

Tesis Doctoral

Eficacia terapéutica y toxicidad de la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) en tejido con cancerización de campo: Estudio radiobiológico en un modelo experimental de cáncer bucal

Monti Hughes, Andrea

2012

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:

Monti Hughes, Andrea. (2012). Eficacia terapéutica y toxicidad de la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) en tejido con cancerización de campo: Estudio radiobiológico en un modelo experimental de cáncer bucal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Monti Hughes, Andrea. "Eficacia terapéutica y toxicidad de la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) en tejido con cancerización de campo: Estudio radiobiológico en un modelo experimental de cáncer bucal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

**Eficacia terapéutica y toxicidad de la terapia por
captura neutrónica en boro (BNCT) en tejido con
cancerización de campo: Estudio radiobiológico en un
modelo experimental de cáncer bucal**

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

Lic. Andrea MONTI HUGHES

Director de tesis: Dra. Amanda E. SCHWINT

Director Asistente: Dra. Verónica A. TRIVILLIN

Consejero de estudios: Dra. Lilia LAURIA

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

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2012

Eficacia terapéutica y toxicidad de la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) en tejido con cancerización de campo: Estudio radiobiológico en un modelo experimental de cáncer bucal

RESUMEN

BNCT se basa en la reacción de captura entre el boro depositado preferencialmente en tumor y los neutrones térmicos, generando partículas letales de corto alcance que dañan al tumor, preservando el tejido normal. Previamente, demostramos el éxito terapéutico del BNCT en tumores de la bolsa de la mejilla del hámster. El desafío pendiente era inhibir el desarrollo de segundos tumores primarios (STP) a partir de tejido con cancerización de campo, minimizando la mucositis limitante de dosis. Los STP son frecuentemente la causa del fracaso terapéutico clínico en tumores de cabeza y cuello.

El objetivo general de la presente tesis doctoral fue evaluar, por primera vez, la radiotoxicidad y potencial inhibitorio a largo plazo de BNCT sobre el desarrollo tumoral en un modelo de mucosa bucal con cancerización de campo desarrollado en la bolsa de la mejilla del hámster para seguimiento a largo plazo (8 meses). Estudiamos la radiotoxicidad y capacidad inhibitoria de diferentes protocolos de BNCT, variando las dosis y los protocolos de fraccionamiento.

Por primera vez, evidenciamos el efecto inhibitorio de BNCT en un tejido con cancerización de campo a largo plazo. Para optimizar BNCT, determinamos la influencia de las condiciones de tratamiento sobre la ventaja terapéutica y radiotoxicidad.

Palabras claves

Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT); Cáncer bucal; Cancerización de campo; Segundos tumores primarios; Recidivas; Mucositis

Therapeutic efficacy and toxicity of boron neutron capture therapy (BNCT) in field-cancerized tissue: Radiobiological study in an experimental oral cancer model

ABSTRACT

BNCT combines selective accumulation of ^{10}B carriers in tumor tissue with subsequent neutron irradiation, giving rise to lethal, short-range particles. Damage is limited largely to cells containing ^{10}B . Previously, we demonstrated the therapeutic efficacy of BNCT to treat tumors in the hamster cheek pouch. However, the inhibition of tumor development from field-cancerized tissue was still an unresolved challenge. In a clinical scenario, tumor development from field-cancerized tissue is frequently the cause of therapeutic failure.

The aim of the present PhD thesis was to evaluate, for the first time, BNCT-induced potential radiotoxicity and long-term inhibition of tumor development in a model of oral field-cancerized tissue. We developed an oral precancer model in the hamster cheek pouch for long-term studies (8 months). We studied radiotoxicity and the potential inhibitory effect of different BNCT protocols, evaluating different dose levels, dose fractionation and interval between applications.

For the first time, we evidenced the long-term inhibitory effect on tumor development of BNCT in field-cancerized tissue and showed that treatment conditions are pivotal to therapeutic advantage and radiotoxicity. The knowledge of BNCT radiobiology for experimental oral precancer contributes to the optimization of the technique.

Key words

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT); Oral cancer; Field-cancerization; Second primary tumors; Recurrences; Mucositis

AGRADECIMIENTOS

Mucha gente ha sido participe en esta tesis. A nivel laboral, aportándome conocimientos, ayudándome y haciéndome feliz, porque trabajo en un grupo tan unido, donde el apoyo mutuo está siempre, en toda circunstancia. A nivel afectivo, mi familia y amigos aportaron a esta tesis apoyándome, llenándome de energía y felicidad, y dándome infinito cariño. Es por todo esto que quiero escribir en esta sección de mi tesis, uno de los objetivos más importantes de mi vida, lo que siento por toda la gente que me rodea.

Gracias Ma y Pa, por haberme enseñado a perseverar, a luchar, a mirar hacia adelante. Por todo su amor y apoyo, por todo lo que ustedes hicieron para que hoy esté logrando esto y hacerme tan feliz. Los quiero muchísimo.

Nico, mi querido gran hermano, gracias por estar siempre, por darme ánimo y tus mejores consejos. Querida Jenny, porque además de ser cuñadas, tenemos la suerte de compartir una hermosa amistad! Laikita! gracias por tanta alegría!

Mari, porque sos como una hermana para mí. Gracias a mi familia entera, a Carlitos, Lucy, Roberto, Gladys, Rosita, Elena. A mi nain postiza Olwen.

Dear Dire, sos tan importante para mí! Por todo lo que me enseñas, tu empuje, tu inmensa dedicación. Porque lo que genera nervios lo transformas en risas! Por apoyarme y brindarme tu cariño siempre, en toda circunstancia de la vida.

Querida Co-Dire! Aprendí tanto trabajando con vos. Gracias por tu dedicación constante y nuestros viajes a Ezeiza! Por irradiar tanta buena onda, cariño y estar siempre, en todo momento.

Marce Amigaaaa, gracias por tu ayuda con las biodistribuciones y llenar el laboratorio de sonrisas y tanta energía!

Lis, tu positividad y cariño hace que trabajar con vos sea genial. Gracias por toda tu ayuda en el desarrollo del tejido con PMD!

Emiliano! Gracias miles por todas las irradiaciones y los cálculos de dosis. "Irradias" siempre tanta positividad que es un lujo trabajar con vos!

Mariel, gracias por su inmensa ayuda en la evaluación histológica y por todo lo que me enseña en cada reunión que tenemos. Disfruto muchísimo esos momentos con usted!

Romi querida! Gracias por tu colaboración en la histología y por la amistad que tenemos!

Gustavo, los ensayos DIRI eran largos pero "se volaban" por la buena onda que tanto te caracteriza! Gracias TOTALES por tu dedicación infinita y constante al proyecto BNCT.

Rubén, gracias mil por lo que corriste para que podamos hacer las simulaciones que aportaron tanto a esta tesis. Gracias por tus mates y tu genial amistad.

Gracias Sarita por correr junto a Rubén para desarrollar el Gran Hamster Tool!

Silvita! Gracias por tu ayuda en las irradiaciones y cálculos de dosis. Disfruto mucho trabajar con vos!

Dr. Nigg, gracias por brindarnos siempre su apoyo y colaboración en todos los experimentos.

Paula, mil gracias por las irradiaciones y las fotos que sacaste!

Gracias Lucas, por estar siempre al “pie del cañón”!

Ana, gracias por tu ayuda en estos 5 años que compartimos.

Muchísimas gracias Dr. Pizarro por su constante apoyo en nuestras investigaciones.

Gracias a la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología (UBA), al personal de los reactores RA-6, RA-3 y departamentos de Química del CAC y CAE.

Betty, disfruto tanto nuestras charlas y gracias por sus consejos, desde siempre!

Dr. Cabrini, gracias por siempre preocuparse de cómo iba mi tesis y darme ánimo.

Moni, gracias por estar siempre tan pendiente! Gracias Euge, Coco, Giselle, Joana y Mary, por tantos lindos momentos y almuerzos que compartimos todos los días. Mary, gracias por todas tus labores administrativas!

Manuel. Sos uno de los que potenciaron mi vocación y me apoyó desde siempre. Gracias por tantos años de amistad!

A Carlos e Isabel, que me enseñaron tanto en mis inicios como científica.

A Tere, por tu cariño de siempre y tantos años de inglés que me ayudaron muchísimo!

Clau, porque sos uno de los pilares de mi vocación. Por tantos cafecitos que compartimos!

A mi querido grupo de amigos del club, que siempre están y compartimos esta amistad infinita!

Gracias Cel, Pau, Delf, Lula, Jime, Sole, Eli, Santi, Fran, Marce, Juan, Axel, por esta amistad que compartimos, por tanto apoyo y tantas risas durante nuestra carrera y vidas!

Gracias amiguísima Lucía! Por tanta positividad, aliento y compartir este momento conmigo, con tanta intensidad. Te adoro!

Queridotes Agus, Carla, María, Rubén, Andrés, Mario, Manuel. Gracias por hacer que los viajes y “comilonas” que compartimos sean tan geniales!

A mis amigos de Hip Hop y Axe, por las risas y bailes que me llenan de energía!

Marce, compa! Gracias por todo tu apoyo y buena onda!

Gracias Ed por escucharme, haber compartido parte de esto conmigo y por todos los momentos que compartimos que son tan lindos y divertidos!

Silva, aunque te tengo lejos, sabés lo importante que sos para mi amiga!

Gracias Ju por estar siempre pendiente, dándome tanto ánimo!

A aquellas personas que, aunque no vea tan seguido, los momentos que comparto son siempre tan lindos: Sandra, Seba, Gaby y Amigos de Taiwan e Italia.

A todas aquellas personas que partieron, familia y amigos, a quienes tengo siempre en mi corazón.

PUBLICACIONES

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

1-Boron neutron capture therapy (BNCT) inhibits tumor development from precancerous tissue: an experimental study that supports a potential new application of BNCT.

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.

Appl Radiat Isot. 2009; 67(7-8 Suppl): S313-7.

2-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.

Heber EM, **Monti Hughes A**, Pozzi EC, Itoiz ME, Aromando RF, Molinari AJ, Garabalino MA, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE.

Arch Oral Biol. 2010; 55(1): 46-51.

3-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.

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.

Oral Oncol. 2011; 47(11): 1017-22.

4-The hamster cheek pouch model for field cancerization studies.

Monti Hughes A, Aromando R, Pérez MA, Schwint AE, Itoiz ME.

Capítulo en: A Latin American Perspective of Periodontology, ed. Raul Caffesse.

Periodontology 2012 - En prensa.

5-Inhibition of tumor development in an oral precancer model: Therapeutic efficacy and potential toxicity of single and double application protocols of boron neutron capture therapy (BNCT).

Monti Hughes A, Pozzi ECC, Thorp S, Garabalino MA, Farías RO, González SJ, Heber EM, Itoiz ME, Aromando RF, Molinari AJ, Miller M, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE.

Oral Diseases 2012 - En prensa.

Este trabajo se realizó en colaboración con:

*Departamento de Ingeniería Nuclear, Centro Atómico Bariloche (CAB), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

*Departamento de Química, Centro Atómico Constituyentes (CAC), CNEA.

*El Dr. Claudio Devida y su equipo del ICP-MS del Centro Atómico Ezeiza (CAE), CNEA.

*Departamento Coordinación de BNCT, Gerencia de Área Aplicaciones de la Tecnología Nuclear (GAATEN), CNEA.

*Gerencia de Reactores de Investigación y Producción, CNEA.

*Sub-Gerencia de Instrumentación y Control, Gerencia de Área de Energía Nuclear, CNEA.

*Sub-Gerencia de Tecnología y Aplicaciones de Aceleradores, Gerencia de Área de Investigación y Aplicaciones No Nucleares (GAIANN), CNEA.

*Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires (UBA).

*Idaho National Laboratory, Idaho Falls, EE.UU.

El presente proyecto se encuadra dentro del proyecto multidisciplinario "Captura neutrónica en boro (BNCT) como terapia para tumores" que desarrolla la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	4
PUBLICACIONES	6
INTRODUCCIÓN	12
CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL CÁNCER Y LAS TERAPIAS ACTUALES	13
CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA RADIACIÓN	16
CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT).....	17
Reacción de captura de neutrones térmicos en ¹⁰ B	17
Concentración de boro en tejido neoplásico y normal.....	18
Primera componente del BNCT: Compuestos transportadores de boro.....	19
Compuestos borados aprobados para su uso en la clínica: BPA, GB-10, BSH	21
Desarrollo de nuevos compuestos borados	25
Segunda componente del BNCT: Neutrones térmicos	25
Radiobiología del BNCT	26
HISTORIA CLÍNICA DEL BNCT A NIVEL MUNDIAL.....	30
Glioblastoma multiforme marcando el comienzo del BNCT	30
Aplicaciones del BNCT a otros tipos de cáncer	33
CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL MODELO BIOLÓGICO A ESTUDIAR.....	38
Cáncer de la cavidad bucal.....	38
Modelo de cáncer bucal: bolsa de la mejilla del hámster	38
ESTUDIOS REALIZADOS EN NUESTRO LABORATORIO HASTA LA ACTUALIDAD.....	58
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
MATERIALES Y MÉTODOS	67
I. Desarrollo y caracterización del modelo de cancerización de campo para estudios de BNCT a largo plazo.	68
Breve resumen.....	68
Ia. Protocolos de cancerización.....	68
Ib. Seguimiento	69
Estado general de los animales.....	69
Cinética del desarrollo tumoral	69
Síntesis de ADN	70
Análisis estadístico	71
II. Estudios de biodistribución y BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>única</i> aplicación de BNCT, utilizando una dosis total absorbida de 4 Gy a tejido con PMD (Potentially Malignant Disorders: lesiones potencialmente malignas)	72
Breve resumen.....	72
IIa. Estudios de biodistribución.....	72
Protocolo de administración de BPA	73
Protocolo de administración de GB-10.....	74
Protocolo de administración de la combinación (GB-10+BPA)	74

Procesado de las muestras de sangre y tejidos para ser analizados en el ICP-OES.....	74
IIb. Estudios radiobiológicos	77
Esquema general de trabajo	81
IIc. Seguimiento.....	81
Estado general de los animales.....	81
Análisis de radiotoxicidad	81
Cinética del desarrollo tumoral	82
Análisis estadístico	83
III. Estudios de BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>doble</i> aplicación de BNCT desfasada en el tiempo, con un intervalo de 6 semanas entre irradiaciones con una dosis absorbida de 4 Gy a tejido con PMD en cada irradiación.....	84
Breve resumen.....	84
IIIa. Estudios de biodistribución.....	84
IIIb. Estudios radiobiológicos	84
Esquema general de trabajo	91
IIIc. Seguimiento	92
Estado general de los animales.....	92
Análisis de radiotoxicidad	92
Cinética del desarrollo tumoral	93
Síntesis de ADN.....	94
Análisis estadístico	94
IV. Estudios de biodistribución y BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>doble</i> aplicación de BNCT con un intervalo de 2 semanas entre irradiaciones, 4 Gy dosis absorbida en tejido con PMD en cada irradiación, versus una <i>única</i> aplicación de BNCT a la misma dosis total absorbida (8 Gy).	95
Breve resumen.....	95
IVa. Estudios de biodistribución	95
Nuevo protocolo de procesado de las muestras de sangre, tejidos y órganos para ser analizados en el ICP-OES.....	95
Procesado de las muestras de sangre y tejidos para ser analizados en el ICP-MS.....	96
IVb. Estudios radiobiológicos.....	98
Modelado computacional: “Hamster Tool”	102
Esquema general de trabajo	106
IVc. Seguimiento	107
Estado general de los animales.....	107
Análisis de radiotoxicidad	107
Cinética del desarrollo tumoral	107
Análisis estadístico	108
V. Estudios de biodistribución y BNCT “piloto” <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>única</i> aplicación de BNCT, dosis total absorbida de 6 Gy a tejido con PMD.	109
Breve resumen.....	109
Va. Estudios de biodistribución.....	109
Vb. Estudios radiobiológicos	109
Esquema general de trabajo	110
Vc. Seguimiento	111

Estado general de los animales.....	111
Análisis de radiotoxicidad	111
Cinética del desarrollo tumoral	111
Análisis estadístico	111
VI. Estudios de biodistribución y BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>doble</i> aplicación de BNCT con un intervalo de 4 semanas entre irradiaciones, 5 Gy dosis absorbida a tejido con PMD en cada irradiación.	112
Breve resumen.....	112
VIa. Estudios de biodistribución	112
VIc. Estudios radiobiológicos	112
Esquema general de trabajo	114
VIId. Seguimiento.....	115
Estado general de los animales.....	115
Análisis de radiotoxicidad	115
Cinética del desarrollo tumoral	115
Análisis estadístico	116
RESULTADOS.....	117
I. Desarrollo y caracterización del modelo de cancerización de campo para estudios de BNCT a <i>largo</i> plazo.	118
Breve resumen.....	118
Estado general de los animales	118
Cinética del desarrollo tumoral	118
Análisis histológico y síntesis de ADN.....	121
Conclusión parcial.....	123
II. Estudios de biodistribución y BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>única</i> aplicación de BNCT, utilizando una dosis total absorbida de 4 Gy a tejido con PMD.	124
Breve resumen.....	124
Estudios de biodistribución	124
Estado general de los animales	125
Análisis de radiotoxicidad.....	126
Cinética del desarrollo tumoral	126
Conclusión parcial.....	129
III. Estudios de BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>doble</i> aplicación de BNCT desfasada en el tiempo, con un intervalo de 6 semanas entre irradiaciones, 4 Gy dosis absorbida a tejido con PMD en cada irradiación.	130
Breve resumen.....	130
Estudios de biodistribución	130
Estado general de los animales	131
Análisis de radiotoxicidad.....	132
Cinética del desarrollo tumoral	132
Síntesis de ADN.....	134
Conclusión parcial.....	135
IV. Estudios de biodistribución y BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>doble</i> aplicación de BNCT con un intervalo de 2 semanas entre irradiaciones, 4 Gy a tejido con	

