55:146-153, (2014).

Sweet WH, Soloway AH, Brownell GL. *Acta Union Int Contre Cancer* 16:1216, (1960).

Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32 Suppl 1:S59-66, (2005).

Sztejnberg M, Bortolussi S, Altieri S. Dosis de Tolerancia de Hígado para BNCT de Organo Explantado: Revisión Bibliográfica. Informe interno de la Subgerencia de Instrumentación y Control, Gerencia de Área Energía Nuclear, Comisión Nacional de Energía Nuclear, (2013).

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

Thomas E, Chapet O, Kessler ML, Lawrence TS, Ten Haken RK. Benefit of using biologic parameters (EUD and NTCP) in IMRT optimization for treatment of intrahepatic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62(2):571-578, (2005).

Trivillin VA, Heber EM, Itoiz ME, Nigg D, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE. Radiobiology of BNCT mediated by GB-10 and GB-10+BPA in experimental oral cancer. *Appl Radiat Isot* 61(5): 939-45, (2004a).

Trivillin VA, Heber EM, Nigg DW, Castillo J, Itoiz ME, Schwint AE. Estudios de dosimetría biológica para BNCT en el RA-1. XXXI Reunión anual de la Asociación Argentina de Tecnología Nuclear, (2004b).

Trivillin VA, Heber EM, Nigg DW, Itoiz ME, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE. 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. *Radiat. Res.* 166:387-396, (2006).

Trivillin VA. Trabajo de tesis doctoral: 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 pre-clínicos en tumores espontáneos en pacientes felinos. Universidad de Buenos, (2007).

Trivillin VA, Heber EM, Rao M, Cantarelli MA, Itoiz ME, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE. Boron neutron capture therapy (BNCT) for the treatment of spontaneous nasal planum squamous cell carcinoma in felines. *Radiat Environ Biophys* 47(1):147-55, (2008).

Trivillin VA, Garabalino MA, Colombo LL, González SJ, Farías RO, Monti Hughes A, Pozzi ECC, Bortolussi S, Altieri S, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Schwint AE. Biodistribution of the boron carriers boronophenylalanine (BPA) and/or decahydrodecaborate (GB-10) for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in an experimental model of lung metastases. *Appl Radiat Isot* 88:94-98, (2014).

Umano M, Uechi K, Uriuda T, Murayama S, Azuma H, Shinohara A, Liu Y, Ono K, Kirihata M, Yanagie H, Nagasaki T. Tumor accumulation of ϵ -poly-lysines-based polyamines conjugated with boron clusters. *Appl Radiat Isot* 69(12):1765-7, (2011).

U.S. Census Bureau, (2011). <http://www.census.gov/population/international>

Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, Yapijakis C, Patsouris E. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol* 44(4):315-24, (2008).

Van den Eynde M y Hendlisz A. Treatment of Colorectal Liver Metastases: A Review. *Reviews on Recent Clinical Trials* 4:56-62, (2009).

Vidali C. New clinical indications for BNCT? The point of view of the radiation oncologist. Discussion Seminar on "Neutron Sources and their INFN applications", Legnaro National Laboratories, INFN, Italia, <http://www.Inl.infn.it/~InlDir/Seminario%20sorgenti/PDF/Vidali.pdf>, (2009).

Wagner FM, Loeper-Kabasakal B and Breitkreutz H. Neutron medical treatment of tumours - a survey of facilities. 2nd International workshop on fast neutron detectors and applications, EIN GEDI, ISRAEL, (2011).

Wang LW, Wang SJ, Chu PY, Ho CY, Jiang SH, Liu YW, Liu YH, Liu HM, Peir JJ, Chou FI, Yen SH, Lee YL, Chang CW, Liu CS, Chen YW, Ono K. BNCT for locally recurrent head and neck cancer: preliminary clinical experience from a phase I/II trial at Tsing Hua Open-Pool Reactor. *Appl Radiat Isot* 69(12):1803-6, (2011).

Wang LW, Chen YW, Ho CY, Hsueh Liu YW, Chou FI, Liu YH, Liu HM, Peir JJ, Jiang SH, Chang CW, Liu CS, Wang SJ, Chu PY, Yen SH. Fractionated BNCT for locally recurrent head and neck cancer: experience from a phase I/II clinical trial at Tsing Hua Open-Pool Reactor. *Appl Radiat Isot* 88:23-7, (2014).

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 37(3):127-33, (2008).

Waynforth HB y Flecknell PA. Experimental and Surgical Techniques in the Rat, 2nd Edition, Academic Press, Harcourt Brace & Company, (1992).

WHO, Global Oral Health Programme. DrPoul Erik Petersen. World Health Organization. www.who.int/oral_health. World Health Organization, (2005).

Wittig A, Sauerwein WA, Coderre JA. Mechanisms of transport of p-borono-phenylalanine through the cell membrane in vitro. *Radiat Res* 153(2): 173-80, (2000).

Wittig A, Malago M, Collette L, Huiskamp R, Bührmann S, Nievaart V, Kaiser GM, Jöckel KH, Schmid KW, Ortman U, Sauerwein WA. Uptake of two 10B-compounds in liver metastases of colorectal adenocarcinoma for extracorporeal irradiation with boron neutron capture therapy (EORTC Trial 11001). *Int J Cancer* 122(5):1164-71, (2008).

Wittig A, Stecher-Rasmussen F, Hilger RA, Rassow J, Mauri P, Sauerwein W. Sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate (BSH), a boron carrier that merits more attention. *Appl Radiat Isot* 69(12):1760-4, (2011).

Yamatomo N, Iwagami T, Kato I, Masunaga S, Sakurai Y, Iwai S, Nakazawa M, Ono K, Yura Y. Sonoporation as an enhancing method for boron neutron capture therapy for squamous cell carcinomas. *Radiation Oncology* 8:280, (2013).

Yanagie H, Kumada H, Nakamura T, Higashi S, Ikushima I, Morishita Y, Shinohara A, Fijihara M, Suzuki M, Sakurai Y, Sugiyama H, Kajiyama T, Nishimura R, Ono K, Nakajima J, Ono M, Eriguchi M, Takahashi H. Feasibility evaluation of

neutron capture therapy for hepatocellular carcinoma using selective enhancement of boron accumulation in tumour with intra-arterial administration of boron-entrapped water-in-oil-in-water emulsion. *Appl Radiat Isot* 69(12):1854-7, (2011).

Yanagie H, Oyama K, Hatae R, Maruyama S, Ohno Y, Kurokawa S, Nonaka Y, Sugiyama H, Furuya Y, Taniike K, Suzuki M, Masunaga S, Kinashi T, Sakurai Y, Kondo N, Narabayashi M, Tanaka H, Maruhashi A, Ono K, Nakajima J, Ono M, Takahashi H, Eriguchi M. Clinical Experiences of Boron Neutron Capture Therapy to Recurrenced Rectal Cancers. Proceedings of 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, Helsinki, Finland, (2014a).

Yanagie H, Higashi S, Seguchi K, Ikushima I, Fujihara M, Nonaka Y, Oyama K, Maruyama S, Hatae R, Suzuki M, Masunaga S, Kinashi T, Sakurai Y, Tanaka H, Kondo N, Narabayashi M, Kajiyama T, Maruhashi A, Ono K, Nakajima J, Ono M, Takahashi H, Eriguchi M. Pilot clinical study of boron neutron capture therapy for recurrent hepatic cancer involving the intra-arterial injection of a $(^{10}\text{B})\text{SH}$ -containing WOW emulsion. *Appl Radiat Isot* 88:32-7, (2014b).