PMD en cada irradiación, versus una <i>única</i> aplicación de BNCT a la misma dosis total absorbida (8 Gy).....	136
Breve resumen.....	136
Estudios de biodistribución	136
Estado general de los animales	137
Análisis de radiotoxicidad.....	139
Cinética del desarrollo tumoral	142
Análisis computacional	145
Conclusión parcial.....	152
V. Estudios de biodistribución y BNCT “piloto” <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>única</i> aplicación de BNCT, dosis total absorbida de 6 Gy a tejido con PMD.	153
Breve resumen.....	153
Estudios de biodistribución	153
Estado general de los animales	154
Análisis de radiotoxicidad.....	154
Cinética del desarrollo tumoral	155
Análisis computacional	157
Conclusión parcial.....	159
VI. Estudios de biodistribución y BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cancerización de campo empleando una <i>doble</i> aplicación de BNCT con un intervalo de 4 semanas entre irradiaciones, 5 Gy dosis absorbida a tejido con PMD en cada irradiación.	160
Breve resumen.....	160
Estudios de biodistribución	160
Estado general de los animales	161
Análisis de radiotoxicidad.....	162
Cinética del desarrollo tumoral	163
Análisis computacional	166
Conclusión parcial.....	172
DISCUSIÓN	173
Breve recapitulación del trabajo realizado.....	174
Discusión de los resultados	177
ANEXO 1 - IMAGENOLÓGÍA DINÁMICA INFRARROJA	191
Breve resumen.....	191
Introducción	191
Objetivo	194
Materiales y Métodos.....	194
Resultados	197
Conclusión	199
ANEXO 2 – RESULTADOS.....	200
ABREVIATURAS	231
REFERENCIAS	233

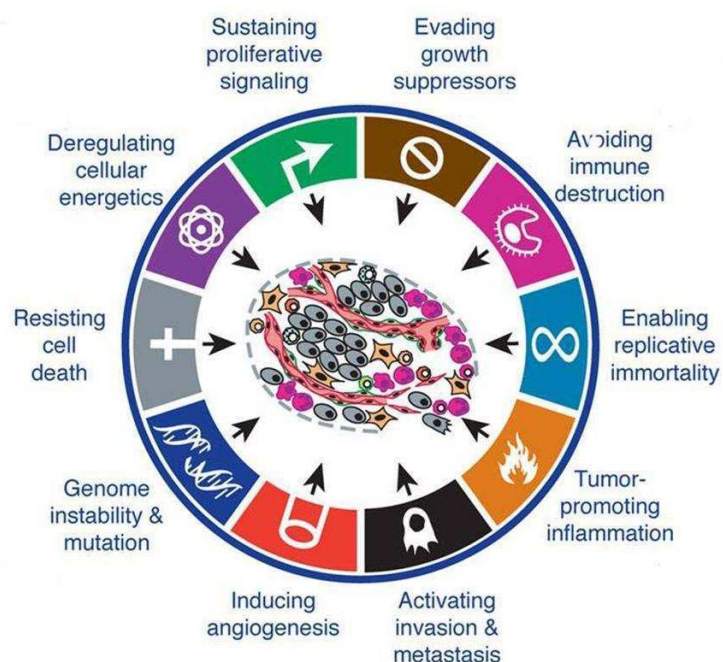
INTRODUCCIÓN

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL CÁNCER Y LAS TERAPIAS ACTUALES

El cáncer es una enfermedad multigénica y multicelular que puede originarse en todos los tipos celulares y órganos con una etiología multifactorial (Baskar et al., 2012). Resulta de una serie de mutaciones ocurridas en genes críticos de las células del cuerpo, como resultado de la exposición a carcinógenos como el tabaco, organismos infecciosos, compuestos químicos, así como de factores internos como mutaciones heredadas, hormonas y el propio estado inmunitario del paciente (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>).

Hanahan y Weinberg, en el año 2000, enumeraron 6 “señas de identidad” del cáncer: células 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 (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 de un microambiente tumoral son elementos cruciales para la adquisición de estas “señas de identidad” (Hanahan y Weinberg, 2011) (Ilustración 1). En particular, el microambiente tumoral es un concepto en evolución que define el comportamiento del cáncer no solo por la genética de las células tumorales sino también por el “milieu” circundante que las células tumorales necesitan para sobrevivir, crecer, proliferar y metastatizar (Weber y Kuo, 2012).

Ilustración 1. “Señas de identidad” del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).



Durante la década pasada existió un avance considerable en el tratamiento y comprensión de estas “señas de identidad”. Junto con avances en la detección temprana y modalidades de tratamiento, varios tipos de cáncer resultan ahora curables (Baskar et al., 2012).

Sin embargo, el cáncer continúa siendo la principal causa de muerte a nivel global. La agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC: International Agency for Research on Cancer) recientemente estimó que 7,6 millones de muertes a nivel mundial son debidas al cáncer con 12,7 millones de nuevos casos por año reportados mundialmente. Una porción significativa de este número (63%) corresponde a países en desarrollo (Baskar et al., 2012).

Es por ello que la investigación orientada hacia nuevas terapias que puedan prevenir y curar el cáncer resulta de gran interés clínico. Existen tratamientos basados en la extirpación quirúrgica combinada con radioterapia convencional y/o quimioterapia. Sin embargo, en general, estas terapias tienen sus 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 denominan “focos de recidiva tumoral”. 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. 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 gastrointestinal (Ruiz Esquide et al., 2011).

Por lo expuesto anteriormente, resulta necesario desarrollar nuevas terapias basadas en la destrucción **selectiva y específica** de las células tumorales preservando las células normales. Se encuentran en desarrollo diversas terapias, principalmente aquellas que son denominadas “binarias”. Se definen de esta manera 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: Boron Neutron Capture Therapy)**.

La Captura Neutrónica en Boro (Boron Neutron Capture Therapy o BNCT) como terapia para tumores constituye una aplicación de la tecnología nuclear al área biomédica, cuyo objetivo es dañar selectivamente el tejido neoplásico. Las dos componentes de esta terapia binaria son la administración de compuestos borados que se acumulan preferencialmente en el tumor y una irradiación externa con neutrones térmicos o epitérmicos (estos últimos se termalizan al penetrar el tejido). Estas dos componentes, el boro y los neutrones térmicos, por separado, son relativamente inocuas para las células normales y pueden ser manipuladas de forma independiente. Sin embargo, cuando se combinan, generan un efecto letal en el tejido tumoral con escaso daño al tejido normal

(Barth et al., 1990). Los ensayos clínicos de la terapia BNCT comenzaron en el año 1951, en EE.UU. (Sweet et al., 1951, Javid et al., 1952, Farr et al., 1954a, 1954b, 1954c), como terapia para tumores de cerebro ya que los gliomas de alto grado y, especialmente, los glioblastomas multiformes (GBM), son extremadamente resistentes a las formas terapéuticas convencionales (Barth et al., 2005). Actualmente, BNCT es una terapia que se encuentra en desarrollo a nivel mundial, utilizada como tratamiento de gliomas de alto grado, metástasis cerebrales, melanoma cutáneo primario, tumores de cabeza y cuello y metástasis hepáticas (Cardoso et al., 2009; Byvaltsev et al., 2012; Kankaanranta et al., 2012).

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA RADIACIÓN

La radiación ionizante es un agente terapéutico utilizado para el tratamiento de tumores malignos. Se denomina *radiación ionizante* dado que origina iones y deposita energía 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). Las radiaciones ionizantes se dividen en corpusculares y electromagnéticas. Las radiaciones corpusculares están representadas por electrones, protones y neutrones; las electromagnéticas por fotones, e incluyen a los rayos X y los rayos gamma. En la práctica clínica, la mayoría de los tratamientos radioterapéuticos son realizados mediante el uso de fotones (Jham y da Silva Freire, 2006).

Las radiaciones ionizantes actúan sobre el material genético de las células (ácido desoxirribonucleico o ADN) llevando a la muerte celular o a la pérdida de su capacidad reproductiva (Jham y da Silva Freire 2006). Los daños al ADN pueden ser doble o simple cadena. Existen dos efectos: (1) Efecto directo de la radiación: daño causado por interacción directa con el ADN; (2) Efecto indirecto sobre el ADN: generación de radicales libres, derivados de la ionización del agua y estabilizados por el oxígeno (Jham y da Silva Freire, 2006; Baskar et al., 2012).

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). Luego, los efectos de la exposición a la radiación dependen del tipo de tejido expuesto. Las células en proliferación, como por ejemplo aquellas del sistema hematopoyético y epitelio intestinal, son las 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 biomoléculas como ARN (ácido ribonucleico) y proteínas. Esto podría explicar también por qué se vería afectada la maquinaria de reparación de daño al ADN (Barth et al., 1990).

La radiación como terapia es un importante componente del tratamiento contra el cáncer. Aproximadamente un 50% de todos los pacientes con cáncer reciben terapia por radiación durante el curso de la enfermedad. La radiación daña tanto a las células normales como a las cancerosas (Baskar et al, 2012). 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 articulado con una necesidad clínica.

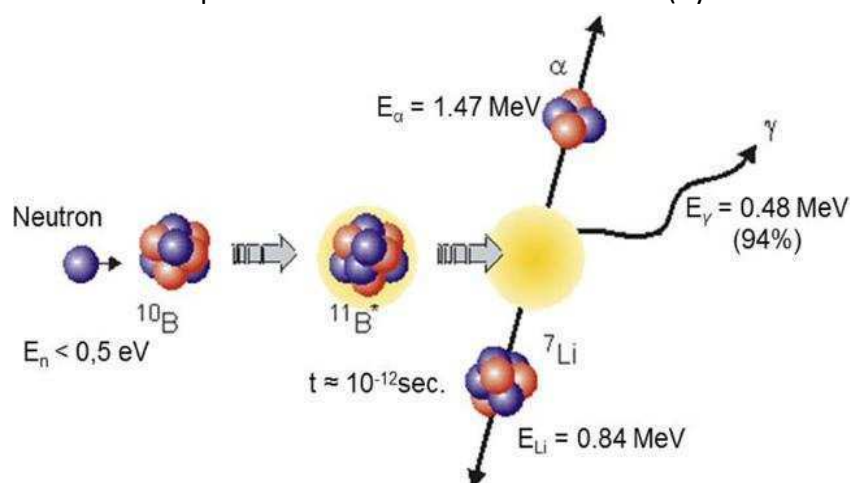
CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT)

La **Captura Neutrónica en Boro (Boron Neutron Capture Therapy o BNCT)** como terapia para tumores constituye una aplicación de la tecnología nuclear al área biomédica, cuyo objetivo es dañar selectivamente el tejido neoplásico. Las dos componentes de esta terapia binaria son la administración de compuestos borados que se acumulan preferencialmente en el tumor y una irradiación externa con neutrones térmicos o epitérmicos (estos últimos se termalizan al atravesar el tejido irradiado). Estas dos componentes, el boro y los neutrones térmicos, por separado, son relativamente inocuas para las células normales y pueden ser manipuladas de forma independiente, pero, cuando son combinadas, generan un efecto letal en el tejido tumoral con escaso daño al tejido normal. A continuación se explica en detalle.

Reacción de captura de neutrones térmicos en ^{10}B

El concepto en el que se basa el BNCT fue publicado, por primera vez, por Gordon Locher en 1936 (Locher, 1936). El isótopo estable del boro, ^{10}B , interactúa con neutrones de baja energía (neutrones térmicos de $<0,5\text{ eV}$) desencadenando una reacción de captura en la que se forma un átomo de ^{11}B que se escinde en 10^{-12} segundos generando una partícula **alfa** (^4He) y un **núcleo de ^7Li** , ambos de alta transferencia lineal de energía (LET) y corto alcance (5 a 10 micrómetros) (Coderre y Morris, 1999) (Ilustración 2). Dado que estas partículas de alto LET recorren un camino corto en el tejido irradiado, los efectos destructivos de estas partículas se encuentran limitados a las células que contengan boro (Barth et al., 2005).

Ilustración 2. Reacción de captura de neutrones térmicos en ^{10}B (Byvaltsev et al., 2012).



La efectividad biológica de la radiación (que puede ser medida, por ejemplo, como la capacidad de producir muerte celular) depende de la transferencia lineal de energía (LET), la dosis total, la tasa de fraccionamiento y radiosensibilidad de las células blanco o tejidos y el efecto biológico considerado (Baskar et al., 2012). El LET es una medida de la densidad de

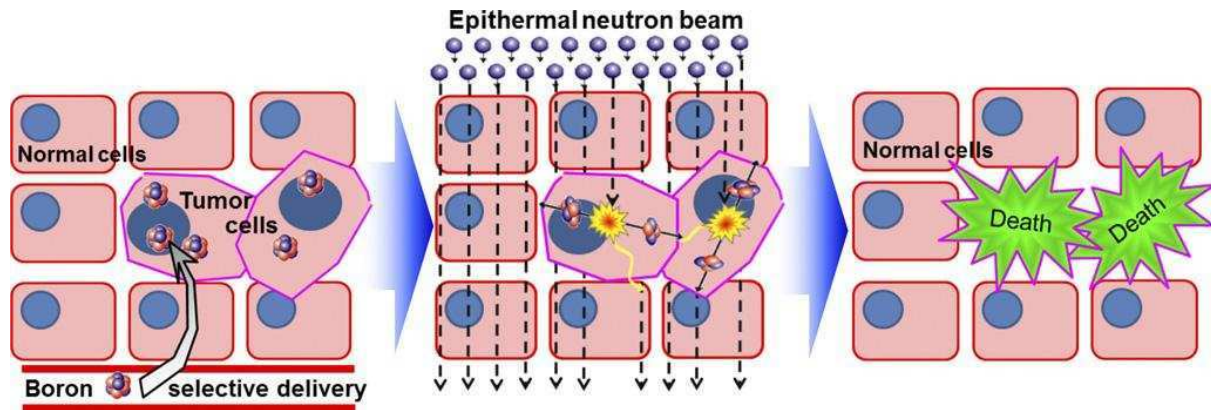
ionizaciones producidas cuando una radiación interactúa con el tejido (Gabel et al., 1984). Cuanto mayor es el LET, mayor es la cantidad de ionizaciones y por lo tanto mayor es el daño. Dentro de este contexto, las partículas de alto LET serán más eficientes en producir daño que la radiación de bajo LET como los rayos X o gamma usados normalmente en radioterapia (Gabel et al., 1984; Baskar et al., 2012). Pueden destruir una amplia variedad de biomoléculas incluyendo ADN, ARN y proteínas (Barth et al., 1990).

La dosis total absorbida en BNCT comprende la dosis boro que afecta preferencialmente al tumor y la dosis de fondo que afecta por igual a tejidos tumorales y normales. Durante la terapia resulta importante conocer el aporte de cada uno de los componentes que van a contribuir a las dosis absorbidas. En el caso de la componente boro, los cálculos dosimétricos se basan en la concentración de boro en tejidos, obtenidos de estudios de biodistribución previos al BNCT y en las propiedades del campo neutrónico. Para esto último, se mide el flujo neutrónico en una posición monitor para determinar el tiempo de irradiación necesario para alcanzar la dosis prescrita.

Concentración de boro en tejido neoplásico y normal

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 $20 \mu\text{g } ^{10}\text{B}/\text{gr}$ de tejido ó $20 \text{ppm } ^{10}\text{B}$) en las células neoplásicas y un número suficiente de neutrones térmicos deben ser absorbidos por los átomos de ^{10}B para desencadenar la reacción letal $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ (Barth et al., 2005). Asimismo, el boro se debe incorporar preferencialmente a tumor. La importancia de que el boro esté confinado específicamente en las células tumorales se debe a que el segundo componente, el haz de neutrones, atraviesa todas las células en el volumen de tratamiento (Ilustración 3). La ventaja de la incorporación selectiva del compuesto borado por las células tumorales es que permite un “targeting biológico” en lugar del “targeting geométrico” de la radioterapia convencional. De ésta manera, no es necesario conocer *a priori* la localización de las células tumorales para llevar a cabo su destrucción y pueden tratarse células tumorales infiltrantes y micrometástasis no identificables en tejido normal (Barth et al., 2005). Además, a diferencia de la radiación ionizante producida por otros radionucleídos, casi nada o nada de la radiación originada en las reacciones de captura entre ^{10}B y un neutrón térmico se deposita en células “bystander” (células no irradiadas), si el boro está concentrado selectivamente en las células tumorales. De esta forma, se reducen los posibles efectos adversos en células normales circundantes (Barth et al., 1990).

Ilustración 3. Reacción de captura de neutrones térmicos en ^{10}B en un tejido. Se muestra la incorporación preferencial de ^{10}B en células tumorales versus normales y la irradiación con neutrones epitérmicos (los cuales se termalizan al penetrar en el tejido) (Byvaltsev et al., 2012).



Por lo expuesto anteriormente, resulta sumamente importante conocer el contenido de boro en los tejidos para realizar los cálculos dosimétricos previos al BNCT. Con este objetivo, se realiza un estudio de biodistribución del boro. El objetivo de los estudios de biodistribución es conocer la concentración de boro en diferentes tejidos y sangre del animal o del paciente, una vez inyectado el compuesto borado, a tiempos predeterminados post inyección. De esta forma se puede identificar el intervalo de tiempo que maximice la concentración absoluta de boro en tumor y la relación de concentración de boro en tumor versus tejido normal y tumor versus sangre. Este intervalo de tiempo se seleccionará para realizar la irradiación con neutrones.

Primera componente del BNCT: Compuestos transportadores de boro

El concepto de NCT (Neutron Capture Therapy) se basa en la observación de que ciertos nucleídos -radioactivos y no radioactivos- poseen una capacidad inusual de absorber neutrones térmicos (Locher, 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 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 fisión generados en la reacción de captura y las propiedades de los compuestos potencialmente portadores de dicho nucleído.

Entre los nucleídos mencionados, el ^{10}B sería el más ventajoso para NCT:

(a) Es no radiactivo, no tóxico y está fácilmente disponible, constituyendo aproximadamente el 20% del boro en la naturaleza;

(b) Las partículas emitidas por la reacción de captura [$^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$] son mayoritariamente de alto LET;

(c) El alcance de las partículas de alto LET es de aproximadamente el diámetro de una célula, teóricamente limitando el efecto de radiación a aquellas células que incorporaron suficiente cantidad de ^{10}B . Si se logra la incorporación preferencial del compuesto borado al tumor la terapia dañará selectivamente las células tumorales, preservando las normales;

(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 con heteroátomos que pueden ser muy estables.

Aunque la sección eficaz de captura neutrónica de los elementos en tejido normal (H, Na, K, Mg, Ca, C, N, P, O, S, Cl, Fe) es varios órdenes de magnitud menor que la del boro, dos de ellos, el hidrógeno y nitrógeno, se encuentran presentes en altas concentraciones en los tejidos, tal que la captura de los neutrones por ellos contribuye significativamente a la dosis de radiación total absorbida. Para poder reducir este efecto, es esencial que el tumor tenga altas concentraciones de ^{10}B para que la fluencia neutrónica ($n\cdot\text{cm}^{-2}$) pueda ser mantenida en un mínimo, maximizando la reacción de $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ y minimizando la reacción de n,p con nitrógeno [$^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$] y la reacción n, γ con hidrógeno [$^1\text{H}(n, \gamma)^2\text{H}$].

En cuanto al compuesto que transportará el boro, para que el BNCT sea potencialmente exitoso, se deben cumplir las siguientes premisas:

- Presentar baja toxicidad sistémica, de modo que la dosis administrada sea bien tolerada por animales y, eventualmente, pacientes (Barth et al., 2005).
- El compuesto debe ser un portador eficiente y estable de átomos de boro. Que sea eficiente se refiere a que pueda “portar” y “entregar” muchos átomos de boro. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales borados son muy específicos pero poco eficientes ya que pueden “cargar” muy pocos átomos de boro (Barth et al., 1990). Respecto a la estabilidad, el compuesto en sí podría ser específico para el tumor pero si es inestable cedería boro a todos aquellos tejidos por los cuales circule.
- La cantidad absoluta de átomos de boro incorporada al tumor debe ser suficiente para dar lugar a la cantidad necesaria de reacciones de captura con neutrones térmicos para producir un daño importante al tumor (se considera necesaria la incorporación en tumor de aproximadamente 10^9 átomos de ^{10}B /célula ó $20\ \mu\text{g}\ ^{10}\text{B}/\text{g}$ ó $20\ \text{ppm}\ ^{10}\text{B}$) (Barth et al., 2005). Estos valores son orientativos y dependerán, entre otros factores, de la eficacia biológica de cada compuesto borado (que, por ejemplo, depende de su localización intracelular) y de las patologías a tratar.

- La incorporación de compuesto borado al tumor debe ser selectiva para lograr dañar el tejido tumoral minimizando el efecto en tejido normal. Se describe clásicamente que la relación tumor/tejido normal y tumor/sangre debería ser idealmente mayor o igual a 3:1 (Barth et al., 2005). Esta relación también es aproximada, ya que también depende, entre otros factores, de la eficacia biológica de cada compuesto borado y de las patologías a tratar.
- La microlocalización del compuesto borado debe favorecer el daño a los blancos subcelulares tumorales más radiosensibles: el mayor efecto letal se lograría si la partícula de alto LET producida impactara en el núcleo de la célula, particularmente en el ADN. Por lo tanto, es deseable que los compuestos de boro se acumulen dentro o cerca del núcleo. Se ha estimado que la concentración de boro celular necesaria podría ser reducida en un factor entre 2 y 5 si el compuesto de boro se localizara en o cerca del núcleo (Kobayashi et al., 1982; Gabel et al., 1987; Hartman et al., 1994). Otros potenciales blancos subcelulares son la mitocondria, lisosomas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Barth et al., 2005).
- Un clearance rápido de la sangre y tejidos normales y alta persistencia en tumor durante BNCT (Barth et al., 2005).

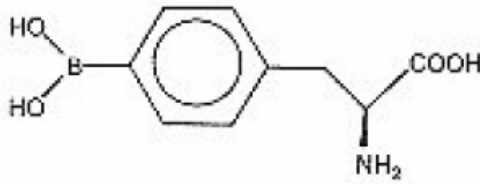
A pesar de los esfuerzos constantes para sintetizar nuevos compuestos borados, todavía no existe un único compuesto que cumpla con todos estos requisitos (Barth et al., 2005). Hasta el presente, pocos compuestos de boro han sido aceptados para su uso en tratamientos clínicos. Solo tres compuestos han sido aprobados hasta la fecha, en diferentes países, para su uso en pacientes: borofenilalanina (BPA), decahidrodecaborato de sodio (GB-10) y mercaptoundecaidro-closo-dodecaborato o borocaptato de sodio (BSH).

Compuestos borados aprobados para su uso en la clínica: BPA, GB-10, BSH

1) BPA (borofenilalanina)

El **BPA** (borofenilalanina) (Ilustración 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, hámsters, ratas y conejos (Taniyama et al., 1989; Coderre et al., 1990; Kreimann et al., 2001a; Kulvik et al., 2003). Tampoco se observó toxicidad asociada a la administración de BPA en humanos (Capala et al 2003; Liberman et al 2004; Wittig et al 2008a).

Ilustración 4. Estructura química del BPA.



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 colorectales siguen apoyando la utilización del BPA como compuesto borado para futuros ensayos clínicos (Cardoso et al., 2009). En cuanto a ensayos preclínicos, nuestro grupo demostró el potencial terapéutico del BPA en tumores de cabeza y cuello, en un ensayo preclínico en felinos domésticos (Rao et al., 2004; Trivillin et al., 2008).

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 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., 2012). Nuestro grupo ensayó su potencial en metástasis de colon en hígado (Pozzi et al., 2012) y evaluó diversos protocolos de BNCT y su radiotoxicidad asociada en tumores de la cavidad bucal en hámsters (por ejemplo, Kreimann et al., 2001b; Trivillin et al., 2006; Pozzi et al., 2009; 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 debido a 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 y diferenciación y nivel de oxigenación (Ono et al., 1996; Coderre et al., 1998; 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, conllevan una variabilidad de respuesta de los tumores al tratamiento.

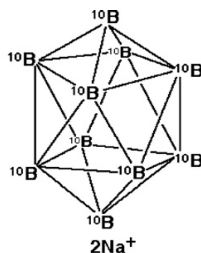
Actualmente, se encuentran en estudio, diferentes procedimientos orientados a potenciar la incorporación de BPA en las células malignas. Tal es el caso de la “precarga” con moléculas estructuralmente análogas al BPA como el L-DOPA y L-tirosina. Por ejemplo, el grupo de Capuani (2008) demostró que la 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).

Respecto de su microlocalización, 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).

2) GB-10 (decahidrodecaborato de sodio)

El **GB-10** (decahidrodecaborato de sodio, $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) es un compuesto borado difusivo, que en solución acuosa forma el anión $(\text{B}_{10}\text{H}_{10})^{2-}$ (Laramore et al., 2001) (Ilustración 5).

Ilustración 5. Estructura química del GB-10.



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 en sí (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 falta de toxicidad y su potencial terapéutico en tumores de la mucosa bucal en hámsters, un tejido no protegido por la BHE (por ejemplo, Heber et al., 2004, 2006; Trivillin et al., 2004, 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 propone un nuevo paradigma para BNCT ya que, a pesar de no observarse incorporación selectiva de GB-10 en tejido tumoral, el BNCT resultó terapéuticamente efectivo, causando daño a tumor pero preservando el tejido normal. Demostramos, a nivel histológico, que el control tumoral selectivo por el BNCT mediado por GB-10 se debe al daño selectivo en los vasos sanguíneos tumorales aberrantes, versus los vasos en tejido normal. Esta mayor radiosensibilidad de los vasos tumorales podría deberse a su estructura y función anormal (Trivillin et al., 2006).

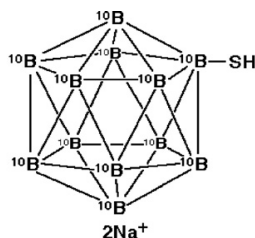
Otros estudios de biodistribución de GB-10 realizados por nuestro grupo demostraron también su posible utilización en un modelo de metástasis hepáticas en ratas (Garabalino et al., 2011), sin toxicidad asociada.

A su vez, Masunaga et al. (2006) intentaron mejorar su selectividad mediante su transporte en liposomas.

3) BSH (sodio mercaptoundecahidro-closo-dodecaborato)

El BSH (sodio mercaptoundecahidro-closo-dodecaborato, $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) (Ilustración 6) primeramente se asoció al tratamiento del glioblastoma multiforme (Nakagawa et al., 2009). 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).

Ilustración 6. Estructura química del BSH.



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 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 en glioblastoma multiforme, se intenta 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 realizan 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). Nuestro grupo actualmente realiza estudios de toxicidad, biodistribución y potencial utilidad terapéutica en tumores de la cavidad bucal en hámsters.

Desarrollo de nuevos compuestos borados

Dado que aún no se dispone de un compuesto borado “óptimo”, la comunidad internacional continúa realizando estudios para desarrollar nuevos compuestos borados que cumplan con los requisitos de alta selectividad, incorporación, y permanencia en tumor y baja toxicidad *in vitro* e *in vivo*. Estos nuevos compuestos borados se basan en diferentes estrategias que permitan incorporar mayores cantidades de boro en las células malignas a tratar.

Ejemplos de los diversos estudios orientados a la síntesis de nuevos compuestos y de la utilización de estos nuevos compuestos en experimentos *in vitro* e *in vivo* 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 (ensayos realizados en nuestro grupo: Heber et al., 2012); 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).

Se debe destacar que los protocolos de administración influyen centralmente sobre la eficacia de los compuestos borados empleados en BNCT. En ese sentido se realizan múltiples esfuerzos para explorar nuevos protocolos de administración de los compuestos borados ya autorizados para su uso en pacientes, como por ejemplo la electroporación (Ono et al., 2000) y precarga con análogos estructurales (Capuani et al., 2008). Esto mejoraría la terapia mientras se continúan los estudios de búsqueda de aquel compuesto borado “óptimo”.

Segunda componente del BNCT: Neutrones térmicos

En la actualidad, los haces de neutrones disponibles no son monoenergéticos y contienen una mezcla de radiaciones: neutrones térmicos, epitérmicos, rápidos y rayos

gamma. Los dos últimos contribuyen a la dosis de radiación de forma no selectiva por lo cual deberían ser minimizados. Cabe recalcar que la reacción de captura en ^{10}B se produce con alta probabilidad con neutrones térmicos y, en menor medida, con neutrones epitérmicos. Pero, dado que los neutrones epitérmicos se termalizan (disminuyen su energía) a medida que penetran en el tejido (alcanzan un pico térmico a 3-6 cm de profundidad), pueden emplearse para tratar tumores en profundidad.

Los neutrones térmicos por sí mismos no producen daño significativo en la célula tumoral o en el tejido normal dado que su energía es insuficiente para ionizar los componentes del tejido. Poseen una energía de aproximadamente 0,025 eV la cual se encuentra muy por debajo del valor para la interacción elástica entre los neutrones y los átomos de hidrógeno que están presentes tanto en el tejido tumoral como en el normal. Solo cuando los neutrones térmicos se combinan con el ^{10}B , se produce una dosis de radiación que sí puede provocar daño celular significativo. Los neutrones térmicos no son capaces de alcanzar gran profundidad en los tejidos. A los 2,5 cm el flujo incidente se reduce al 50% (Sweet et al., 1960). Dichos neutrones, entonces, son útiles si la terapia del BNCT se aplica a lesiones superficiales o poco profundas.

El flujo de neutrones necesario para la terapia de BNCT es del orden de $10^9 \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Hasta la fecha, esta fluencia solo ha sido generada a partir de reactores nucleares por un proceso de fisión. Actualmente, se encuentran en desarrollo aceleradores de partículas de baja energía capaces de generar neutrones para BNCT, que podrían ser instalados en hospitales (Kreiner et al., 2011).

Actualmente, los países que presentan reactores nucleares de investigación disponibles para su utilización en BNCT, tanto de experimentación como para uso en ensayos clínicos, son: Argentina (RA-3; RA-6), Japón (KUR), Finlandia (FIR-1), Italia [TRIGA LENA (IT-005)], Alemania [TRIGA Mainz (FMRZ)] y Taiwan [Tsing-Hua University (THOR)]. En cuanto a los reactores nucleares en Argentina, en el año 2009, se construyó en el reactor RA-3 una facilidad para poder realizar irradiaciones de animales y tratamiento *ex situ* de metástasis en hígado (Miller et al., 2009). En relación al reactor RA-6, estuvo detenido dado que se realizó la reconversión de su núcleo para operar con bajo enriquecimiento de uranio. Actualmente se encuentra en proceso de licenciamiento para continuar los estudios de BNCT a nivel clínico y experimental.

En cuanto a la tecnología de aceleradores para BNCT ya ha llegado a un nivel de desarrollo que permitiría su implementación. Actualmente, los países que se encuentran involucrados en el desarrollo de aceleradores son: Argentina (Kreiner et al., 2011), Inglaterra (Green 1998), Italia (Ceballos et al., 2010), Israel (Halfon et al., 2010), Rusia (Aleynik et al., 2010; Kononov et al., 2010) y Japón (Kumada et al., 2011; Mitsumoto et al., 2010).

Radiobiología del BNCT

La Terapia por Captura Neutrónica en Boro produce una combinación de componentes de dosis de radiación en los tejidos. Entre esos componentes existen partículas de alto LET, ^7Li y partículas alfa, protones y neutrones, y radiación de bajo LET como los

rayos gamma. A igual dosis absorbida de radiación, las partículas de alto LET producen más daño en los tejidos que las de bajo LET pues son capaces de depositar mayor cantidad de energía en la misma unidad de volumen (Coderre y Morris, 1999).

Las componentes de dosis de la terapia BNCT en los tejidos son:

COMPONENTE BORO

1. Partículas alfa de 1,47 MeV, rango 9 μm , LET: 196 keV/ μm generadas por la reacción de captura del neutrón térmico en el ^{10}B .
2. Partículas de ^7Li de 0,84 MeV, rango 5 μm , LET: 162 keV/ μm generadas por la reacción de captura del neutrón térmico en el ^{10}B .
3. Rayos gamma de 0,48 MeV (en el 94% de las reacciones).

COMPONENTE "RADIACIÓN DE FONDO" (radiación inespecífica)

4. Rayos gamma (2,2 MeV de energía) producidos por la captura de neutrones térmicos en el hidrógeno presente en los tejidos en la reacción $^1\text{H}(n, \gamma) ^2\text{H}$.
5. Protones de alto LET (590 keV) producidos por la captura de los neutrones térmicos en nitrógeno, en la reacción $^{14}\text{N}(n, p) ^{14}\text{C}$.
6. Protones "recoil" o de retroceso (de energía cinética mayor que 10 keV) generados por la colisión de neutrones rápidos del haz epitérmico con los núcleos de hidrógeno de los tejidos en la reacción $^1\text{H}(n, n') p$.
7. Componente gamma del haz de neutrones.

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

La dosis entregada a los tejidos durante el BNCT consiste en los productos de la reacción $^{10}\text{B}(n, \alpha) ^7\text{Li}$ sumada a una concomitante e inevitable radiación inespecífica (rayos gamma, protones "recoil" resultantes de la interacción elástica con el hidrógeno y los protones de alto LET resultantes de la captura en nitrógeno) que está relacionada directamente con la duración de la exposición en el reactor, y es independiente de la concentración de boro en los tejidos. Debido a estas contaminaciones (principalmente neutrones rápidos), la dosis en el tumor y en tejido normal no aumenta directamente con la concentración de boro. Es por ello que, para maximizar la ganancia terapéutica, a iguales relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre, será más ventajoso tener mayores cantidades absolutas de ^{10}B en el tumor. Esto se debe a que un mayor contenido de boro en tumor permite disminuir el tiempo de exposición al haz de neutrones, reduciendo así la dosis inespecífica a los tejidos normales para una misma dosis a tumor (Coderre y Morris, 1999).

La proporción de dichas componentes de dosis difiere considerablemente entre los distintos haces de neutrones utilizados en BNCT. Por esta razón, si solo se expresa la dosis de

un experimento como dosis total absorbida, esta misma dosis en dos centros diferentes tendría distinta implicancia biológica. Por lo tanto, se hace necesario especificar cada uno de los componentes de la dosis por separado ya que el efecto biológico para una misma dosis, dependerá del aporte proporcional de cada componente.

Para el cálculo de la *dosis total absorbida*, simplemente se suman las dosis (expresadas en Grays –Gy-) de cada una de las componentes. Los valores deseados de dosis absorbida mínima en tumor y de dosis absorbida máxima en tejido normal nos permiten calcular el tiempo de irradiación al que expondremos el volumen de tratamiento. Pero si, además, queremos conocer la dosis teniendo en cuenta la eficacia biológica relativa, se calcula lo que llamaremos *dosis equivalente*. Se expresa en unidades equivalentes de fotones o Gray equivalente (Gy-Eq) y se calcula multiplicando la dosis absorbida en Gray de cada una de las componentes de dosis por un factor *-Efectividad Biológica Relativa o RBE-* que se determina en forma experimental. Esto permite aplicar un factor de corrección a la dosis de acuerdo a su efectividad biológica. El resultado de la suma de todos los componentes de la radiación (medidos en Gray), multiplicados por el factor (RBE) correspondiente, es la *dosis total equivalente*. El RBE puede variar entre distintos tejidos como el cerebro, tumor y piel de acuerdo a la composición de cada uno de ellos y a su radiosensibilidad. Asimismo, el RBE puede variar según el parámetro empleado para evaluar el efecto biológico. Usualmente, se define como la relación de dosis de una radiación de referencia (generalmente rayos X) con una radiación a ser testada, que producen el mismo efecto biológico en un sistema dado. Medidos de esta forma, los RBEs son solo función de la calidad (LET) de la radiación testada.

Las dosis expresadas de esta manera permiten:

- 1) Comparar los efectos del BNCT en distintos animales ó modelos biológicos para los cuales se conocen los efectos de la irradiación con fotones.
- 2) Tomar las variables biológicas o parámetros que describen la respuesta a la radiación por fotones y utilizar esta información para los protocolos de escalamiento de dosis en los ensayos clínicos de BNCT.

Las presunciones sobre las cuales se basan estos estudios dosis-efecto son solo un instrumento que permite la comparación del efecto de distintas terapias. Si las dosis se calculan empleando valores de RBE que corresponden a fuentes de neutrones o tejidos distintos a los que se encuentran en estudio se corre el riesgo de sobrestimar o subestimar las dosis.

Para el RBE de la componente de la reacción de captura en boro $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$, se considera como el factor de efectividad biológica de un compuesto dado el *CBE (Compound Biological Efficacy)*. En este sentido, el efecto biológico para un dado compuesto borado dependería de variaciones en su microdistribución dentro de la célula y en la distribución en los diferentes tejidos. La forma de administración del compuesto borado, el patrón de distribución dentro de la célula, la dosis por fracción, y el tamaño del núcleo en la población celular pueden influir sobre la determinación experimental del factor CBE.

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

- 1) Para cada tejido, definir una variable biológica o parámetro cuantificable o “parámetro que permita evaluar la respuesta a la radiación” y determinar el nivel de respuesta que se usará, por ejemplo 1/ de sobrevida.
- 2) Determinar la dosis necesaria para alcanzar la respuesta pre-establecida (por ejemplo 1/ de sobrevida) para una radiación de referencia.
- 3) Determinar la dosis necesaria para alcanzar la respuesta pre-establecida para el haz de neutrones solamente.
- 4) Determinar la dosis necesaria para alcanzar la respuesta pre-establecida para el haz de neutrones en presencia del compuesto de boro.