Yasui L, Kroc T, Gladden S, Andorf C, Bux S, Hosmane N. Boron neutron capture in prostate cancer cells. *Appl Radiat Isot* 70(1):6-12, (2012).

Yoshida F, Matsumura A, Shibata Y, Yamamoto T, Nakauchi H, Okumura M, Nose T. Cell cycle dependence of boron uptake from two boron compounds used for clinical neutron capture therapy. *Cancer Lett* 187(1-2):135-41, (2002).

Yoshino K, Suzuki A, Mori Y, Kanahana H, Honda C, Mishima Y, Kobayashi T, Kanda K. Improvement of solubility of p-boronophenylalanine by complex formation with monosaccharides. *Strahlenther Oncol* 165:127-9, (1989).

Yoshioka M, Kurihara T, Kobayashi H, Matsumoto H, Matsumoto N, Kumada H, Matsumura A, Sakurai H, Tanaka S, Sugano T, Hashirano T, Nakashima H, Nakamura T, Kiyanagi Y, Hiraga F, Ohba T, Okazaki K. Construction of Accelerator-based BNCT facility at Ibaraki Neutron Medical Research Center. Proceedings of 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, Helsinki, Finland, (2014).

Zendel A, Lahat E, Dreznik Y, Bar Zakai B, Eshkenazy R, Ariche A. "Vanishing liver metastases" - A real challenge for liver surgeons. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3(5):295-302, (2014).

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* 41:484-95, (2006).

Zonta A, Pinelli T, Prati U, Roveda L, Ferrari C, Clerici AM, Zonta C, Mazzini G, Dionigi P, Altieri S, Bortolussi S, Bruschi P, Fossati F. Extra-corporeal liver BNCT for the treatment of diffuse metastases: What was learned and what is still to be learned. *Applied Radiation and Isotopes* 67:S67-S75, (2009).

ANEXO I: Técnica de Activación Neutrónica para determinación de flujos térmicos (Knoll, 1989)

La medición de neutrones puede llevarse a cabo indirectamente a través de la radioactividad que se genera en algunos materiales por las interacciones con neutrones. Una muestra de determinado material puede ser expuesta a un flujo de neutrones por un período de tiempo, y luego se puede cuantificar la actividad que se induce por activación en el mismo. Los tipos de decaimientos y la actividad medida pueden ser utilizados para deducir información acerca del número y/o distribución de energía de los neutrones en el campo original. Este tipo de materiales se denominan “detectores de activación”, y sus aplicaciones son ampliamente conocidas.

Debido a que las secciones eficaces son máximas en las energías de neutrones bajas, los detectores de activación son comúnmente utilizados para la medición de neutrones térmicos. Para alcanzar un alto grado de sensibilidad, se eligen materiales con altas secciones eficaces para una reacción neutrónica que produzca una forma de radiactividad medible. Debido a que el camino libre medio de los neutrones en materiales de alta sección eficaz es pequeño, el espesor de los materiales debe ser muy pequeño para evitar la perturbación del flujo neutrónico durante la medición. De esta manera, la forma geométrica más común de los materiales utilizados por esta técnica, son hojuelas delgadas o alambres de pequeño diámetro.

Activación y Decaimiento

En el caso más simple, la hojuela o alambre es tan fino que la probabilidad de una interacción es pequeña para cualquier neutrón específico. Luego, el flujo neutrónico permanece sin perturbar, y la tasa de interacciones (R), que ocurren dentro de la hojuela está dada por el producto del flujo neutrónico promediado sobre la superficie de la hojuela (ϕ), la sección eficaz de activación promediada sobre el espectro neutrónico (Σ_{act}) y el volumen de la hojuela (V):

$$R = \phi \Sigma_{act} V$$

Por lo tanto, conocidas las características geométricas de la hojuela y midiendo de algún modo esta tasa de interacciones, es posible obtener un parámetro que es un indicador directo de la magnitud del flujo neutrónico. Es lo que

se denomina SigFi en el trabajo y que resulta, utilizando la ecuación anterior, proporcional a:

$$\text{SigFi} \propto R / V = \varphi \Sigma_{\text{act}}$$

Cuando la hojuela se irradia, las especies nucleares radiactivas que se forman decaen radiactivamente. La tasa de decaimiento viene dada simplemente por λN , donde λ es la constante de decaimiento y N es el número total de núcleos radiactivos presentes. La tasa de cambio en N está dada por la diferencia entre la tasa de formación y la tasa de decaimiento

$$\frac{dN}{dt} = R - \lambda N$$

Asumiendo que la tasa R es una constante (considerando que el flujo no varía durante la exposición, y despreciando cualquier “quemado” o disminución del número de núcleos blanco durante la medición), la solución de la ecuación anterior para la condición $N = 0$ a tiempo = 0 es:

$$N(t) = \frac{R}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t})$$

La actividad A de la hojuela está dada por λN , o por:

$$A(t) = R(1 - e^{-\lambda t})$$

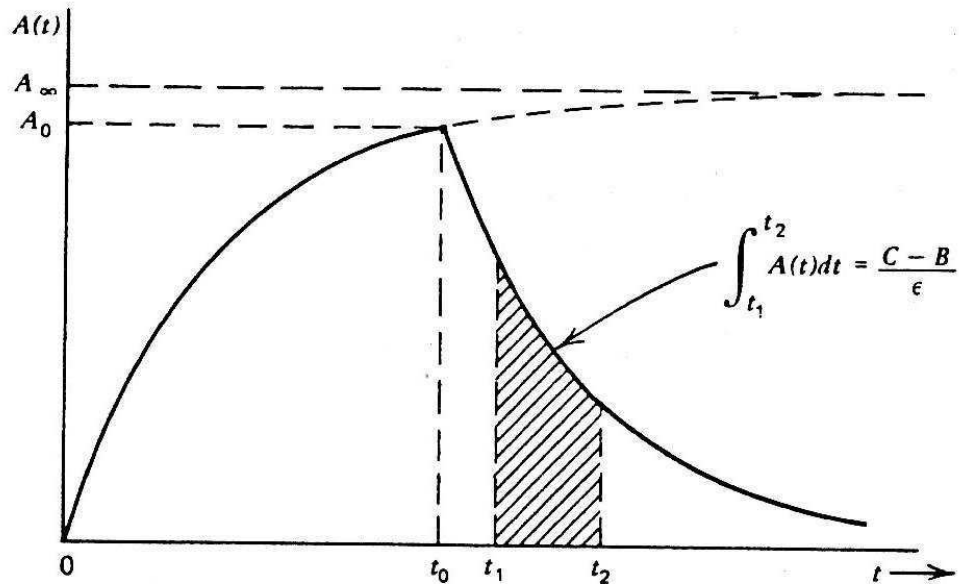
Por lo tanto la actividad crece con el tiempo, como se muestra en la Ilustración 1, y alcanza una asíntota o “actividad de saturación” para tiempos de irradiación infinitamente largos dada por:

$$A_{\infty} = R = \varphi \Sigma_{\text{act}} V$$

Si la irradiación procede por un tiempo t_0 , momento en el cuál se retira la hojuela, la actividad A_0 será:

$$A_0 = A_{\infty} (1 - e^{-\lambda t_0})$$

Ilustración 1 Actividad de un detector de activación después de la inserción en un flujo constante a un tiempo = 0 y retirado al tiempo = t_0 . El número de cuentas medidas es proporcional al área bajo la curva de decaimiento entre t_1 y t_2 . Todos los tiempos se miden desde el comienzo de la irradiación.