Una vez determinadas estas relaciones de dosis y respuesta, es posible estimar para las condiciones experimentales establecidas:

- 1) El RBE del haz de neutrones,
- 2) El RBE de los componentes de alto LET del haz (dosis por captura en nitrógeno de neutrones térmicos + dosis de protones “recoil” generados por la interacción elástica del hidrógeno con los neutrones rápidos),
- 3) El CBE para un compuesto borado en particular (Coderre y Morris, 1999).

HISTORIA CLÍNICA DEL BNCT A NIVEL MUNDIAL

Glioblastoma multiforme marcando el comienzo del BNCT

El tratamiento estándar de los tumores malignos de cerebro consiste en cirugía seguida por radioterapia o temozolomida asociada a radioterapia o post radioterapia. A pesar de la existencia de estas estrategias para combatirlos, la gran mayoría de estos tumores recidivan, con un tiempo medio de supervivencia de meses o años luego de la recidiva (Kankaanranta et al., 2011).

Aunque el potencial clínico de BNCT fue reconocido en los años 1930, recién en el año 1950 se realizó el primer ensayo clínico con 17 pacientes con glioblastoma multiforme, iniciado por Dr. Farr en el “Brookhaven National Laboratory” (BNL) y por Dr. Sweet y Brownell en el “Massachusetts General Hospital” utilizando el reactor del “Massachusetts Institute of Technology” (MIT). Los resultados de estos ensayos fueron desalentadores, culminando por ende en el año 1961. Los analizó el Dr. Slatkin, quien atribuyó estos resultados negativos a una inadecuada selectividad de incorporación a tumor de los compuestos químicos borados inorgánicos que fueron utilizados como agentes capturadores (bórax y pentaborato de sodio); insuficiente penetración de los haces de neutrones térmicos en el tejido; y altas concentraciones de boro en sangre que resultaron en un excesivo daño a la vasculatura del cerebro normal y cuero cabelludo (Barth et al., 2005).

Los ensayos clínicos fueron reanudados 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, desarrollado por el Dr. Soloway (en el Massachusetts General Hospital de EE.UU.). El procedimiento se llevó a cabo en más de 150 pacientes. La primera etapa consistió en una cirugía citorrreductora para reducir la masa tumoral seguido de un período de recuperación. Luego se administró BSH mediante una infusión lenta. Primeramente, se administró vía intra-arterial cambiando posteriormente a la vía intravenosa. Luego de la infusión, se realizó la irradiación con neutrones térmicos en uno u otro de los diferentes reactores nucleares en Japón. Los resultados fueron alentadores, obteniéndose un índice de supervivencia a 5 años de un 58% de los pacientes portadores de glioma grado 3-4, con el tumor localizado a menos de 6 cm de profundidad. Dado que los neutrones térmicos presentan una profundidad de penetración limitada en tejido, se removió la piel y la calota para realizar una irradiación intraoperatoria, eliminando el daño por radiación en cuero cabelludo y permitiendo el tratamiento de tumores residuales ubicados a mayores profundidades (Barth et al., 2005).

Estos protocolos de exposición directa a la irradiación difieren de los protocolos de BNCT empleados en EE.UU. (reanudados en 1994) y Europa, donde se utilizaron haces de neutrones epitérmicos que presentan mayor penetración y permiten irradiar sin exponer el cerebro. Más allá que resulta ventajoso evitar la irradiación intraoperatoria, este cambio en el procedimiento dificultó la comparación de resultados. Además, los estudios realizados en Japón no se encuadraron dentro de protocolos científicos estrictamente diseñados. Los ensayos clínicos en Japón se orientaron a brindar la mejor opción terapéutica a cada

paciente, independientemente de un protocolo científico pre-establecido. Por lo tanto, no fue posible sacar conclusiones definitivas respecto de la eficacia del tratamiento en estos pacientes (Barth et al., 2005). Más recientemente, la instalación de haces epitérmicos en Japón permitió la realización de irradiaciones externas. Asimismo, los ensayos clínicos ahora se encuadran dentro de los protocolos científicos aceptados internacionalmente.

En el año 1994, tal como se dijo anteriormente, varios ensayos clínicos se reiniciaron en los Estados Unidos y Europa. Estos estudios, tal como se explicó, marcaron la transición entre la irradiación con haces de neutrones térmicos de baja energía y el uso de haces de mayor energía (epitérmicos), mejorando las propiedades de penetración. En la Tabla 1 se resumen los ensayos clínicos con pacientes con tumores cerebrales de 1994 a 2005: en BMRR (Brookhaven Medical Research Reactor) en BNL (1994 a 1999) para glioblastoma multiforme utilizando BPA con una o dos irradiaciones dadas en días consecutivos; en el reactor del MIT (1996 a 1999) para glioblastoma multiforme (también melanoma intracerebral); en el reactor de alto flujo, Petten, Países Bajos, y la Universidad de Essen en Alemania en 1997 utilizando BSH; en el FiR1 en el Hospital Central Universitario de Helsinki de 1999 a 2005; en la facilidad del reactor de Studsvik en Suecia desde 2001 a 2005; y en el reactor del Instituto de Investigación Nuclear en Rez, República Checa, utilizando BSH (Barth et al., 2005).

Tabla 1. Ensayos clínicos en Estados Unidos y Europa, de 1994 a 2005, con pacientes con tumores cerebrales (Barth et al., 2005).

Facilidad	Nº pacientes	Duración de la administración	Droga	Dosis (mg/kg)
Reactor de alto flujo, Petten, Países Bajos	26 (1997-2005)	100 mg/kg/min	BSH	100
LVR-15, Rez, Rep. Checa	5 (2001-2005)	1h	BSH	100
BMRR, Brookhaven, EE.UU.	53 (1994-1999)	2hs	BPA	250-330
MITR-II, M67 MIT, EE.UU.	20 (1996-1999)	1-1,5hs	BPA	250-350
MITR-II, FCB MIT, EE.UU.	6 (2001-2005)	1,5hs	BPA	350
Studsvik AB, Suecia	30 (2001-2005)	6hs	BPA	900
FiR1, Helsinki, Finlandia	18 (2001-2005)	2hs	BPA	290-400
FiR1, Helsinki, Finlandia	3 (2001-2005)	2hs	BPA	290

En cuanto a los ensayos en BNL y Harvard/MIT completados en 1999, estos arrojaron una vida media y sobrevida de un año, comparable a la terapia convencional por fotones externos. Aunque fueron primeramente ensayos fase I para evaluar la seguridad del

escalado de dosis (evaluación de toxicidad por radiación), también se evaluaron variables secundarias como la calidad de vida y tiempo de progresión y supervivencia. Los tiempos medios de supervivencia para 53 pacientes del ensayo de BNL y 18 pacientes con glioblastoma multiforme de Harvard/MIT fueron 13 y 12 meses, respectivamente. La calidad de vida para la mayoría de los pacientes de BNL fue muy buena, especialmente considerando que el tratamiento fue efectuado en 1 o 2 días consecutivos (Barth et al., 2005).

El grupo clínico del Hospital Central Universitario de Helsinki y Centro Técnico y de Investigaciones de Finlandia (VTT) reportaron 18 pacientes utilizando BPA (290 mg/kg infundidos en 2hs) con dos campos de irradiación y una dosis promedio al cerebro total en el rango de 3 a 6 Gy-Eq. El porcentaje estimado de supervivencia a un año fue 61%, muy similar al valor obtenido en BNL (EE.UU.) (Barth et al., 2005). En la actualidad, este grupo continúa realizando estos estudios clínicos en este tipo de tumores, escalando las dosis de BPA hasta 450 mg/kg (Kankaanranta et al., 2011).

En Suecia, se realizaron ensayos con BPA utilizando el haz epitérmico del reactor AB de Studsvik para uso médico, con una concentración de BPA mucho más elevada que los ensayos descritos en el párrafo anterior: 900 mg/kg infundida durante 6hs. En cuanto al aumento del tiempo de infusión, este abordaje se basó en estudios preclínicos: (a) ensayos *in vitro* demostraron que se necesitan varias horas para cargar las células con BPA; (b) infusiones i.v. prolongadas de BPA aumentan la concentración absoluta de boro en tumor en el modelo de gliosarcoma 9L en ratas, manteniendo la relación tumor/sangre constante; (c) infusiones i.v. prolongadas de BPA mejorarían la incorporación de boro en células infiltrantes que se encuentran distantes del tumor primario en el modelo de gliosarcoma 9L en ratas. Al ensayar esta infusión prolongada en pacientes, esta fue bien tolerada y la supervivencia media preliminar para los 17 pacientes que integraron este ensayo fue de 18 meses, tiempo significativamente mayor al obtenido en los ensayos realizados en BNL o Harvard/MIT. Todos los pacientes fueron tratados en dos campos, y la dosis promedio a cerebro fue de 3 a 6 Gy-Eq, dosis menores a las utilizadas en los ensayos de BNL, con una dosis pico en cerebro normal menor a 15 Gy-Eq, similar a la utilizada en BNL. Como los pacientes suecos con glioblastoma multiforme que presentaron recidivas no fueron sujetos a otras terapias paliativas, los datos de supervivencia no fueron influenciados por tratamientos subsecuentes (a diferencia de los pacientes de BNL y MIT), representando más precisamente los efectos verdaderos de la terapia de BNCT en el tumor. La corroboración de una mejora en el tiempo de supervivencia media representa un avance significativo, ya que el BNCT no solo brindaría una mayor supervivencia sino también una mejor calidad de vida, dado que BNCT implica una única aplicación (a diferencia de los tratamientos oncológicos convencionales) (Barth et al., 2005).

En el año 2008, nuevamente el grupo de Suecia, publicó nuevos resultados utilizando esta infusión prolongada de 900 mg/kg de BPA (Henriksson et al., 2008): la dosis promedio a cerebro fue 3,2-6,1 Gy-Eq y la dosis mínima a tumor tuvo un rango de 15,4 a 54,3 Gy-Eq. Sin embargo, a pesar que la eficacia del BNCT resulta comparable con la radioterapia convencional, se observaron importantes efectos colaterales que deben ser re-evaluados.

Aplicaciones del BNCT a otros tipos de cáncer

MELANOMAS CUTÁNEOS

El melanoma es una enfermedad agresiva que frecuentemente incluye metástasis distantes y locoregionales, generalmente, sin opción de terapias efectivas. En las etapas iniciales de la enfermedad, la cirugía presenta un pronóstico favorable. Pero, para los estados más avanzados, a pesar de la cirugía, radioterapia o tratamientos sistémicos, el pronóstico resulta muy pobre. Además, en cuanto a la radioterapia, la tolerancia de la piel limita la prescripción de la dosis a entregar. En este contexto, el BNCT resulta una terapia atractiva ya que se permite entregar mayores dosis a tumor, reduciendo la dosis a tejido normal, dada la diferencia en incorporación de boro en células tumorales versus normales (Menendez et al., 2009).

El segundo grupo con más pacientes tratados con BNCT fueron aquellos con melanomas cutáneos. Los estudios de Mishima (por ejemplo Mishima et al., 1989) claramente estimularon el interés clínico del BPA como agente borado. El uso del BPA se basó en la premisa que las células neoplásicas, que activamente sintetizan melanina, captarían y acumularían selectivamente este compuesto (el BPA es un análogo de la tirosina, que a su vez, es sustrato para la síntesis de melanina). Estudios posteriores demostraron que otros tipos de células malignas también captan preferentemente grandes cantidades de BPA comparado con células normales (Barth et al., 2005).

En 1985, Mishima trató el primer paciente, el cual presentaba un nódulo metastásico subcutáneo inoperable por su localización (Mishima et al., 1989). Fue tratado con BPA e irradiado con un haz de neutrones térmicos, notándose una marcada regresión luego de 2 meses, desapareciendo completamente para los 9 meses post tratamiento. Este resultado apoyó la utilización del BNCT en tumores radioresistentes. Subsecuentemente, al menos 18 pacientes adicionales con melanoma primario o metastásico fueron tratados por Mishima et al. En todos los pacientes existió un control local del nódulo de melanoma primario y metastásico y varios pacientes estaban libres de tumor a los 4 años o más, post BNCT (Mishima 1997).

En cuanto a la vía de administración del BPA, se inyectaba peritumoral o se administraba por vía oral hasta que Yoshino et al. mejoraron su solubilidad en agua mediante la formación de un complejo con fructosa, permitiendo la administración i.v.. Este importante avance se extendió a los ensayos clínicos en pacientes con tumores cerebrales detallados en la sección anterior (Barth et al., 2005).

Varios pacientes con metástasis cerebrales o cutáneas de melanoma fueron tratados por Busse et al. utilizando el complejo BPA-fructosa. El ejemplo más notorio fue un paciente con metástasis irresecables en cerebro, que recibió una dosis de 24 Gy-Eq a tumor y mostró una remisión completa durante un intervalo de 4 meses. Un segundo paciente con metástasis en cerebro mostró una respuesta parcial (Barth et al., 2005).

En el año 2003, Fukuda et al., en Japón, publicaron sus estudios realizados en 22 pacientes con melanoma maligno tratados con BNCT, mediado por BPA. Las dosis absorbidas en piel fueron de 15,7 a 37,1 Gy-Eq y en tumor de 15,7 a 68,5 Gy-Eq. El porcentaje de

respuesta completa al tratamiento fue del 73/ , con efectos radiotóxicos tolerables en la mayoría de los pacientes (Fukuda et al., 2003).

En nuestro país, también se trataron pacientes con melanoma cutáneo (Gonzalez et al., 2004a; Menéndez et al., 2009). Para tal fin, se desarrolló una facilidad para BNCT en el reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche, de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). Se trata de un haz de neutrones epitérmico termalizado, el cual es potencialmente apto para el tratamiento de melanomas en extremidades con cierta profundidad (Blaumann et al., 2004). Desde 2003 hasta 2007, siete pacientes con melanoma cutáneo de las extremidades fueron tratados en 10 campos como parte de un ensayo clínico de BNCT fase I/II conducido por la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) y el Centro Médico del Instituto Angel H. Roffo, Argentina. Este protocolo fue diseñado para evaluar la eficacia y potencial toxicidad del BNCT para melanoma cutáneo en extremidades (Gonzalez et al., 2004a). Los pacientes incluidos en este tratamiento no podían ser tratados quirúrgicamente ya sea por la cantidad de nódulos o por la ubicación de los mismos. En el momento de la aplicación del BNCT, los pacientes no estaban recibiendo un tratamiento sistémico así como tampoco un tratamiento local en la zona a tratar. Los pacientes recibieron una infusión de BPA 350 mg/kg y la máxima dosis prescrita a tejido normal fue de 16,5 a 24 Gy-Eq. La dosis administrada a tejido normal varió entre 15,8 y 27,5 Gy-Eq. En todos los pacientes se observó una disminución del volumen de los nódulos tratados o desaparición de los mismos, con alteraciones radiotóxicas leves a moderadas reversibles en el tejido normal (Menendez et al., 2009). A su vez, también en nuestro país, diferentes estudios relacionados al tratamiento del melanoma en humanos se encuentran en desarrollo: estudios computacionales para el estudio de dosis a tumor y sus posibles efectos radiotóxicos post BNCT en tejido normal (Gossio et al., 2009); estudios de imagenología dinámica infrarroja como posible método no invasivo para el seguimiento de nódulos de melanoma tratados con BNCT y la radiotoxicidad resultante de la terapia (Santa Cruz et al., 2009).

TUMORES DE CABEZA Y CUELLO

En general, el tratamiento que se aplica a los tumores de cabeza y cuello consiste en cirugía y radiación, administrada con o sin quimioterapia. Lamentablemente, varios cánceres recidivan, con un tiempo medio de supervivencia de solo algunos meses. Es decir, existen pocas opciones terapéuticas, además de la quimioterapia paliativa, para aquellos pacientes con cánceres de cabeza y cuello inoperables y que recidivan post tratamiento (Kankaanranta et al., 2007). En el caso de tumores primarios de células escamosas de cabeza y cuello primarios, 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). Todos recibieron terapia estándar y desarrollaron recidivas

sin opciones de tratamiento. Todos recibieron una combinación de BSH y BPA (i.v.) y en todos menos un paciente, BNCT se llevó a cabo en el reactor de investigaciones de la Universidad de Kyoto, utilizando un haz epitérmico de neutrones. 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 recidiva de tumor glandular submandibular, 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 recidiva de cabeza y cuello inoperable y avanzada. Estos pacientes ya habían recibido tratamientos como cirugía y radioterapia. Se les administró BPA-fructosa, 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. Solo dos pacientes sufrieron efectos adversos tardíos. En el mismo año, en Japón, también se publicó un estudio donde se planteó la utilidad del BNCT para el tratamiento de recidivas de cáncer bucal y metástasis en ganglios linfáticos regionales (Ariyoshi et al., 2007).

Se obtuvieron nuevos resultados en 2008 (Fuwa et al., 2008), administrando el compuesto borado por vía intra-arterial. En el 2009, se ensayó el fraccionamiento de BNCT en un paciente con un tumor en el hueso temporal, demostrando su reducción (Haginomori et al., 2009). 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).

METÁSTASIS HEPÁTICAS

Las metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon son otro posible blanco de la terapia BNCT. Aquellos casos donde las metástasis de hígado bilobulares, no resecables, multifocales no responden a la quimioterapia, la única opción es el tratamiento paliativo. Esta falla terapéutica resulta desalentadora ya que en la mayoría de los casos, el tumor primario en colon puede ser removido exitosamente, siendo el hígado frecuentemente el único sitio de metástasis (Cardoso et al., 2007). El hecho que BNCT sea además una modalidad terapéutica de targeting “biológico” y no conformacional, la haría particularmente útil para el tratamiento de células infiltrantes en tejido sano (por ejemplo, Pozzi et al., 2012).

Pinelli y Zonta et al. en Pavia, Italia, trabajaron con un paciente que presentaba más de 14 nódulos metastásicos en el parénquima del hígado. El tamaño de los nódulos impedía

su extirpación quirúrgica y se decidió realizar BNCT *ex situ* del hígado, seguido de reimplante. El procedimiento consistió en administrar al paciente, mediante infusión, BPA-fructosa (300 mg/kg peso corporal) vía vena cólica por 2hs. Se tomaron muestras de sangre, tumor e hígado normal para determinar la concentración de boro y, una vez que se demostró mediante alfa espectrometría que el boro se localizaba selectivamente en las metástasis y poco en el hígado normal, se realizó una hepatectomía total. Luego, el hígado fue transportado al reactor de la Universidad de Pavia para ser irradiado por neutrones, seguido de una reimplantación en el paciente. Por más de 2 años, el paciente no tuvo evidencias clínicas o radiográficas de recidivas y sus niveles de antígeno carcinoembrionario fueron bajos. Esto demostró la potencial capacidad de BNCT de erradicar metástasis multicéntricas en un órgano sólido (Barth et al., 2005, Zonta et al., 2006).

En un segundo paciente se demostró el efecto terapéutico de la técnica sobre los nódulos metastásicos de hígado. No pudo realizarse un seguimiento a largo plazo dado que el paciente falleció por causas clínicas no relacionadas con el tratamiento (Zonta et al., 2006).

En la Argentina, el ANMAT aprobó los estudios de biodistribución en pacientes con metástasis hepáticas con indicación de cirugía. Además, a nivel experimental, nuestro grupo ha estudiado la potencial toxicidad de BNCT en hígado normal de rata, demostrando que se mantiene inalterada la capacidad regenerativa del hígado normal tratado con BNCT (Cardoso et al., 2007). Asimismo, el Dr. Jorge E. Cardoso (Instituto Angel H. Roffo) propuso estudiar la factibilidad de tratar metástasis hepáticas con un nuevo protocolo de BNCT basado en irradiación con un haz de neutrones térmicos de una porción del hígado *ex situ* seguido de autotransplante parcial. A diferencia de la técnica propuesta por el grupo de Pavia, esta técnica evita la necesidad de una larga fase anhepática de alto riesgo para el paciente pero requiere que los lóbulos hepáticos tratados por BNCT sean capaces de regenerar (Cardoso et al., 2007). En cuanto a los estudios de biodistribución de BPA-fructosa realizados en 5 pacientes, se demostró que la relación hígado/sangre resultaba cercana a 1 y que la relación concentración de boro metástasis/hígado se encontraba en un rango de 0,8-3,6. Esta importante variabilidad fue parcialmente atribuida a variaciones histológicas de las muestras. Estos estudios demostraron entonces la factibilidad de BNCT como terapia *ex situ* en la facilidad del reactor RA-3 (Cardoso et al., 2009, Miller et al., 2009).

Los resultados obtenidos en Pavia estimularon el desarrollo de varios proyectos, además del Argentino, como por ejemplo los de Petten/Essen (Wittig et al., 2008a) y Mainz, Alemania. El proyecto desarrollado en Mainz se encuentra en fase clínica con administración de compuestos borados y la subsiguiente medición de boro en muestras tomadas durante la cirugía de hígado en pacientes con metástasis hepáticas (Blaickner et al., 2012).

TUMORES DE TIROIDES

La terapia BNCT, como tratamiento para tumores de tiroides, fue propuesto para aquellos casos donde la cirugía solamente (Hiratsuka et al., 2006) o la cirugía seguida por la terapia con ¹³¹I resulta inefectiva (Dagrosa et al., 2011).

En el año 2004, en Japón, se trató un paciente con un carcinoma papilar extratiroideal que no pudo ser operado. Se realizó un doble BNCT mediado por BPA con un mes de intervalo entre irradiaciones, considerando una relación tumor/tejido normal de 2,9. El rango de dosis calculadas en tumor y tejido normal fueron de 20 a 31,5 Gy y de 3,2 a 5,8 Gy respectivamente. En cuanto a la radiotoxicidad de la terapia, al día siguiente del tratamiento, el paciente exhibió dolor y problemas en la deglución debido a una mucositis aguda. Se vieron reacciones moderadamente agudas en la mucosa e hipofaringe. Diez días luego, la mucositis y edema desaparecieron gradualmente. A los seis meses del tratamiento, se evidenció una regresión parcial del tumor. Por dos años se detectó una regresión gradual sin complicaciones crónicas y sin nuevas lesiones ni efectos neurológicos. Este trabajo demostró que, a pesar que el carcinoma papilar de tiroides es un tumor radio-resistente, BNCT produjo efectos terapéuticos significativos (Hiratsuka et al., 2006).

Actualmente, en Argentina, el ANMAT autorizó el estudio de biodistribución con BPA para el cáncer de tiroides.

RESUMEN FINAL

A continuación, como resumen, la Tabla 2 muestra todos los tipos de tumores tratados mundialmente con BNCT de 2002 a 2011 (Wagner et al., 2012).

Tabla 2. Tumores tratados mundialmente con BNCT de 2002 a 2011 (Wagner et al., 2012).

Ubicación	Fuente	Energía	Estado	Período de actividad	Nº Pacientes	Tumores tratados
Finlandia (Otaniemi/Helsinki)	FiR-1 250 kW	Neutrones epitérmicos	En reconversión, reanudando en 2012	1999-2011	>250	Cabeza y cuello, glioma, meningioma
Japón (Kumatori/Osaka)	KUR 5 MW	Neutrones térmicos a epitérmicos	Activo	-2006, desde 2010	>200	Glioblastoma multiforme (GBM), pulmón, hígado
Japón (Tsukuba/Ibaraki)	JRR4 3,5 MW	Neutrones térmicos, epitérmicos	En reconversión	-2011	>200	Cabeza y cuello, GBM, melanoma
Suecia (Studsvik)	R2-0 1 MW	Neutrones epitérmicos	Detenido	-2005	30	Glioblastoma multiforme
Países Bajos (Petten)	HFR 45 MW	Neutrones epitérmicos	Detenido	1997-2006	30	Tumores de cerebro (GBM, metástasis de melanoma)
Argentina (Bariloche)	RA-6 -2007: 0,5 MW Plan: 3 MW	Neutrones hipertérmicos	En reconversión	2003-2007 >2012	7	Melanoma cutáneo
Rep. Checa (Rez)	LVR-15 10 MW	Neutrones epitérmicos	Detenido	-2002	5	Glioblastoma multiforme
Italia (Pavia)	TRIGA-MARK II 250 kW	Neutrones térmicos	Detenido	2001-2003	2	Hígado

CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL MODELO BIOLÓGICO A ESTUDIAR

Cáncer de la cavidad bucal

Durante el año 2008, a nivel mundial, se diagnosticaron aproximadamente 263.900 nuevos casos de cáncer de la cavidad bucal. Esta patología (incluyendo cáncer de labio) causó 128.000 muertes. Generalmente, las mayores tasas se encontraron en Melanesia, Sur y Centro de Asia, y Centro y Este de Europa. El hábito de fumar, el uso del alcohol, el mascado de la nuez de betel y la infección por HPV (human papillomavirus o virus de papiloma humano) son algunos de los principales factores de riesgo. Inclusive, el hábito de fumar y el consumo de alcohol podrían tener efectos sinérgicos (Jemal et al., 2011).

El carcinoma de células escamosas del epitelio de la mucosa bucal corresponde a más del 90% de las lesiones bucales malignas. Corresponde al 11^º cáncer más común a nivel global, al 3% de todos los casos de cáncer recientemente diagnosticados y al 8^{vo} cáncer más predominante en los hombres (Chen y Lin, 2010). 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 cánceres en esos países, lo que contrasta con América del Norte y Oeste de Europa (en donde solo constituye un 10% de todos los cánceres). A pesar de toda la investigación desarrollada, las tasas de mortalidad y morbilidad en pacientes con este carcinoma se mantuvieron inalteradas (Chen y Lin, 2010). El cáncer bucal está asociado con una severa morbilidad y menos del 50% de sobrevivencia a largo plazo a pesar de los avances en su tratamiento (cirugía, radiación, quimioterapia). Los principales factores responsables de esta supervivencia limitada son las metástasis a ganglio linfático regional y las recidivas (Tanaka y Ishigamori, 2011). Luego, la detección temprana y prevención del cáncer bucal y lesiones potencialmente malignas resulta de gran relevancia clínica.

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-óxido 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). 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 xenotransplantados subcutáneos y ortotópicos (Chen y Lin, 2010).

Modelo de cáncer bucal: bolsa de la mejilla del hámster

Ventajas del modelo: similitudes moleculares e histológicas con la mucosa bucal humana

Entre los mencionados, el modelo de cáncer bucal ideal sería aquel que ocurra 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 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). Se encuentra mundialmente aceptado como modelo de cáncer bucal por inducción química (Chen y Lin, 2010).

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 cancerizado 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). Además, 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, se caracteriza por un aumento en la proliferación celular y reducción en la apoptosis. Existe una sobreexpresión de PCNA, GST-P y NF- κ B, moléculas que participan en la proliferación celular y en reacciones antiapoptóticas, y una “downregulación” de I κ B, p53, p21, que juegan un papel centinela en el arresto del ciclo celular, reparación del DNA y apoptosis. Además, la “upregulación” de Bcl-2 asociada a la “downregulación” de Bax, Fas, Apaf-1, citocromo c, caspasas, PARP en este tipo de tumores de células bucales escamosas, tanto en humano como en hámster, indican el escape de la apoptosis. En particular, un aumento en la tasa Bcl-2/Bax, un índice confiable de la supervivencia celular, se encuentra asociado a un mal pronóstico en pacientes con carcinoma de células escamosas bucales, fenómeno que también ocurre como evento tardío durante la carcinogénesis en hámsters (Nagini et al., 2009).

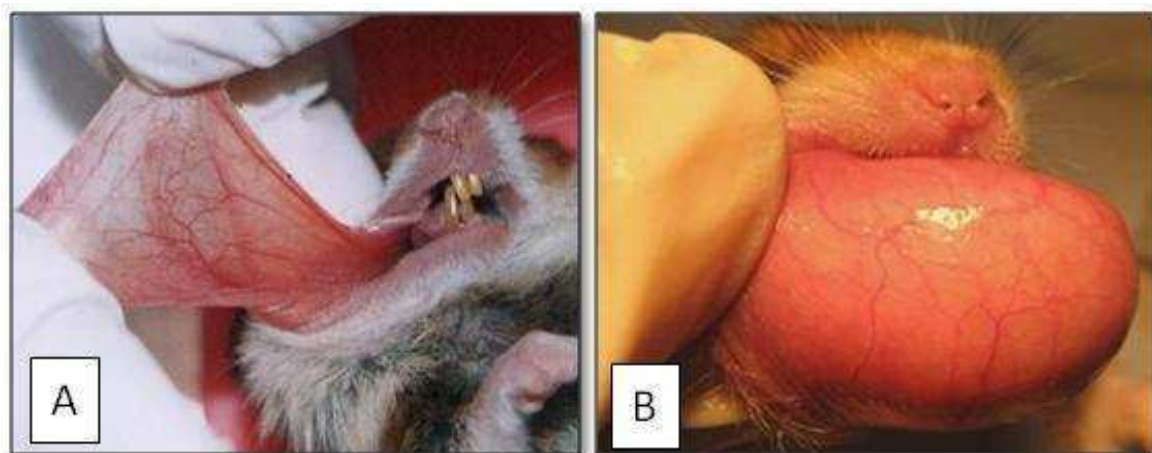
Anatómicamente, las bolsas bilaterales (una de cada lado de la boca) se encuentran debajo de los músculos de la mejilla, abiertas hacia el interior de la boca, extendiéndose hacia atrás de la cavidad bucal, no más atrás de la faringe. Histológicamente, están compuestas por una capa de células escamosas 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 (Ilustración 7) sin necesidad de anestesiarse el animal. Asimismo, las bolsas pueden ser extendidas fácilmente para ser irradiadas localmente (Ilustración 8A) y evertidas para realizar el seguimiento macroscópico del comportamiento de los tejidos (Ilustración 8B). 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.

Ilustración 7. Topicación con un carcinógeno químico.



Ilustración 8. Bolsa de la mejilla del hámster, (A) extendida, (B) evertida para su observación.



Desventajas del modelo

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. 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 (Letchoumy et al., 2006), contribuyendo al desmejoramiento del animal. 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).

Ensayos de 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 topicaciones se realizaron con hidrocarburos aromáticos policíclicos altamente carcinogénicos como el DMBA, el 20-metil-colantreno y el 3,4-benzpireno. Salley, en el año 1954 (Salley 1954), logró inducir neoplasmas en la bolsa de la mejilla del hámster con DMBA disuelto en acetona o éter. 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 hámsters 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.

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 hiper cromatismo nuclear. En los estados finales, semanas 10 a 14 de topicación, se observan carcinomas de células escamosas exofíticos y/o endofíticos (Chen y Lin, 2010).

A medida que transcurre el proceso de carcinogénesis, aumenta la incidencia de lesiones más severas, es decir, progresivamente, NUMF (No Unusual Microscopic Features o sin características microscópicas inusuales), hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ*, carcinomas microinvasivos y, finalmente tumores exofíticos y endofíticos. 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 hiper cromasia. 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).

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) (Ilustración 9, Ilustración 10, Ilustración 11, Ilustración 12, respectivamente) pueden coexistir en una misma bolsa (Ilustración 13). La severidad de las lesiones aumenta con el paso del tiempo. Sin embargo, al final del proceso, los tumores coexisten con lesiones potencialmente malignas. Consideraremos como tejido con cancerización de campo o tejido con PMD (Potentially Malignant Disorders) al conjunto de lesiones morfológicas microscópicas y macroscópicas así como también, al campo cancerizado sin lesiones morfológicas (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). La Ilustración 14 muestra un ejemplo de un animal cancerizado con el protocolo clásico de cancerización (2 veces por semana durante 12 semanas) mostrando un tumor exofítico. Se observa, al comparar con la Ilustración 8B, la diferencia en cuanto a la vascularización y vasodilatación en el tejido circundante al tumor.

Ilustración 9. Epitelio normal sin cancerizar. Se observan 2-4 hileras de células, con capa granulosa y capa cornea bien definidas. Tinción con hematoxilina-eosina. Magnificación final: 330X.

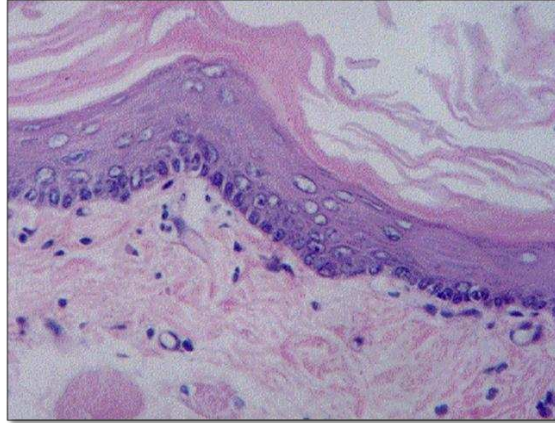


Ilustración 10. Bolsa tratada con DMBA. Se observa una hiperplasia donde las células epiteliales presentan apariencia normal pero aumentan su índice de proliferación, con lo cual aumenta el grosor epitelial. Tinción con hematoxilina-eosina. Magnificación final: 330X.

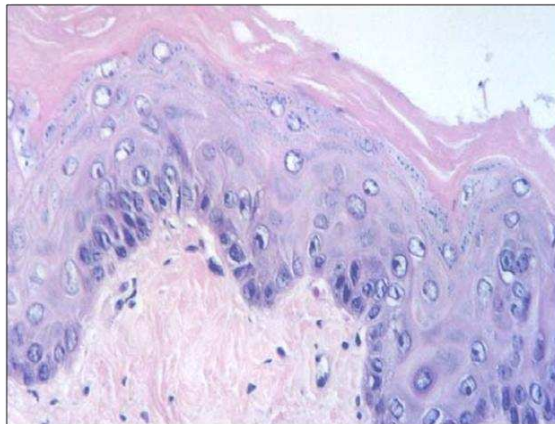


Ilustración 11. Bolsa tratada con DMBA. Se observa una displasia, con alteraciones celulares morfológicas y de orientación. Tinción con hematoxilina-eosina. Magnificación final: 330X.

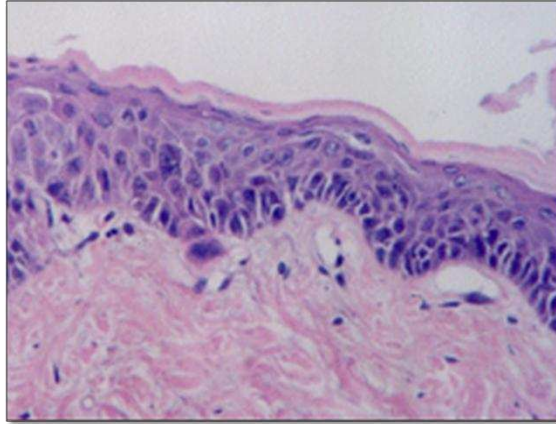


Ilustración 12. Bolsa tratada con DMBA. Se observa un carcinoma semidiferenciado. Tinción con hematoxilina-eosina. Magnificación final: 330X.

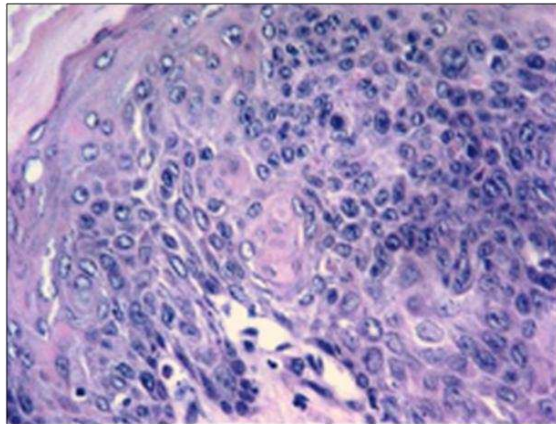
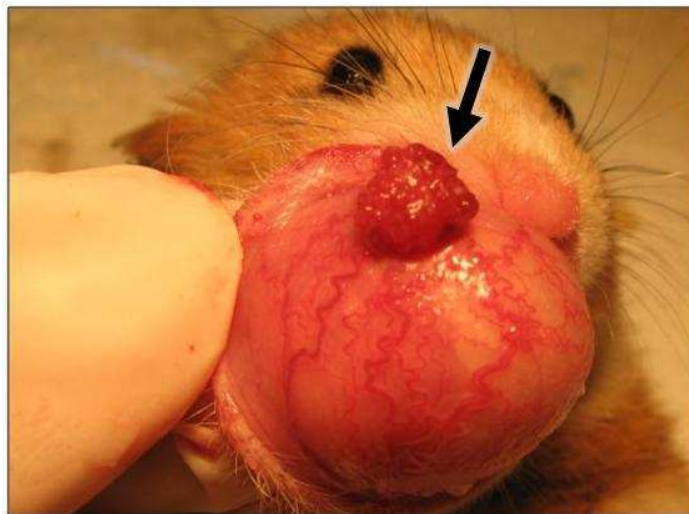


Ilustración 13. Corte histológico de una bolsa topicada con DMBA donde coexisten cuadros histológicos correspondientes a los diferentes estadios del proceso de cancerización: tejido precanceroso o tejido con PMD (lesiones microscópicas como hiperplasias y displasias así como también campo cancerizado sin lesiones morfológicas -NUMF-), carcinomas *in situ* y carcinomas exofíticos y endofíticos.