Luego de la irradiación, se mide la actividad de la hojuela en un detector apropiado. Se debe ser muy cuidadoso al determinar los tiempos involucrados en cada paso, debido a que la actividad de la muestra se encuentra decayendo continuamente. Si el conteo se realiza en un intervalo entre t_1 y t_2 , el número de cuentas (C) será:

$$C = \epsilon \int_{t_1}^{t_2} A_0 e^{-\lambda(t-t_0)} dt + B$$

$$= \epsilon \frac{A_0}{\lambda} e^{\lambda t_0} (e^{-\lambda t_1} - e^{-\lambda t_2}) + B$$

Donde, ϵ es la eficiencia total de conteo y B es el número de cuentas del fondo esperado entre (t_2-t_1) .

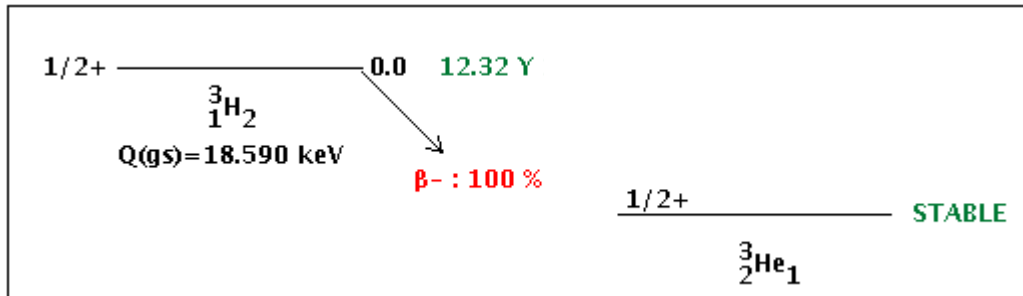
Reemplazando $A_0 = A_\infty (1 - e^{-\lambda t_0})$ en la expresión anterior, se puede obtener la actividad de saturación de la cual puede ser calculada la magnitud del flujo neutrónico.

$$A_x = \frac{\lambda(C - B)}{\epsilon(1 - e^{-\lambda t_0})e^{\lambda t_0}(e^{-\lambda t_1} - e^{-\lambda t_2})}$$

Las hojuelas de activación son detectores integradores y por lo tanto, no pueden proveer información acerca de ninguna variación del flujo neutrónico durante el tiempo de exposición. Este tipo de detectores tiene las ventajas de poseer un tamaño pequeño, ser insensibles a radiación gamma y ser de bajo costo. Tampoco requieren conexiones eléctricas y pueden tolerar condiciones extremas de trabajo en las que otros detectores suelen fallar.

ANEXO II: Consideraciones sobre la generación de tritio en el blindaje de Li_2CO_3

El tritio (^3H) es un emisor beta negativo puro cuyo esquema de decaimiento se muestra a continuación.



Fuente: <http://www.nndc.bnl.gov/chart/>

Para hacer un cálculo conservativo, puede estimarse que la *tasa de reacciones de producción de tritio* (R_t) será:

$$R_t = N^\circ \text{ at de } ^6\text{Li} \times \sigma \times \Phi_{\text{ter}}$$

Considerando 1g de carbonato de litio enriquecido al 95% en ^6Li ($^6\text{Li}_2\text{CO}_3$):

- $N^\circ \text{ at de } ^6\text{Li} = 1,599 \cdot 10^{22}$
- $\sigma = 940,3$ barns a 0.0253 eV
- $\Phi_{\text{ter}} = 8,5 \cdot 10^9$ n/cm²s (máximo medido con blindaje)
- $\Phi_{\text{ter}} 2200 = 7,3 \cdot 10^9$ n/cm²s (máximo medido con blindaje)
- Tasa de producción (R_t) = $1,097 \cdot 10^{11}$ at de tritio/seg/g (Li_2CO_3)
- Siendo el N° de at de tritio igual al producto: $R_t \times$ Tiempo de irradiación, entonces:

$$\text{Actividad del tritio} = A = N^\circ \text{ at de tritio} \times \lambda = R_t \times \text{Tiempo de irradiación} \times \lambda$$

$$\text{Si, } T_{1/2} = 12,32 \text{ años} \rightarrow \lambda = 1,78 \cdot 10^{-9} \text{ s}^{-1}$$

Considerando Tiempo de irradiación = 1 hora

- $N^\circ \text{ at de tritio producidos} = 3,93 \cdot 10^{14}$ at de tritio / hora de irrad / g(Li_2CO_3)
- $A = 0,7$ MBq / hora de irrad / g(Li_2CO_3) = $18,9$ μCi / hora de irrad / g(Li_2CO_3)

Caso blindaje hámster

- Masa aprox. de $\text{Li}_2\text{CO}_3 = 500 \text{ g}$
- $A = 350 \text{ MBq / hora de irrad.} = 9,5 \text{ mCi /hora de irrad.}$

Cabe destacar que todos los supuestos fueron considerados de forma de maximizar el cálculo estimativo de actividad de tritio generada. Se desprecia el decaimiento del tritio generado, aunque sea una consideración menor ya que el $T_{1/2}$ es largo. Se está suponiendo una irradiación completa y homogénea a máximo flujo de todo el polvo de Li_2CO_3 que forma el blindaje. En la realidad esto no sucede, ya que la primera capa de material absorbente disminuye significativamente el flujo de neutrones, y las capas interiores que forman las paredes del blindaje reciben un flujo mucho menor. Sería pertinente considerar este efecto de auto-atenuación del material teniendo en cuenta que las paredes del blindaje son de 6 milímetros. Si se considerara este efecto, el cálculo de actividad sería menor. También se está considerando una masa superior de Li_2CO_3 (por ejemplo, para la construcción del blindaje se estima que se utilizaron aproximadamente 375 g de polvo de Li_2CO_3).

De esta forma se adopta un criterio conservativo en lo referente a la protección radiológica, ya que se comparan valores sobreestimados frente a los límites de descarga permitidos.

Comparación con el límite de descarga

Según los datos del 2010 y 2011, la tasa anual de uso de blindajes de $^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ fue aproximadamente de 32 hs y 38 hs, respectivamente. A los fines de esta evaluación, considerando una tasa de uso sobreestimada (conservativa) de 50 horas por año, la generación anual de tritio sería igual a:

$$17,5 \text{ GBq de } ^3\text{H} = 17,5 \times 10^9 \text{ Bq de } ^3\text{H}$$

El valor de restricción anual de descarga gaseosa de ^3H establecido por la ARN es de $1,2 \times 10^{15} \text{ Bq}$, 5 órdenes de magnitud mayor al valor sobreestimado en este análisis. De esta forma, las posibles descargas gaseosas debido al uso del dispositivo blindaje dentro de la columna térmica se puede considerar despreciable.

Otras formas químicas del tritio

En el análisis anterior se consideró que todo el tritio se liberaría en forma gaseosa en el sistema de ventilación del reactor a través del conducto de toma de aire que posee la columna térmica.

Sin embargo, no se tiene certeza respecto de en cuáles de las posibles formas químicas se encontraría el tritio en aire (HT o HTO) luego de la reacción, ni se puede descartar que parte o todo pueda quedar retenido en la matriz que forma el polvo irradiado. De este modo sería importante poder determinar en forma experimental la concentración de tritio en aire para poder confirmar las estimaciones teóricas sobre los valores de tritio generados y evaluarlos efectivamente con el índice de liberación permitido.

De acuerdo a algunos ensayos realizados sobre pellets de Li_2CO_3 no enriquecido comprimidos en frío, solo una fracción del tritio producido en estos pellets se pierde. En este caso, durante la irradiación del pellet, los tritones creados en los límites de la superficie tienen la posibilidad de escapar del pellet, dada la alta energía cinética. La fracción de tritio perdida depende principalmente del tamaño, la composición química del pellet y de la energía del neutrón. Para el pellet de Li_2CO_3 estudiado en ese trabajo, de 13 mm de diámetro y espesor de 1 mm, irradiado con neutrones térmicos, el factor de escape fue de alrededor de 2,5 % (Batistoni et al. 2005).

La otra fracción de pérdida de tritio importante es justamente la fase gaseosa producida durante la irradiación. En ese trabajo la pérdida en esta fase se puede producir durante la irradiación o el proceso químico al que luego se somete a la muestra. Para el caso de estos pellets comprimidos en frío, irradiados y procesados químicamente el factor de pérdida fue estimado en 7% (Batistoni et al. 2005).

Si bien las condiciones de ensayo de estos pellets son muy diferentes a las condiciones en las que se expone el Li_2CO_3 dentro del blindaje de hámster, pueden servir como referencia de que gran parte del tritio generado al irradiar Li_2CO_3 quedaría en la matriz del polvo irradiado. Para confirmarlo, se realizó un ensayo cualitativo midiendo por centelleo líquido una muestra de polvo irradiado disuelto en agua.

Análisis de contenido de tritio en polvo de Li_2CO_3 (95% ^6Li) irradiado

Material muestreado: polvo de Li_2CO_3 (enriquecido 95% en ^6Li) irradiado y disuelto en agua calidad nanopure (aproximadamente en 15 ml de agua). Se prepararon dos soluciones acuosas con diferentes cantidades de polvo irradiado: **Sc N°1**, aprox. 0.3 g de $^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ y **Sc N°2**, aprox. 1.2 g de $^6\text{Li}_2\text{CO}_3$. Ambas soluciones presentaron un precipitado del polvo en el momento de la preparación (la solubilidad del Li_2CO_3 en agua es de 1,3 g/100ml). Fueron agitadas y dejadas en reposo durante al menos 4 semanas hasta la toma de las muestras para la medición. De cada una de las muestras se tomaron 5 ml de líquido sobrenadante de la solución de reposo, luego se agitó cada solución y se volvieron a extraer inmediatamente otros 5ml de líquido sobrenadante (con partículas de polvo en suspensión). Se tomó una muestra de 5 ml de agua nanopure como blanco de comparación. A cada muestra de 5ml, colocada en un tubo de centelleo por separado, se agregaron 10ml de líquido centellador y se midió en detector de centelleo.

En la siguiente tabla se resumen las características de cada muestra y los resultados de las mediciones de actividad en el pico correspondiente del tritio.

# muestra	Descripción	A [Bq/ml]
1	5 ml de sobrenadante de Sc N°1 en reposo	136
2	5 ml de sobrenadante de Sc N°1 tomado inmediatamente luego de agitar la solución remanente luego de la toma de la muestra #1	137
3	5 ml de sobrenadante de Sc N°2 en reposo	446
4	5 ml de sobrenadante de Sc N°2 tomado inmediatamente luego de agitar la solución remanente luego de la toma de la muestra #3	483

Cabe aclarar que toda la actividad detectada en la muestra presentaba una emisión característica para el tritio.

De acuerdo a esta primera aproximación, se puede confirmar la presencia de tritio retenido en el polvo irradiado que se mantiene en solución acuosa luego de ser disuelto. Este fue el principal objetivo de este primer ensayo.

A modo cualitativo, la actividad medida aumenta al aumentar la cantidad de Li_2CO_3 disuelto, aunque solo se analizaron dos concentraciones. Si bien no se puede asegurar con esta experiencia, la presencia de parte de polvo en la

suspensión no parece aumentar la actividad medida en la solución. Se sugiere que la mayor parte del tritio pasa a la solución cuando se disuelve el polvo en agua, aunque habría que realizar otra experiencia específica para confirmarlo (por ejemplo filtrando el polvo decantado y re-suspendiendo para medir nuevamente la actividad en el sobrenadante).

ANEXO III Activación de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$

Al utilizar el primer blindaje de hámster en forma reiterada se detectó que el mismo quedaba activado post-irradiación presentando tasas de dosis en contacto no despreciables (dependiendo del tiempo de irradiación, aproximadamente entre 20 y 40 mRem/h).

La activación del blindaje era obviamente dependiente del tiempo de irradiación, aumentando rápidamente y decayendo en cuestión de horas. En menos de un día posterior a cualquier irradiación, el blindaje no presentaba tasa de exposición alguna. Esta información hace pensar que el emisor tiene un período de semidesintegración corto. Posteriormente, se midió por espectrometría gamma una muestra de polvo irradiado encapsulado en acrílico. En principio, no se observaron picos característicos diferentes del fondo, salvo un aumento de la emisión del pico de 511 KeV.

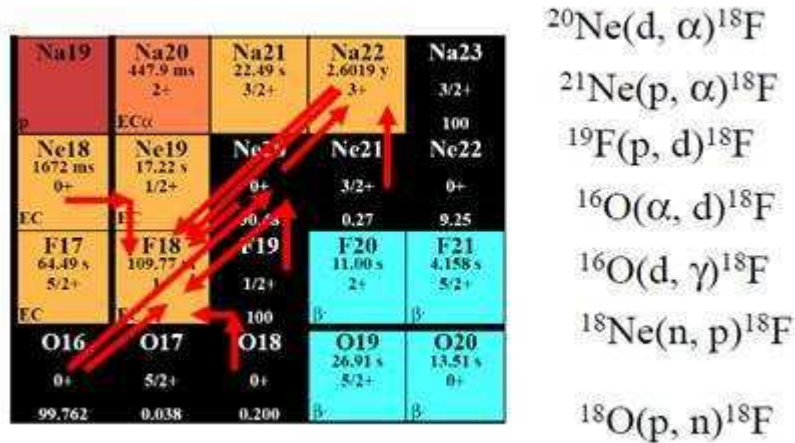
En el análisis previo este hecho no era esperable y en principio se pensó que se podía tratar de algún contaminante presente en el material de partida. Para sumar información, se solicitó una caracterización multielemental al Grupo de Técnicas Analíticas Nucleares de la CNEA. Utilizando el método de activación neutrónica, se realizó un análisis cualitativo de una muestra con 9 días de decaimiento encontrando la presencia de los siguientes radionucleídos: ${}^{198}\text{Au}$, ${}^{60}\text{Co}$, ${}^{51}\text{Cr}$, ${}^{239}\text{Np}$, ${}^{182}\text{Ta}$ y ${}^{187}\text{W}$. Cabe aclarar que para este análisis la muestra se irradió en un espectro de energía del flujo de neutrones diferente al presente en la FCCT, pudiéndose detectar niveles traza de elementos producto de diversas reacciones, aunque principalmente de captura. Considerando los elementos encontrados según sus características de decaimiento y las posibles reacciones nucleares que les pudieran dar origen, no se pudo asociar ningún elemento que explique la activación del material con las características descritas. Por este motivo se descartó realizar un análisis cuantitativo por esta técnica.