Ilustración 14. Ejemplo representativo de una bolsa de la mejilla del hámster con tumor exofítico (flecha) rodeado de tejido precanceroso o tejido con 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.



La coexistencia de lesiones en una misma bolsa imita cercanamente el desarrollo de lesiones malignas y potencialmente 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”**.

Cancerización de campo

El concepto de “*cancerización de campo*” fue introducido por Slaughter et al. en el año 1953, mientras intentaban estudiar la presencia de tejido histológicamente anormal rodeando al carcinoma bucal escamoso (Slaughter et al., 1953). Examinaron cortes patológicos de 783 pacientes con cáncer de cabeza y cuello con el objetivo de investigar los cambios que presentaba el epitelio que rodeaba a estos tumores y explicar su comportamiento clínico. Descubrieron que todo el epitelio más allá de los límites del tumor presentaba cambios histológicos: 88 pacientes de los 783 evaluados (11/) presentaron más de un área independiente de malignidad. Se concluyó que la mucosa había sufrido un cambio, quizás debido al carcinógeno, y que era más susceptible a desarrollar múltiples focos de transformación maligna (Ha y Califano, 2003). En cuanto al término cancerización de campo, Slaughter et al. no proveyeron una definición clara pero plantearon que: (a) el cáncer bucal se desarrolla en áreas multifocales de cambio precanceroso; (b) hay zonas de tejido precanceroso alrededor del tumor (y también pueden haber otras áreas de tejido precanceroso alejadas del tumor, expuestas a estímulos similares); (c) el cáncer bucal frecuentemente consiste en lesiones múltiples independientes que a veces coalescen; y (d) la persistencia de tejido anormal luego de la cirugía podría explicar los segundos tumores primarios y las recidivas (Braakhuis et al., 2003).

La cancerización de campo puede resultar de eventos moleculares independientes que afectan múltiples células separadamente; un evento molecular en una única célula progenitora que da origen a éste fenómeno a través de mecanismos de expansión clonal extendida; o como una forma alternativa de migración lateral de las células a través de la mucosa. Estos eventos pueden ocurrir simultáneamente o complementariamente (Ha y Califano, 2003). Los sistemas de órganos donde la cancerización de campo ha sido descripta son: cáncer de células escamosas en cavidad bucal, orofaringe y laringe; pulmón; esófago; vulva; cervix; colon; mama; vejiga; y piel (Braakhuis et al., 2003).

Mediante análisis moleculares en “tejido aparentemente normal” adyacente al tumor y en márgenes quirúrgicos, se puede evaluar la presencia de una lesión de campo. Los marcadores utilizados pueden ser “LOH” (loss of heterozygosity: pérdida de heterocigosidad); alteraciones en microsatélites, inestabilidad cromosómica, y mutaciones detectadas por técnicas de amplificación de ADN, inmunohistoquímica, e hibridación *in situ*. El cáncer de células escamosas puede desarrollarse en un campo contiguo de células preneoplásicas, las cuales son principalmente de origen monoclonal. Esta presunción de monoclonalidad es apoyada por el hallazgo que múltiples biopsias comparten “marcadores tempranos de carcinogénesis”. La heterogeneidad con respecto a los marcadores “tardíos” apunta al desarrollo de múltiples subclones, conocido como proceso de divergencia clonal (Braakhuis et al., 2003).

Con respecto a la mucosa bucal adyacente al tumor, grupos de menos de 200 células de diámetro pueden ser observadas con una inmunotinción de *TP53*. Siguiendo el criterio de Garcia et al., estos grupos son “parches” definidos como un grupo de células que comparten un mismo genotipo, contiguas al momento de la consideración. Waridel et al. encontraron

que grupos de células con mutaciones en *TP53* están presentes en biopsias de mucosa normal de pacientes con cáncer de células escamosas y son particularmente frecuentes en pacientes con tumores primarios múltiples. Estos parches con la mutación en *TP53* pueden ser equivalentes a la unidad clonogénica, definida como una familia de células que derivan de un mismo progenitor. Estas unidades con una célula madre, células en proliferación y células diferenciadas forman el epitelio escamoso. Cuando estas células madre adquieren una alteración genética, el parche clonal que deriva de ella contiene el mismo cambio, explicando la existencia del grupo de células *TP53*-inmunitivas (Braakhuis et al, 2003).

En base a los hallazgos moleculares, Braakhuis et al. (2003) propusieron la siguiente definición de “*cancerización de campo*”: La presencia de una o más áreas de células epiteliales que presentan alteraciones genéticas. Una lesión de campo tiene origen monoclonal, y no muestra un crecimiento invasivo o comportamiento metastásico. A nivel histológico, una lesión de campo podría tener aberraciones características de una displasia.

A su vez, Warnakulasuriya et al. (2007), propuso que el hecho que algunas lesiones o desórdenes de la mucosa bucal se consideran precancerosos se basa en la evidencia que: 1) en estudios longitudinales, áreas de tejido con ciertas alteraciones en su apariencia clínica, identificadas inicialmente como precancerosas, sufrieron algún cambio maligno durante el seguimiento; 2) algunas de estas alteraciones, particularmente los parches rojos y blancos, coexisten en los márgenes de carcinomas escamosos bucales; 3) una proporción de éstas podrían compartir cambios morfológicos y citológicos con cánceres epiteliales, pero sin invasión; 4) algunas de las alteraciones cromosómicas, genómicas y moleculares encontradas en cánceres bucales invasivos son detectados en estos presuntos precánceres o fases premalignas.

Hasta aquí, todas las teorías y modelos biológicos acerca de la cancerización de campo están limitados a alteraciones genéticas en el epitelio. A pesar que la teoría de la cancerización de campo puede explicar estos fenómenos clínicos hasta cierto punto, el efecto del estroma no debería ser desestimado. En la cavidad bucal, el volumen del compartimento estromal es mayor comparado con el del epitelio (Ge et al., 2010). El tejido estromal es el tejido conectivo, soporte del tejido epitelial que da origen al tumor. Está compuesto por diferentes tipos de células incluyendo fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales vasculares y linfovascuales, y células infiltrantes del sistema inmune como los macrófagos (Weber y Kuo, 2012).

Dentro del marco de la teoría de efecto de campo, las células epiteliales afectadas a nivel genómico aumentan su proliferación, sustituyendo a las células normales. Las células estromales también pueden adquirir alteraciones genómicas o epigenómicas en una forma similar a las epiteliales y, a su vez, afectar las células epiteliales vecinas. Estas células con alteraciones pueden expandirse a expensas de los componentes normales y constituir un área de microambiente anormal. Las alteraciones pueden transmitirse por herencia o por movimiento a través de la submucosa circundante, contribuyendo probablemente al

desarrollo de segundos tumores primarios y tumores primarios múltiples característicos de la cancerización de campo (Ge et al., 2010).

Estas células estromales, específicamente fibroblastos, secretan factores que actúan en forma paracrina o autocrina en las células tumorales resultando en un fenotipo tumoral más agresivo. A estos fibroblastos se los llama fibroblastos asociados al cáncer (CAF) (Weber y Kuo, 2012). Expresan factores de crecimiento asociados con la proliferación tumoral (Räsänen y Vaheri, 2010) y también presentan un rol en la neovascularización secretando el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF). VEGF estimula la división y proliferación de las células endoteliales, estimula la permeabilidad vascular y causa edema intersticial y cambios en la matriz extracelular que da lugar a nuevos vasos sanguíneos. Estos nuevos vasos no son idénticos a los vasos del hospedador ya que difieren en arquitectura y funcionalidad. Por ejemplo, el flujo de sangre no es siempre constante, originando períodos de hipoxia y reoxigenación que a su vez contribuyen a la proliferación tumoral y metástasis. A su vez, los capilares formados durante la neovascularización se caracterizan por presentar un aumento en la permeabilidad, favoreciendo las metástasis (Weber y Kuo, 2012). Esta neovascularización tumoral se caracteriza por brotes capilares prematuros, ramificaciones tortuosas y anormalmente abundantes, vasos sanguíneos aberrantes, deformados y agrandados, flujo vascular errático, microhemorragias, hiperpermeabilidad y niveles anormales de proliferación y apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011). Inclusive, la angiogénesis se induce tempranamente durante el desarrollo en “múltiples pasos” de cánceres invasivos tanto en modelos animales como en humanos. El análisis histológico de lesiones no invasivas, premalignas, incluyendo displasias y carcinomas *in situ* que se desarrollan en una amplia variedad de órganos, revelaron el “disparo” temprano de la angiogénesis. Históricamente, la angiogénesis se consideraba importante solo en tumores macroscópicos de rápido crecimiento. Datos recientes en cambio indican que la angiogénesis también contribuye a la fase microscópica premaligna de progresión neoplásica (Hanahan y Weinberg, 2011). En relación a esto último, la Ilustración 14 comparada con la Ilustración 8B muestra como el tejido con cancerización de campo que rodea al tumor presenta un marcado aumento en la vascularización y vasodilatación, lo cual podría evidenciar este fenómeno.

En cuanto a los componentes de la matriz extracelular, estos también son sintetizados por los fibroblastos. La matriz se compone de colágeno, elastina, proteoglicanos y otras proteínas estructurales que cumplen una función de soporte. En el cáncer, los fibroblastos son transformados en miofibroblastos que secretan proteínas (metaloproteinasas) que degradan la matriz extracelular. Uno de los primeros pasos en la formación de un tumor es la remodelación de la matriz extracelular. Esta degradación favorece la metástasis así como también la migración de células endoteliales que dan lugar a la neovascularización. A su vez, la acción de las metaloproteinasas causa la liberación de factores de crecimiento que amplifican el proceso de crecimiento tumoral e invasión. En cuanto a las integrinas, que son receptores de las células cancerosas para interactuar con el microambiente tumoral, estimulan la migración celular, proliferación, metástasis y promueven la angiogénesis (Weber y Kuo, 2012).

La radiación puede dar lugar a la formación de radicales libres, generando fibroblastos senescentes. A su vez, la radiación induciría fibroblastos capaces de iniciar células epiteliales (Ge et al., 2010). Los CAFs residuales post resección del tumor original podrían ser un riesgo ya que los CAFs y las células malignas remanentes podrían originar segundos tumores primarios y/o recidivas. Un estudio que apoya el efecto del microambiente demostró como, en un modelo de ratón transgénico “knock out” para el receptor del factor de crecimiento TGF- β tipo II (Transforming Growth Factor) en los fibroblastos estromales, se desarrolló un carcinoma escamoso espontáneo de estómago y lesiones prostáticas preneoplásicas con un 100% de penetrancia (Ge et al, 2010).

En base a lo descrito, se plantea entonces la posibilidad que los cambios se puedan iniciar en el epitelio, afectando al compartimento estromal o primero iniciarse en el compartimento estromal, afectando posteriormente a las células epiteliales adyacentes. Ambos fenómenos conducirían al fenómeno de cancerización de campo (Ge et al., 2010).

La particular significancia a nivel clínico de la cancerización de campo en cáncer de cabeza y cuello es la frecuente ocurrencia de recidivas y/o segundos tumores primarios luego de la cirugía del carcinoma de cabeza y cuello (Ge et al., 2010). Posteriormente a la remoción quirúrgica de un tumor, todavía existe un alto riesgo de desarrollo de otro tumor en la misma área anatómica, dada la imposibilidad, en algunos sistemas de órganos, de realizar una remoción del tumor incluyendo el campo que lo rodea, debido a impedimentos anatómicos. Este tipo de problemas son comunes, por ejemplo, en cabeza y cuello. Dado este impedimento, el diagnóstico y el tratamiento de cánceres epiteliales no deben ser focalizados solamente en el tumor sino también en el campo donde este se desarrolló (Braakhuis et al., 2003).

La definición clínica de “recidiva” es un tipo de lesión que puede resultar de células tumorales remanentes del campo donde pudo desarrollarse el tumor (Braakhuis et al., 2003). Sin embargo, en los casos donde el tumor ha sido radicalmente extraído, es lógico asumir que el campo alterado es la causa de un nuevo tumor. La presencia de un campo con células alteradas genéticamente resulta un riesgo continuo de desarrollo del cáncer. El término “segundo tumor primario” fue propuesto para el segundo tumor que se desarrolló independientemente del primero (Braakhuis et al, 2003). El fenómeno de cancerización de campo ha sido utilizado para explicar el desarrollo de estos nuevos tumores, segundos tumores primarios o recidivas, en el campo remanente post cirugía (Braakhuis et al., 2003).

En cáncer de cabeza y cuello, la incidencia de las recidivas puede ser entre 30-50% luego de la radioterapia (Hoebers et al., 2011). La probabilidad de desarrollar segundos tumores primarios en pacientes que ya han tenido cáncer de cabeza y cuello es de aproximadamente del 20% y por cada año la tasa es del 4-6%. Los segundos tumores primarios se han convertido en la mayor causa de muerte en pacientes con tumores de cabeza y cuello tratados tempranamente (Ge et al., 2010).

Se encuentra mundialmente aceptado que las lesiones bucales, como la leucoplasia, eritroplasia y algunas formas de “Lichen Planus” y fibrosis en la submucosa, muestran una

tendencia significativa a la transformación maligna (Carnelio et al, 2011; van der Waal and Scully 2011). Las modalidades de tratamiento incluyen cambios en la ingesta de tabaco y alcohol, escisión quirúrgica, criocirugía, entre otras. Los resultados son variables y existen pocos estudios a largo plazo (Holmstrup et al., 2006). A su vez, la búsqueda de marcadores de cancerización de campo que puedan ser detectados previamente a la aparición clínica de la condición potencialmente maligna resulta relevante en términos de la detección temprana y la prevención del cáncer bucal (Schwint et al., 1996; Humayun and Prasad, 2011).

En la literatura, los focos con alteraciones se definen de diversas formas tales como lesiones premalignas o lesiones precancerosas. El grupo de Warnakulasuriya, en el año 2007 (Warnakulasuriya et al., 2007), propone la utilización del término “desórdenes potencialmente malignos”, ya que establece que no todas las lesiones y condiciones descritas bajo este término podrían transformarse en cáncer. Existiría una familia de alteraciones morfológicas entre las cuales algunas podrían tener un aumento en el potencial de transformación maligna. Los desórdenes potencialmente malignos de la mucosa bucal son también indicadores de riesgo de posibles futuros cánceres en algún otro lugar de la mucosa bucal, es decir, no son solo predictores sitio-específicos.

La Editorial de la revista “Oral Oncology” (Sarode et al., 2012) publicó un artículo titulado “Oral potentially malignant disorders: precisising the definition”. En esta publicación se propuso una nueva definición para estos “desórdenes potencialmente malignos”: “es un grupo de desórdenes de etiologías variadas, caracterizada por estar asociada a un mutágeno, generalmente tabaco, a causas espontáneas, alteraciones hereditarias, o mutaciones en el material genético de las células epiteliales bucales, que pueden o no presentar alteraciones clínicas e histomorfológicas, que podrían llevar a la transformación de esta lesión en un carcinoma bucal escamoso”.

Ensayos de radiotoxicidad en el modelo de la mejilla del hámster: MUCOSITIS

Mucositis

“Mucositis” es el término general que se refiere a la reacción inflamatoria y a las lesiones ulcerativas de la boca y orofaringe que ocurren secundariamente a la radioterapia y a algunos agentes quimioterapéuticos. La destrucción del tejido y las alteraciones funcionales en la cavidad bucal son un problema inevitable cuando los pacientes con cáncer de cabeza y cuello reciben radioterapia. No solo causa mucositis bucal ulcerativa similar a la causada por la quimioterapia en alta dosis, sino también puede inducir daños que resulten en una permanente disfunción de la vasculatura, tejido conectivo, glándulas salivales, músculo y hueso (Shih et al., 2003).

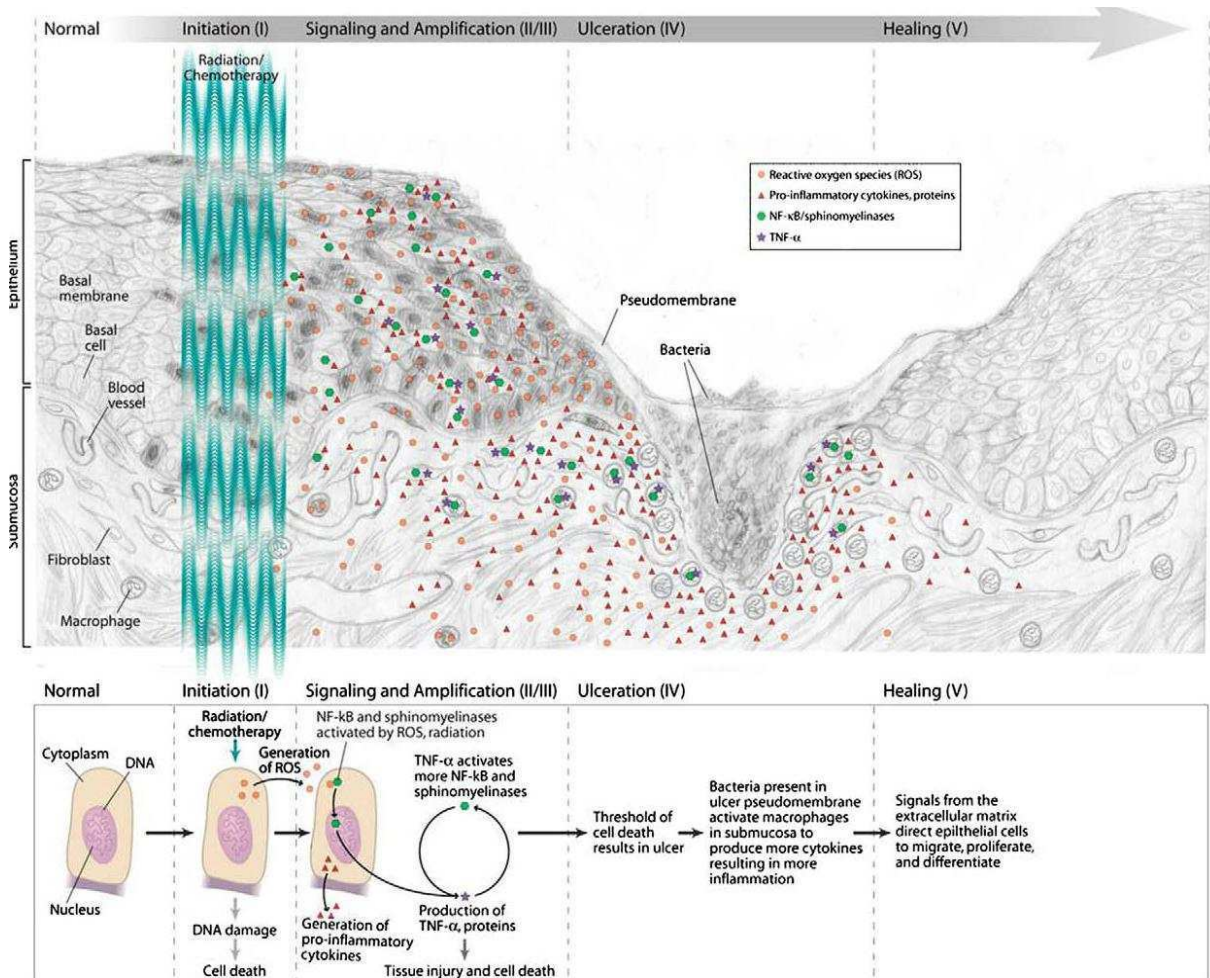
Como ya fue explicado anteriormente, la acción de la quimioterapia y la radioterapia no es específica, por lo que en el contexto de tratamientos antineoplásicos es frecuente observar daños a tejidos que, en condiciones fisiológicas, tienen altas tasas de replicación

celular. Entre ellos se destaca la toxicidad en las mucosas bucal y gastrointestinal. La alta tasa de proliferación celular y constante reemplazo hace que estas mucosas sean especialmente vulnerables a los efectos citotóxicos de la radiación (Shih et al., 2003).