Finalmente, considerando los recaudos de radioprotección necesarios para el manejo de los blindajes, se prosiguió con la utilización de los mismos, incluida la nueva versión que se describe en este trabajo.

Sin embargo, en paralelo se prosiguió con el análisis del caso y se confirmó experimentalmente la emisión de solo un pico de 511 KeV en una muestra de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ irradiado, con un período de semi-desintegración de 109.4 minutos (datos

no publicados). Considerando estos datos, la emisión se correspondería con el decaimiento de ^{18}F , un emisor beta positivo puro. Se analizó la posibilidad de que este nucleído estuviera presente como producto de la irradiación del $^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ con neutrones térmicos. La única posibilidad es que se genere por una reacción secundaria, es decir, que las partículas alfa o los tritones generados en la reacción con el ^6Li , reaccionen con alguno de los elementos presentes generando ^{18}F .

Alguna de las reacciones de generación de ^{18}F posibles son las siguientes:



La reacción $^{16}\text{O}(\alpha, d)^{18}\text{F}$ sería la única posible en las condiciones estudiadas, aunque no sería la más probable.

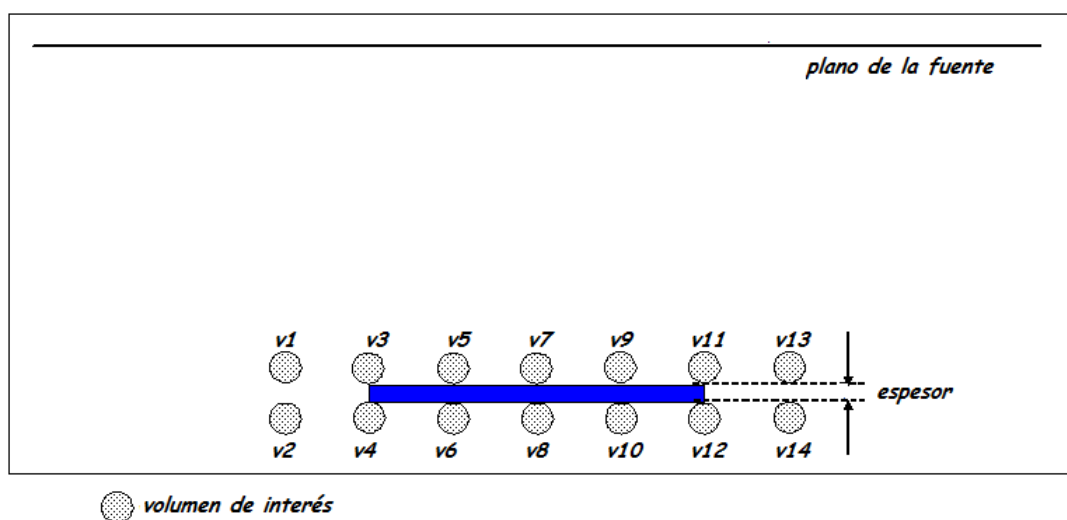
Finalmente se consideró la reacción $^{16}\text{O}(t, n)^{18}\text{F}$ (Siri, comunicación personal). Esta es una reacción que ha sido descrita para condiciones similares de irradiación a la de la aplicación en este trabajo (Siri 2008, Kudo y Tanaka 1980). Se sugiere que la producción de ^{18}F por esta vía sería la explicación de la activación del $^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ con que se fabricaron los blindajes. Actualmente se sigue analizando esta posibilidad, así como la alternativa de variar la composición del material que se utiliza en los blindajes. Transformando químicamente el Li_2CO_3 a un compuesto como por ejemplo el FLi, se evitaría la presencia de grandes cantidades de oxígeno en íntimo contacto con el ^6Li y, por lo tanto, con los tritones que se generan en la reacción de éste con los neutrones térmicos. De esta forma se evitaría la generación de ^{18}F , siendo a la vez, el FLi un compuesto de mejores propiedades como blindaje ya que posee mayor densidad.

ANEXO IV: Determinación del espesor de blindaje

Para el desarrollo del blindaje para hámster se realizó un cálculo simple utilizando el código de transporte Monte Carlo, MCNP desarrollado por Los Alamos (EE UU)^u, con la intención de predecir de forma aproximada el efecto blindante de neutrones de diferentes espesores de pared de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$.

De manera extremadamente simplificada se consideró una fuente de neutrones térmicos en aire y un conjunto de volúmenes de interés, también de aire, donde se evaluó el flujo neutrónico (a través del tally 4) antes y después de un espesor de carbonato de litio enriquecido al 95% en ${}^6\text{Li}$. La fuente se posicionó lo suficientemente lejos como para que la diferencia entre los flujos antes y después del carbonato no estuviese dominada por efectos relativos a la distancia a la misma. Un esquema de la geometría adoptada puede verse en la Ilustración 1.

Ilustración 1 Esquema del modelo simplificado utilizado para evaluar los distintos espesores de blindaje neutrónico.



Se consideraron los casos de espesor de pared de 6, 8, 10 y 12 mm, y se evaluó la relación de atenuación para cada espesor, a partir de la relación entre el flujo luego del blindaje (atenuado) y el flujo incidente.

Las tablas A, B y C presentan los resultados obtenidos:

^uX-5 Monte Carlo Team, "MCNP - A General Monte Carlo N-Particle Transport Code, Version 5 - Volume I: Overview and Theory," LA-UR-03-1987, Los Alamos National Laboratory, revised 2/2008 (2008)

Tabla A Valores de flujo por unidad de partícula fuente (tally 4) antes del blindaje

ESPESOR (mm)	6	8	10	12
	Tally 4 (± error)			
V1	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)
V3	1.00E-04 (±0.8%)	1.00E-04 (±0.8%)	1.00E-04 (±0.8%)	1.00E-04 (±0.8%)
V5	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)
V7	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)
V9	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)
V11	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)
V13	1.02E-04 (±0.8%)	1.02E-04 (±0.8%)	1.02E-04 (±0.8%)	1.02E-04 (±0.8%)

Tabla B Valores de flujo por unidad de partícula fuente (tally 4) después del blindaje.

ESPESOR (mm)	6	8	10	12
	Tally 4 (± error)			
V2	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)	1.01E-04 (±0.8%)
V4	5.23E-05 (±1%)	5.20E-05 (±1%)	5.19E-05 (±1%)	5.19E-05 (±1%)
V6	2.58E-06 (±5%)	2.00E-06 (±6%)	1.77E-06 (±6%)	1.67E-06 (±6%)
V8	2.58E-06 (±5%)	1.90E-06 (±6%)	1.64E-06 (±6%)	1.57E-06 (±6%)
V10	2.19E-06 (±5%)	1.70E-06 (±6%)	1.55E-06 (±6%)	1.49E-06 (±6%)
V12	5.21E-05 (±1%)	5.18E-05 (±1%)	5.18E-05 (±1%)	5.18E-05 (±1%)
V14	1.02E-04 (±0.8%)	1.02E-04 (±0.8%)	1.02E-04 (±0.8%)	1.02E-04 (±0.8%)

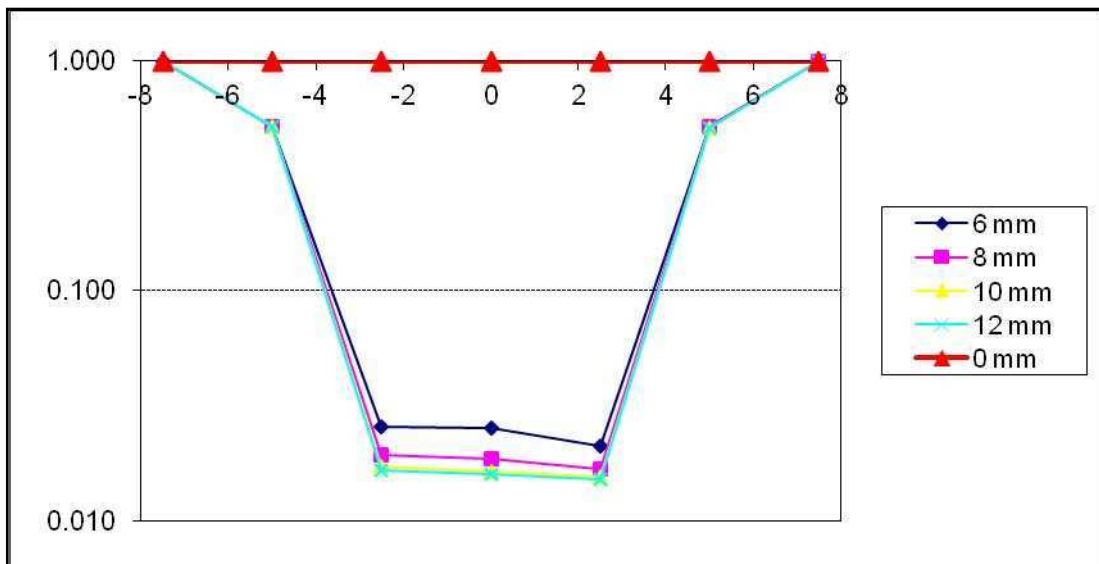
Tabla C Valores del cociente de flujos después/antes de atravesar el espesor de blindaje.

ESPESOR (mm)	6	8	10	12
	Transmisión (%) = Cociente de tallies (V_i/V_{i-1}) (%)			
V2/V1	100%	100%	100%	100%
V4/V3	52%	52%	52%	52%
V6/V5	3%	2%	2%	2%
V8/V7	3%	2%	2%	2%
V10/V9	2%	2%	2%	1%
V12/V11	52%	51%	51%	51%
V14/V13	100%	100%	100%	100%

Como resultado general de este modelado computacional, se obtuvo que para las condiciones definidas, con 6 mm de este material, se podía atenuar más del 97% del flujo incidente. Para el caso de 8 mm de espesor, no se observó una diferencia significativa, alcanzando solo una atenuación del 98% (Ilustración 2).

El uso de un espesor mayor implica un engrosamiento extra en las paredes de todo el blindaje. Cabe aclarar que esta evaluación es una simplificación extrema de la fuente real y del blindaje, y solo se hizo con el fin de definir un criterio práctico de decisión con respecto a qué espesor considerar. En los últimos años, en paralelo al desarrollo de este trabajo, se realizó una simulación de la fuente real de la FCCT del reactor RA-3 y actualmente se cuenta con esta herramienta (Bortolussi et al. 2011).

Ilustración 2 Representación gráfica de los datos de la Tabla C en función del ancho de la pared modelada. El valor 0 en el eje horizontal referencia el centro geométrico de la pared que divide la misma en dos partes simétricas. En el eje vertical se representa la relación del flujo que llega desde una fuente plana homogénea luego de atravesar cada espesor de blindaje de ${}^6\text{Li}_2\text{CO}_3$. La línea con triángulos rojos representa el caso de ausencia de blindaje (0 mm de espesor).



ANEXO V

Ilustración 1 Masa corporal promedio (g) de las ratas BDIX de ambos sexos del grupo Sham, hasta 2 semanas de seguimiento post simulación de irradiación. El tiempo 0 (t_0) corresponde al momento en que se realiza la inoculación de células en el hígado. Las barras de error en a) representan \pm un desvío estándar. La flecha negra indica el tiempo al cual se realiza la simulación de irradiación.

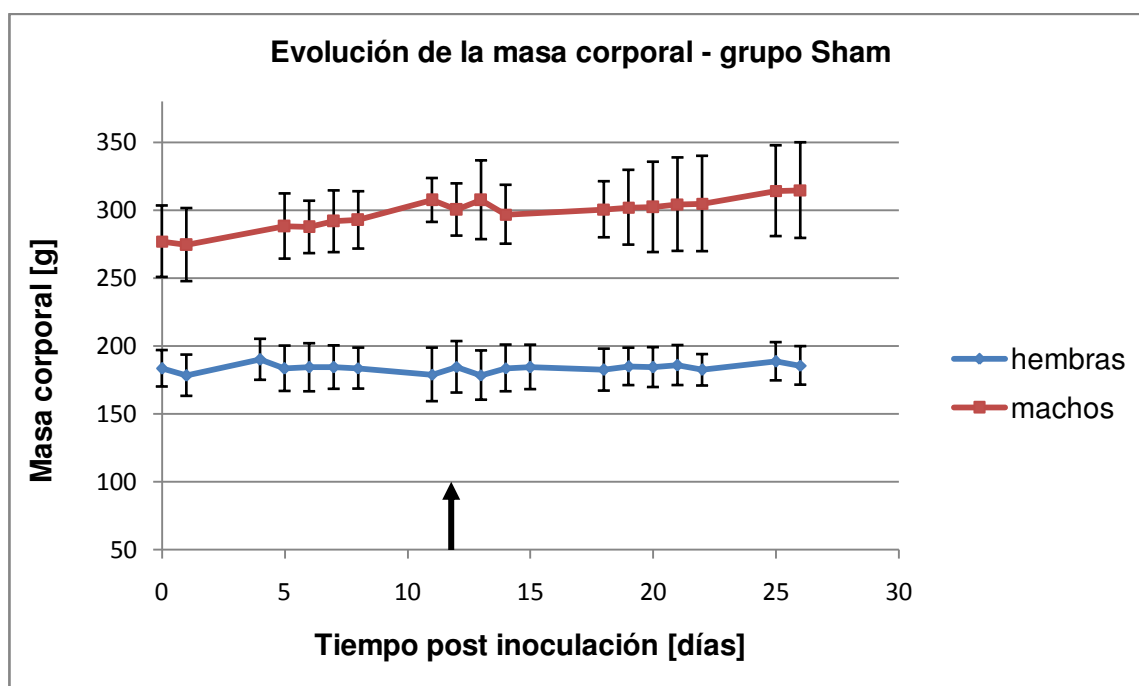
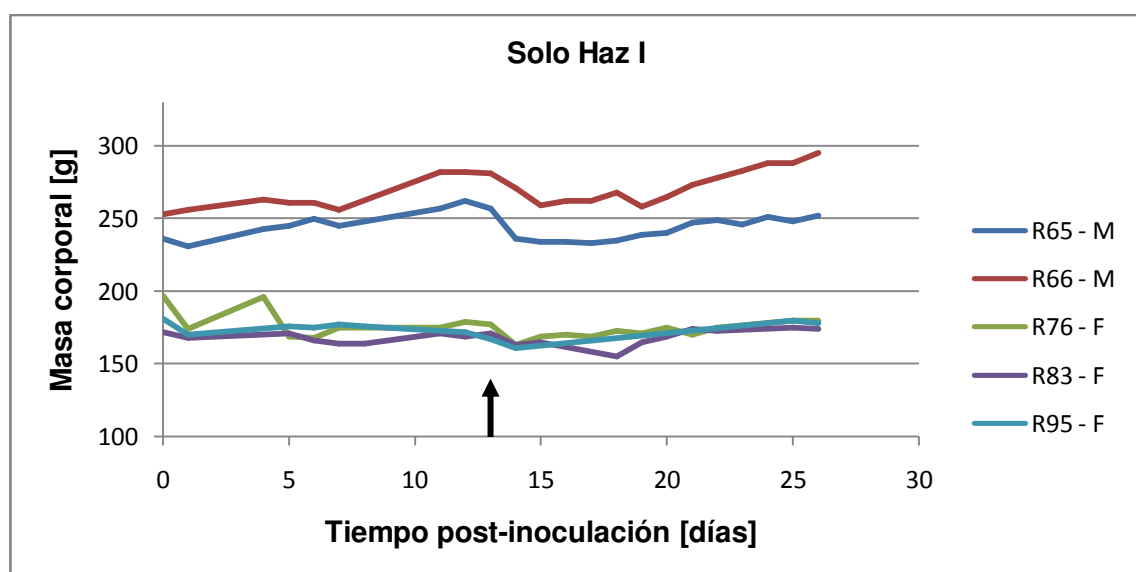