Patobiología de la mucositis

La patogénesis de la mucositis bucal puede ser dividida en 5 etapas: Iniciación (I), primera respuesta al daño (señalización (II) y amplificación de la señal (III)), ulceración (IV) y cicatrización (V) (Ilustración 15) (Sonis 2009).

Ilustración 15. Patobiología de la mucositis como proceso en 5 etapas. La clave del proceso biológico asociado a la patogénesis de la mucositis bucal puede ser dividido en 5 etapas: Iniciación (I), primera respuesta al daño (señalización (II) y amplificación (III)), ulceración (IV) y cicatrización (V) (Sonis 2009).



La iniciación ocurre inmediatamente después de la terapia por radiación o quimioterapia y sucede como único evento en el tiempo en pacientes que reciben una terapia “en bolo”. En otros pacientes, como aquellos que reciben dosis fraccionada de radiación, los eventos iniciadores son crónicos. Por lo tanto, la cadena de eventos que llevan a la mucositis bucal, se dispara cada vez que el paciente recibe la subsiguiente irradiación

(Sonis 2007). Dos eventos caracterizan esta fase. El primero es el daño directo al ADN que lleva a la muerte celular inmediata de células del epitelio basal y células de la submucosa. Esta muerte solo resulta en un pequeño número de células afectadas. El segundo evento es la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Durante la etapa primaria de respuesta al daño, la quimioterapia, radiación y ROS inician el proceso biológico que resulta en la injuria de la mucosa. Las vías de transducción disparadas por daño al ADN y peroxidación lipídica promueven la activación de un número de factores de transcripción como NF- κ B, Wnt, p53 y sus vías canónicas asociadas (Sonis 2007, 2009).

NF- κ B puede ser activado directamente por las terapias o indirectamente por los ROS. NF- κ B regula muchos de los genes asociados a la mucositis, como las citoquinas pro-inflamatorias TNF (Tumor Necrosis Factor), IL-6 (Interleuquina 6) e IL-1 β (Interleuquina 1 β), moléculas respondedoras a estrés y de adhesión celular. Cabe recalcar que, a su vez, la apoptosis es una importante consecuencia de la acción de NF- κ B en células normales (Sonis 2007, 2009).

Todos estos procesos ocurren en los primeros segundos de irradiación o administración de quimioterapia. Sin embargo, las manifestaciones clínicas se desarrollan luego de un tiempo post injuria (Sonis 2009).

En cuanto a la etapa de amplificación de la señal, consiste en la habilidad de aquellas moléculas, inducidas en la etapa primera de daño, de desarrollar “feedback loops” (ciclos de retro-alimentación) que magnifican la respuesta a la injuria amplificando y potenciando las señales biológicas originales. Estos “feedback loops” no solo aumentan el daño sino que además lo prolongan mediante la continua señalización durante días luego de la terapia. Por ejemplo, TNF podría tener un “feedback” positivo sobre NF- κ B para amplificar su respuesta (Sonis 2007, 2009). A su vez también, la severidad de la mucositis se correlaciona con la intensidad de producción de citoquinas pro-inflamatorias (Sonis 2007).

La etapa de ulceración resulta la etapa más significativa. Las úlceras son profundas, anchas y dolorosas. Están generalmente recubiertas de una pseudomembrana compuesta de células muertas y fibrina, un ambiente óptimo para la colonización bacteriana (Sonis 2007). En modelos animales, el número de bacterias aumenta más de 300 veces en la transición entre epitelio intacto y ulcerado. Las bacterias en la superficie de la úlcera potencian el proceso de mucositis. Los productos de la membrana celular (como lipopolisacáridos, ácido lipoteicoico, antígenos de la pared celular y glucanos) penetran en la submucosa, rica en macrófagos, para estimular a aquellas células para que secreten citoquinas pro-inflamatorias. Para el paciente, el clínico, la compañía de seguros y la empresa farmacéutica, la ulceración es el evento de mayor importancia asociado a la mucositis. La prevención de la ulceración minimiza el dolor, el riesgo a la infección, la utilización de tubos para alimentación y la estadía en el hospital (Sonis 2009).

La última etapa consiste en la cicatrización de la úlcera. La mayoría de los casos de mucositis bucal cicatrizan espontáneamente. La resolución de la úlcera es el resultado de un proceso biológico activo en el cual la señalización desde la matriz extracelular de la submucosa guía la proliferación, migración y diferenciación del epitelio que bordea la úlcera.

La disrupción de la matriz extracelular submucosa es el iniciador más probable en casos en los cuales la cicatrización está retrasada o, raramente, no ocurre (Sonis 2009).

Manifestaciones clínicas

En cuanto a las manifestaciones clínicas, el desarrollo de edema con infiltración de neutrófilos se produce cuando las células madres residuales degeneran y sufren necrosis en la membrana basal. Además, este edema se asocia a la dilatación de capilares, lo cual explica la presencia de eritema. Los capilares se tornan hiperpermeables, causando más edema y una disminución en la entrega de sangre a la mucosa bucal. Una vez que la proliferación y el reemplazo del epitelio se encuentran interrumpidos, las manifestaciones clínicas de la mucositis se presentan como eritema, ulceración o “parches” de pseudomembrana o pseudomembrana confluyente en el tejido irradiado, resultando en una agravada hiperemia y edema (Shih et al., 2003).

Diversos estudios muestran como existe un daño a la submucosa antes que existan signos clínicos de eritema y ulceración. En estos estudios, se detectaron daños subepiteliales y apoptosis en fibroblastos y células endoteliales de la microvasculatura antes de la destrucción del epitelio. La submucosa actúa como el sustento físico y bioquímico del epitelio; cuando este sustento se pierde el epitelio colapsa. Por ejemplo, las células endoteliales producen KGF (Keratinocyte Growth Factor), que dispara el crecimiento y diferenciación de las células epiteliales. La difusión de los factores de crecimiento del endotelio determina el grosor del epitelio. Luego, con la pérdida de células endoteliales se pierde la señalización pro-crecimiento normalmente proveído a las células del epitelio (Sonis 2007).

Factores de riesgo de la mucositis

Los pacientes con cáncer de cabeza y cuello se encuentran dentro del grupo de la población con mayor riesgo de desarrollar mucositis. Para pacientes que son tratados con quimioterapia, la mucositis es generalmente un evento agudo en el cual los síntomas comienzan aproximadamente de 3 a 5 días luego de la infusión de la droga y la ulceración se percibe un par de días más tarde, resolviendo a lo largo de dos semanas. En cambio, la mucositis inducida por radiación, tiene un curso de evolución crónico ya que los pacientes son tratados con dosis incrementales de radiación durante un período de 7 semanas (2 Gy por día hasta 70 Gy). Para los 30 Gy, existe ulceración, generalmente coalescente y cubierta por pseudomembrana. La ulceración se prolonga durante 3 o 4 semanas de finalizado el tratamiento. En el caso de la radiación fraccionada, como una bola de nieve, la acumulación de cambios biológicos inducidos por la radiación resulta en una avalancha biológica que culmina en la total remoción de la mucosa. Cada ciclo de terapia conlleva riesgo de mucositis (Sonis 2009).

A su vez, la propia actividad biológica del tumor puede contribuir al riesgo de mucositis bucal. Esto se debe a que tanto parénquima como estroma tumoral, son fuentes de moléculas que influyen el comportamiento celular. Péptidos y proteínas derivados del

tumor pueden modificar directamente la respuesta de células normales a la radiación o quimioterapia mientras que otras, como las metaloproteinasas de la matriz, favorecen la destrucción del microambiente (Sonis 2009).

Magnitud y complicaciones asociadas a la mucositis inducida por la terapia por radiación

La radiación ionizante produce daños doble cadena en el ADN por interacción directa entre la radiación y el ADN y por interacción indirecta mediante la generación de ROS. Cuando la replicación del ADN se encuentra impedida, la reproducción y funciones normales de las células se encuentran inhibidas llevando a la muerte celular. La mucositis aguda es entonces el resultado de hipoplasia y destrucción del epitelio escamoso, muerte de células madre de la mucosa, la inhibición de la proliferación de células transitorias, y ausencia de la regeneración celular (Shih et al., 2003).

Las complicaciones bucales asociadas a la mucositis han sido siempre reconocidas como el mayor problema en el tratamiento del cáncer bucal. Las principales complicaciones asociadas a la mucositis bucal son dolor, infección, pérdida de peso y malnutrición, y cambios en el sentido del gusto. Algunas veces es necesario discontinuar la radioterapia debido a la severidad de estos problemas. El tratamiento de la mucositis bucal inducida por radioterapia es crítico para los pacientes porque una interrupción en la radioterapia reduce su efecto sobre las células tumorales, aumentando la posibilidad de una repoblación de células cancerosas (Shih et al., 2003). A pesar de su incidencia y relevancia clínica, no existen actualmente modos efectivos que prevengan o controlen la mucositis (Sonis 2004, 2009).

A continuación se detallan, brevemente, las principales complicaciones mencionadas:
Dolor en la cavidad bucal

La terapia radiante para pacientes con cáncer de cabeza y cuello frecuentemente resulta en una mucositis dolorosa, la cual usualmente es pobremente controlada con analgésicos estándar o tópicos, llevando a complicaciones serias como dificultades en tragar y masticar (Shih et al., 2003).

Janjan et al. (1992) realizaron un estudio descriptivo para explorar la calidad e intensidad del dolor asociado a la mucositis bucal inducida por radioterapia. Los 14 pacientes estudiados desarrollaron una mucositis dolorosa, que usualmente comenzaba a las dos y tres semanas de iniciada la radioterapia.

Infección

Los tejidos mucosos dañados pueden fácilmente desarrollar lesiones causadas por microorganismos, incluyendo hongos, virus herpes, y una amplia variedad de bacterias, dado que las respuestas locales del hospedador se encuentran inhibidas. Esta inhibición resulta en parte por la disminución del volumen de saliva y por alteraciones en la calidad de saliva, como la disminución en inmunoproteínas (por ejemplo glicoproteínas) y reducción del pH. La disminución del volumen de la saliva predispone a aumentos en el número de bacterias

bucales porque la cantidad de saliva es insuficiente para matar a las bacterias. A su vez, las endotoxinas producidas por las bacterias colonizantes pueden amplificar la cascada de citoquinas pro-inflamatorias en la mucosa bucal y exacerbar la mucositis. Las infecciones bacterianas afectan tres sitios en la boca: la gingiva, mucosa bucal, y los dientes. En particular, la mucosa bucal infectada presenta ulceración profunda con un centro necrótico amarillo-blanco, con bordes con frecuencia elevados e indurados (Shih et al., 2003).

Pérdida de peso y malnutrición

El déficit nutricional durante la radioterapia resulta común en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Ocurre por la combinación de factores como la anorexia, xerostomía, disfagia, alteraciones en el gusto, procedimientos quirúrgicos, toxicidad por quimioterapia recurrente, caquexia debido al cáncer y mucositis, dificultando la masticación y la disfagia. Una dramática disminución en la alimentación resulta en una pérdida de peso notable y deshidratación. Asimismo, disminuye la renovación celular y la migración celular, causando una demora en la cicatrización de ulceraciones locales, y aumento de la susceptibilidad a la infección (Shih et al., 2003).

Cambios en el gusto

La pérdida del gusto probablemente se debe al daño que sufren las microvellosidades y la superficie externa de las células gustativas debido a la terapia. Como se dijo anteriormente, el cambio en el gusto también lleva a la disminución en la alimentación resultando en una pérdida de peso notable y deshidratación, afectando la renovación celular y la migración celular que ocurre durante la cicatrización de la mucosa (Shih et al., 2003).

Modelos animales para evaluar mucositis

A pesar de la severidad y prevalencia de la mucositis, no existe actualmente ningún tratamiento preventivo eficaz. Una dificultad para elucidar el mecanismo de la injuria en la mucosa es la relativa dificultad para la obtención de muestras del tracto alimentario y el procedimiento invasivo. Por lo tanto, para obtener datos longitudinales en múltiples sitios, se deben emplear modelos animales. Además, cualquier potencial agente antimucotóxico debe ser primero sometido a un testeo riguroso en modelos animales para probar su eficacia y seguridad antes de su traslación a ensayos clínicos tempranos (Bowen et al., 2011).

Dentro de los modelos animales de mucositis bucal, el modelo de hámster es uno de los que más significativamente avanzó el estudio de los mecanismos de la mucositis bucal. Fue descrito por primera vez en 1990 y utilizado extensamente por Stephen Sonis y sus colegas (Sonis et al., 1990). En base a sus estudios se describió la hipótesis de los 5 pasos del desarrollo de la mucositis, anteriormente descrita (Ilustración 15) (Sonis 2009). También se describió la flora bacteriana en la cavidad bucal de los hámsters, resultando marcadamente parecida en composición a la de los humanos (Sonis 2009).

Este modelo se utilizó en estudios de radiación de dosis única y fraccionada y de mucositis inducida por la combinación de quimioterapia y radiación (Bowen et al., 2011). En

cuanto al modelo de mucositis inducida por radiación, la administración de una única dosis de 40 Gy (con el resto del animal protegido por un blindaje de plomo) provocó una mucositis ulcerativa. La mucositis clínicamente detectable, en este modelo, ocurre generalmente en el día 6, con un pico de mucositis en los días 14-15. También se estudió la mucositis desarrollada en un protocolo fraccionado, donde se administra una dosis acumulada de 60 Gy, en 8 fracciones de 7,5 Gy cada una, en los días 0-3 y 7-10, con un período de descanso de 3 días entre los días 4 y 6. Este modelo, además, ha sido utilizado para testear varios agentes, incluyendo EGF (Epidermal Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor), IL-11 (Interleuquina-11), KGF (Keratinocyte Growth Factor, palifermin), y FGF (Fibroblast Growth Factor, valifermin), entre otros (Bowen et al., 2011).

Mientras que los modelos animales sin duda presentan ventajas y son indispensables, también tienen dificultades y limitaciones. Podrían existir diferencias entre especies en cuanto a la susceptibilidad a diferentes agentes, y la tradicional dosis medida en “mg/kg” en roedores usualmente no es utilizada en humanos (donde se utiliza dosis por área de superficie corporal). Otros factores que podrían acarrear dificultades en la investigación en animales son el estrés en el animal por aislamiento debido a los protocolos experimentales, la necesidad de anestésiar a los animales para su irradiación y revisión y el efecto que esto tiene sobre la homeostasis de la mucosa, entre otros. Estas limitaciones no restan valor a la investigación en animales de experimentación, pero sí imponen ciertas restricciones y cuidados en la extrapolación de resultados experimentales *in vivo* a un escenario clínico (Bowen et al., 2011).

Clasificación del grado de mucositis en humanos y en hámsters

La clasificación de gravedad más utilizada en investigación es la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) con una escala que combina el aspecto clínico de la mucosa con la capacidad de ingerir alimentos. En cuanto a la clínica, la más utilizada es la escala que forma parte del manual “*Common Toxicity Criteria for Adverse Events*” del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Esta clasificación enfatiza los síntomas del paciente, la capacidad de mantener la ingesta bucal y la necesidad de implementar terapias (Ruiz Esquide et al., 2011).

Sonis et al (2000) publicaron una escala de mucositis para la bolsa de la mejilla del hámster sin cancerizar, para estudiar los mecanismos de la rh-IL-11 como posible atenuador de la mucositis inducida por radiación. Para evaluar la mucositis, los animales fueron anestesiados y se evirtió la bolsa izquierda del animal, expuesta a radiación. A continuación, se detalla cada uno de los grados establecidos:

Grado 0 = Bolsa completamente sana. Sin erosión ni vasodilatación.

Grado 1= Eritema, sin evidencia de erosión mucosa.

Grado 2= Eritema severo, vasodilatación y erosión superficial.

Grado 3= Formación de úlceras en uno o más lugares, pero sin afectar más del 25/ del área superficial de la bolsa. Eritema severo y vasodilatación.

Grado 4= Úlcera coalescente de aproximadamente 50/ del área superficial de la bolsa.

Grado 5= Ulceración casi completa de la mucosa de la bolsa. Pérdida de flexibilidad.

Mucositis asociada al BNCT como tratamiento de tumores de cabeza y cuello

Estudios experimentales en animales y ensayos clínicos en humanos demuestran que el BNCT induce mucositis en las regiones expuestas a la terapia (Kreimann et al., 2001b; Pozzi et al., 2009; Trivillin et al., 2006; Molinari et al., 2011, 2012; Kankaanranta et al., 2007, 2011, 2012).