Ilustración 2 Evolución individual de la masa corporal (g) de las ratas BDIX tratadas con Solo Haz o BNCT para cada tiempo post-inoculación hasta 2 semanas de seguimiento. La incerteza de la medida sería de 5%. La flecha negra indica el tiempo al cual se realiza la irradiación.



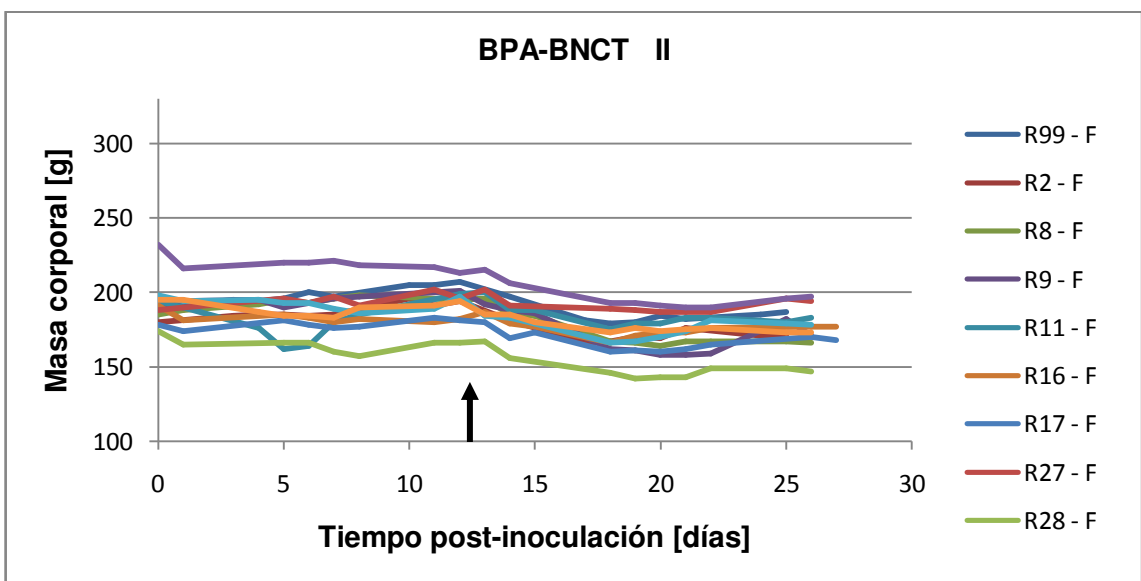
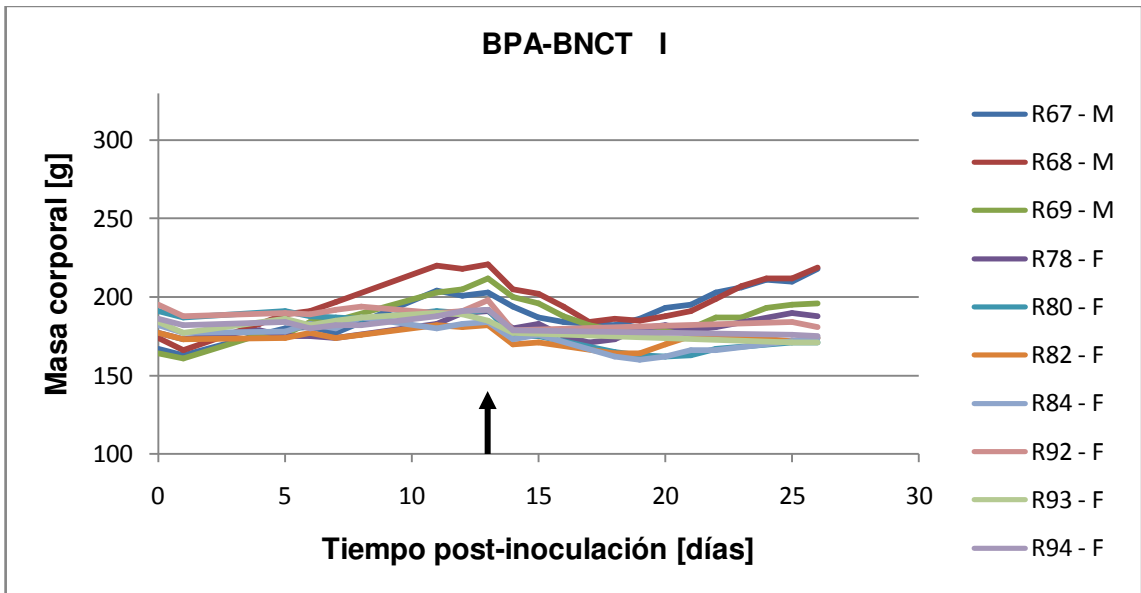
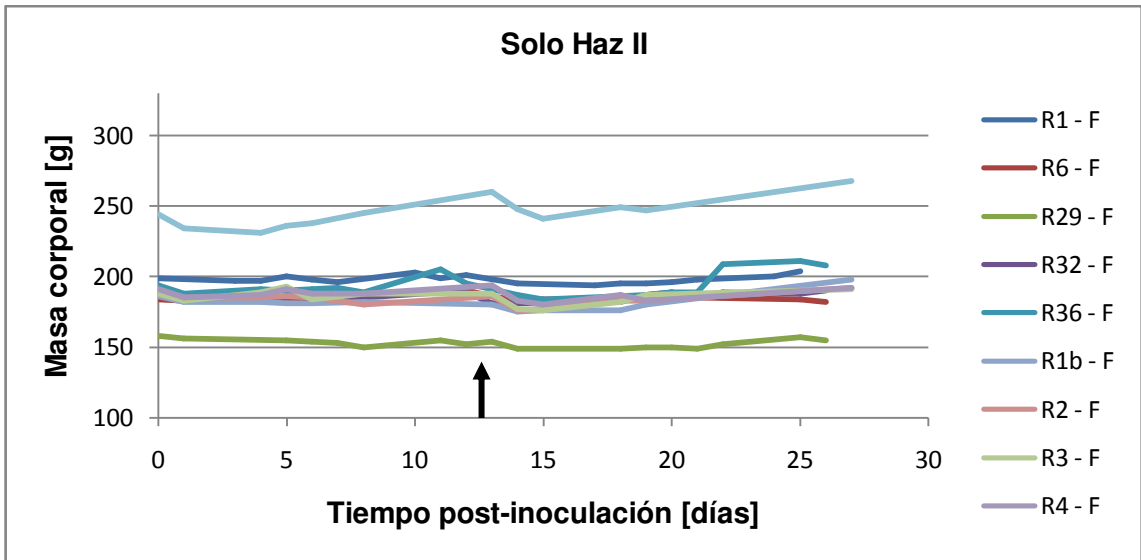
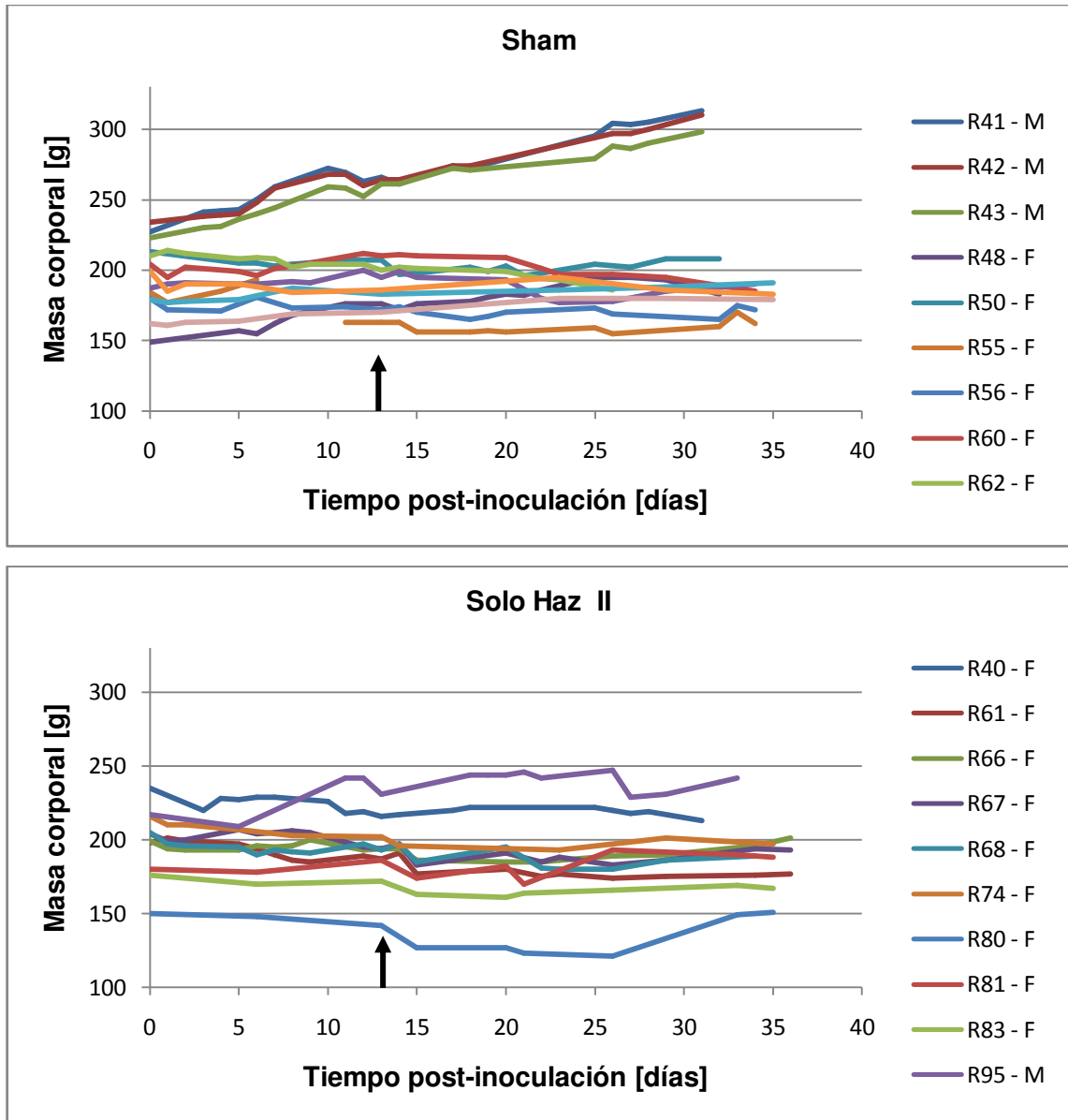


Ilustración 3 Evolución de la masa corporal (g) individual para los grupos Sham, Solo Haz y BPA-BNCT hasta 3 semanas post-tratamiento. La incerteza de la medida sería de 5%. La flecha negra indica el tiempo al cual se realiza la irradiación.



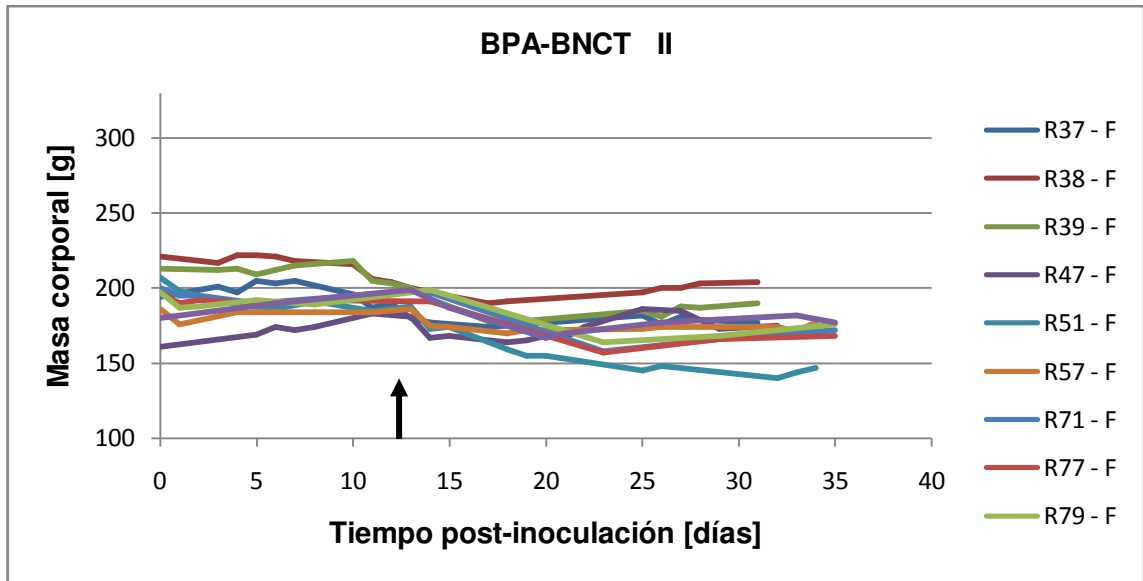


Ilustración 4 Evolución de la masa corporal (g) individual para los grupos Sham, Solo Haz y BPA-BNCT hasta 5 semanas post-tratamiento. La incerteza de la medida sería de 5%. La flecha negra indica el tiempo al cual se realiza la irradiación.