Estudios desarrollados en nuestro laboratorio en el modelo clásico de cancerización bucal en la bolsa de la mejilla del hámster, demostraron como el tratamiento secuencial de BNCT (BNCT mediado por BPA más BNCT mediado por GB-10, con un intervalo entre irradiaciones de 24hs o 48hs) y un único tratamiento de (GB-10+BPA)-BNCT (ambos tratamientos con una dosis total absorbida de 9 Gy prescrita a tumor), inducen mucositis con desarrollo de úlceras en un 35/ y 60/ de los animales respectivamente (Molinari et al., 2011). La aparición de úlceras también fue reportada con una única aplicación de BPA-BNCT, 4 Gy dosis total absorbida prescrita a tumor, en un 80/ de los animales cancerizados tratados (Molinari et al., 2012).

En un escenario clínico, la mucositis bucal limita la dosis que puede ser administrada para los tumores de cabeza y cuello (Kankaanranta et al., 2007, 2012; Ariyoshi et al., 2007). Por ejemplo, el grupo de Kankaanranta (2007, 2012) trató pacientes con cáncer de cabeza y cuello inoperables, que eran recidivas post radioterapia. Les administraron una doble aplicación de BPA-BNCT, con un intervalo de 3 a 5 semanas. Las dosis equivalentes administradas a tumor resultaron entre 20 y 23 Gy-Eq para la primera y segunda aplicación, resultando en tejidos de la mucosa bucal, mucosa orofaríngea y seno maxilar entre 8-11 Gy-Eq (los factores de CBE correspondientes a la conversión Gy a Gy-Eq para la dosis boro correspondieron a 3,8 para tumor, 2,5 para membranas mucosas y 1,3 para el resto de los tejidos normales). El efecto adverso agudo más frecuente fue mucositis, fatiga y dolor en cuello y cavidad bucal. También se reportaron pacientes con osteoradionecrosis, pero en menor porcentaje. El grupo de Ariyoshi (2007) trató pacientes con recidivas de cáncer bucal y/o metástasis en ganglios linfáticos cervicales, utilizando también BPA como compuesto borado. El tumor recibió un rango de dosis de 22,0 a 8,9 Gy-Eq y el tejido normal, como mucosa bucal y piel, recibieron un rango de 15,3 a 9,1 Gy-Eq y 7,2 a 2,9 Gy-Eq, respectivamente. Registraron mucositis local una semana post irradiación, persistiendo por tres a cinco semanas sin efectos en piel.

Dados todos estos resultados, el estudio de la mucositis generado por el BNCT resulta de gran importancia.

ESTUDIOS REALIZADOS EN NUESTRO LABORATORIO HASTA LA ACTUALIDAD

Nuestro laboratorio propuso y validó, por primera vez, el uso del modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster para estudios de BNCT (Kreimann et al., 2001a). Nuestros estudios iniciales, que se describirán a continuación, fueron los precursores de 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).

Se trabajó con el protocolo clásico de carcinogénesis para la inducción de tumores, basado en la topicación de la bolsa derecha de la mejilla de hámsters sirios (*Mesocricetus auratus*) de 6 a 8 semanas de edad, con 0,1 ml del carcinógeno completo dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) al 0,5% en aceite mineral, 2 a 3 veces por semana durante aproximadamente 12 semanas (Shklar et al., 1979). Este protocolo da lugar al desarrollo de tumores exofíticos (carcinomas de células escamosas) rodeado de tejido cancerizado o tejido con lesiones potencialmente malignas (PMD). Por tratarse de un protocolo de carcinogénesis agresivo, el tejido con PMD da lugar a la rápida formación de abundantes tumores primarios. Una ventaja significativa del modelo se basa en el hecho que los tumores se inducen por un proceso que imita el proceso espontáneo de transformación maligna, y da lugar a la formación de tejido con PMD alrededor de los tumores, a diferencia de aquellos modelos basados en el crecimiento de células transformadas implantadas en un lecho de tejido sano (Trivillin et al., 2006). Desde el punto de vista clínico, resulta interesante estudiar el tejido con PMD circundante al tumor primario tratado, dado que desarrolla segundos tumores primarios que pueden contribuir al fracaso terapéutico (Kankaanranta et al., 2007). Asimismo, la radiotolerancia del tejido con PMD limita la dosis que se puede administrar al tumor (por ejemplo, Trivillin et al., 2006).

Para evaluar, por primera vez, el potencial uso del BNCT en el control de tumores de la mucosa bucal, se empleó este modelo, utilizando el BPA como compuesto borado. Se realizaron estudios de biodistribución inyectando 300, 600 y 1200 mg BPA/kg peso corporal (p.c.), llegando a la conclusión que a las 3,5hs post administración se observa la mayor concentración de boro en tumor y la mejor relación tumor/bolsa normal y tumor/sangre, con valores de concentración de boro terapéuticamente útiles (Kreimann et al., 2001a).

Seguidamente, se demostró en nuestro laboratorio la respuesta a BNCT de los tumores exofíticos desarrollados, inyectándole a los animales 300 y 600 mg BPA/kg p.c. (15,5 y 31 mg¹⁰B/kg p.c. respectivamente), por vía intraperitoneal. En base al trabajo anterior, los animales fueron irradiados a las 3,5hs post administración del BPA con un haz de neutrones epitérmico termalizado en el reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche. La irradiación duró 62 minutos en ambos casos, resultando una fluencia promedio de neutrones térmicos de $(1,1 \pm 0,1) * 10^{12}$ neutrones*cm⁻². En base a los estudios de biodistribución, se estimó una concentración de boro de 30 ppm en tumor y de 10 ppm en tejido normal para realizar los cálculos de dosis. En base al tiempo y a estas concentraciones de boro, se estimó una dosis absorbida equivalente al tumor de 14,9 Gy-Eq (considerando un valor estimado de CBE para

el BPA en tumor de 3,8), mientras que la dosis absorbida equivalente a la bolsa normal se estimó en 7,5 Gy-Eq (considerando un valor estimado de CBE para el BPA en tejido normal de 2,5). Se estimó en 3,2 el valor de RBE de neutrones rápidos y de protones inducidos y en 1 el valor de RBE de fotones gamma. Se evidenció un 78% de remisiones totales y un 13% adicional de remisiones parciales, sin ningún daño significativo a los tejidos normales (Kreimann et al., 2001b).

En base a estos resultados alentadores, se continuaron los estudios de BNCT en este modelo de cáncer bucal. A su vez, se variaron los compuestos borados y sus protocolos de administración. Se realizaron estudios de biodistribución de GB-10 (Heber et al., 2004). Se inyectó por vía intrayugular en bolo GB-10 en una dosis de 50 mg¹⁰B/kg p.c. Con este protocolo, a las 3hs post-administración de GB-10, se observó la mejor combinación de concentración absoluta de boro en tumor y relaciones de concentración de boro tumor/tejido normal y tumor/sangre. También se realizaron estudios de biodistribución combinando GB-10 y BPA, variando la forma de administración y sus concentraciones. Como resultado, se observó que aumentaba notablemente la concentración de boro en el tumor y se conseguía una relación alta tumor/tejido normal y tumor/sangre, cuando se administraban en combinación GB-10 (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.) + BPA (31 mg¹⁰B/kg p.c.). Se inyectó el GB-10 por vía intrayugular, en bolo y el BPA se administró como inyecciones fraccionadas por vía intraperitoneal, simulando una infusión. Estas concentraciones altas de boro se detectaron a las 3hs post inyección intrayugular en bolo del GB-10 y 1,5hs post finalizada la simulación de la infusión del BPA (Heber et al., 2004).

En base a los resultados de este estudio de biodistribución, se evaluó la respuesta tumoral y la potencial toxicidad de BNCT *in vivo* empleando estos protocolos de administración de compuestos borados (Trivillin et al., 2004). Se ensayaron los dos protocolos y, al tiempo en que la biodistribución arrojó las mayores concentraciones de boro en tumor y las mejores relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre, se irradió a los animales con el haz de neutrones del RA-6: (1) GB-10 (50 mg¹⁰B/kg p.c.) irradiando a los animales 3hs post administración del compuesto borado y (2) la combinación GB-10 (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.) + BPA (31 mg¹⁰B/kg p.c.) irradiando a los animales 3hs post inyección del GB-10 y 1,5hs post última inyección de BPA. Un grupo adicional de animales se trató con el haz solo (sin administración previa de compuesto borado) para estudiar el efecto de la dosis de fondo. Para el protocolo GB-10–BNCT las dosis totales absorbidas fueron: tumor: 5,3±0,4 Gy; tejido con PMD: 5,3±0,4 Gy; tejido normal: 4,5±0,3Gy. En cuanto al protocolo (GB-10+BPA)-BNCT las dosis totales absorbidas fueron: tumor: 4,3±0,4 Gy; tejido con PMD: 2,6±0,2 Gy; tejido normal: 2,6±0,2 Gy. La dosis para el grupo haz solo fue 2,82±0,05 Gy.

En este trabajo se demostró un importante control del desarrollo tumoral, obteniéndose, para ambos protocolos, altos porcentajes de remisiones totales y parciales. Lo que resulta quizás más interesante de este trabajo, es que se demostró que en el caso de tumores tratados con BNCT mediado por GB-10, existe un marcado daño en el estroma del tumor (edema, hemorragias) resultado de la rotura de los vasos sanguíneos tumorales aberrantes. Sin embargo, no se observó daño a los vasos sanguíneos del tejido con PMD ni

del tejido normal. Este efecto se observó en menor medida, cuando se empleó la combinación de compuestos borados para BNCT, donde se observa un menor daño a las paredes de los vasos tumorales pero un mayor daño a las células tumorales en sí (Trivillin et al., 2004).

En base a los trabajos descritos, y dada la importancia del “targeting” homogéneo en las distintas poblaciones celulares de los tumores para lograr el éxito terapéutico, se evaluaron potenciales diferencias en la homogeneidad en la distribución de boro entregado por los tres protocolos ya establecidos y descritos anteriormente: GB-10 (50 mg¹⁰B/kg p.c.), BPA (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) y [BPA (31 mg¹⁰B/kg p.c.) + GB-10 (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.)]. Se demostró que la administración combinada de GB-10 y BPA mejora significativamente la homogeneidad en la distribución de boro en tumor (Heber et al., 2006). Asimismo, se evaluó la respuesta tumoral a BNCT mediado por cada uno de estos protocolos empleando dosis más altas de BNCT en el RA-6 (Trivillin et al., 2006) que en el trabajo anterior (Trivillin et al., 2004), ya que no se habían observado efectos radiotóxicos importantes en el tejido limitante de dosis, el tejido con PMD. Se demostró que BNCT mediado por la combinación de compuestos borados indujo un 93% de control tumoral (remisión completa + remisión parcial), frente al protocolo mediado por GB-10 que indujo un 70% de control tumoral. El flujo promedio de neutrones térmicos para el tumor y tejido normal en la posición de irradiación fue de $(3,4 \pm 0,3) \cdot 10^8$ neutrones $\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Para el protocolo GB-10-BNCT las dosis totales absorbidas fueron: tumor: 8 ± 3 Gy; tejido con PMD: 8 ± 2 Gy; tejido normal: $6,7 \pm 0,9$ Gy. En cuanto al protocolo (GB-10+BPA)-BNCT fueron: tumor: 9 ± 3 Gy; tejido con PMD: 5 ± 2 Gy; tejido normal 5 ± 2 Gy. El único efecto radiotóxico que se observó, y que resulta importante recalcar, fue una mucositis reversible en tejido con PMD para los tres protocolos ensayados. No se observaron efectos radiotóxicos en mucosa normal.

Estos dos trabajos (Trivillin et al., 2004, 2006) describen un nuevo paradigma en BNCT. La hipótesis clásica de BNCT plantea que el daño selectivo en tumor se basa en la acumulación selectiva de boro en tumor. En este trabajo se demostró un efecto selectivo de GB-10-BNCT sobre los vasos sanguíneos aberrantes del tumor, preservando los vasos sanguíneos de los tejidos con PMD y normal, a pesar que GB-10 no se deposita selectivamente en tumor. El efecto selectivo sobre los vasos sanguíneos angiogénicos del tumor se debería a su mayor radiosensibilidad debido a su estructura y función alteradas (Carmeliet y Jain, 2000), y redundaría en un daño selectivo al tumor a pesar que el compuesto borado GB-10 no se acumula selectivamente en tumores de la mucosa bucal (Trivillin et al., 2006).

Habiendo demostrado la factibilidad del BNCT como tratamiento de carcinomas de células escamosas en la bolsa de la mejilla del hámster, sin daño a tejido normal, continuamos trabajando en un escenario pre-clínico aplicando BNCT como tratamiento para tumores espontáneos de cabeza y cuello en felinos domésticos terminales. Se realizaron estudios de biodistribución con el compuesto borado BPA, y estudios de BNCT en el reactor RA-1 y en el reactor RA-6. Los animales mostraron un control tumoral parcial y mejoras en su condición clínica, sin radiotoxicidad (Rao et al., 2004; Trivillin et al., 2008).

Nuestro grupo también evaluó algunos aspectos del mecanismo de acción del BNCT sobre los tumores (Aromando et al., 2009, 2010) y la potencialidad terapéutica de nuevos agentes portadores de boro en el modelo de la mejilla del hámster. En cuanto a esto último, se realizaron estudios de biodistribución de una tetrafenilporfirina borada, lipofílica (Kreimann et al., 2003), del compuesto borado BSH (estudios en curso) y de los liposomas borados MAC y MAC-TAC (Heber et al., 2012). Para todos los experimentos se verificaron valores de concentración de boro absolutos en tumor mayores a 30 ppm, demostrando su potencialidad terapéutica, sin toxicidad intrínseca del compuesto.

Recientemente, buscando optimizar la terapia BNCT para el tratamiento de tumores en el modelo de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster, investigamos y demostramos la efectividad terapéutica de un nuevo protocolo de tratamiento de BNCT secuencial, es decir, la aplicación de BPA-BNCT seguido del protocolo GB-10-BNCT, con un intervalo de 24hs o 48hs (Molinari et al., 2011). Además desarrollamos una técnica de normalización de vasos sanguíneos aberrantes en este modelo de cáncer bucal (Molinari et al., 2012), para demostrar, posteriormente, que la administración de los compuestos borados durante la ventana de normalización de los vasos sanguíneos aberrantes potencia la remisión de los tumores de la bolsa del hámster (Molinari et al., 2012) dado que la normalización temporaria de los vasos sanguíneos tumorales mejora la distribución de los compuestos borados en tumor. Otros protocolos ensayados para mejorar la incorporación de boro en la célula, tales como la electroporación y la precarga con L-DOPA, también están siendo actualmente ensayados en nuestro grupo.

Además, nos encontramos actualmente estudiando los valores de eficacia biológica relativa (RBE) y eficacia biológica del BPA (CBE del BPA), en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, para la articulación con los ensayos clínicos en BNCT para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello.

Habiendo demostrado la factibilidad de diferentes protocolos de BNCT en el tratamiento de tumores de cabeza y cuello, ampliamos nuestros estudios a otros modelos tumorales. En el marco del más reciente interés internacional de evaluar el potencial de BNCT para tratar metástasis colorectales de hígado multifocales, bilobulares, no resecables quirúrgicamente (Zonta et al., 2006) estudiamos la potencial radiotoxicidad de BNCT en hígado sano (Cardoso et al., 2007) y demostramos la eficacia terapéutica de BNCT para el tratamiento de metástasis hepáticas en un modelo experimental en rata (Garabalino et al., 2011; Pozzi et al., 2012). Además, nos encontramos desarrollando un modelo de metástasis de adenocarcinoma de colon en pulmón de ratas para estudiar también el potencial terapéutico del BNCT para metástasis pulmonares difusas.

A su vez también, ampliamos nuestros estudios de BNCT a otras enfermedades no tumorales, como la artritis reumatoidea (RA). La aplicación del BNCT como tratamiento de la artritis (BNCS) fue investigado por Yanch et al. (1999) con resultados alentadores. Nuestro laboratorio está iniciando estos estudios en un modelo de artritis reumatoidea en conejos para investigar esta terapia.

En cuanto al cáncer de cabeza y cuello, a pesar de los avances y optimización de los protocolos de BNCT para el tratamiento de este tipo de tumores, nuestro desafío pendiente era lograr la inhibición del desarrollo tumoral a partir de tejido con cancerización de campo, el cual puede originar segundos tumores primarios y/o recidivas que pueden contribuir al fracaso terapéutico (Braakhuis et al., 2003; Kankaanranta et al., 2007). Asimismo, la mucositis radioinducida en el tejido con PMD es potencialmente limitante de la dosis que se puede administrar al tumor. Luego, resulta de gran importancia contar con un modelo que permita abordar el estudio del tejido con PMD. En nuestro laboratorio realizamos estudios iniciales para evaluar la terapia BNCT como potencial inhibidor a *corto* plazo del desarrollo de segundos tumores primarios y/o recidivas en un tejido con PMD, resultante del protocolo clásico de carcinogénesis (Heber et al., 2007). Se trabajó con diferentes protocolos: BPA-BNCT (dosis total absorbida en tejido con PMD: 4 ± 2 Gy); GB-10-BNCT “baja dosis” (dosis total absorbida en tejido con PMD: $5,3\pm 0,4$ Gy) y “alta dosis” (dosis total absorbida en tejido con PMD: 8 ± 2 Gy); (GB-10+BPA)-BNCT “baja dosis” (dosis total absorbida en tejido con PMD: $2,6\pm 0,2$ Gy) y “alta dosis” (dosis total absorbida en tejido con PMD: 5 ± 2 Gy); haz solo “baja dosis” (dosis total absorbida en tejido con PMD: $2,8\pm 0,1$ Gy) y “alta dosis” (dosis total absorbida en tejido con PMD: $4,2\pm 0,1$ Gy). Se reportó una inhibición en el desarrollo de nuevos tumores en tejido con PMD durante una semana post tratamiento, asociando este efecto a una inhibición en la síntesis de ADN. Sin embargo, esta inhibición se pierde a los 14 días post irradiación. A pesar que los resultados fueron alentadores, resultaba evidente que el protocolo clásico de carcinogénesis era sumamente agresivo desde el punto de vista del número y tamaño de los tumores que inducía, y que no representaba adecuadamente el fenómeno de cancerización de campo que se observa en la mucosa bucal humana. Asimismo, la agresividad del modelo no permitía un seguimiento a largo plazo de los animales. Si bien el protocolo clásico de cancerización (topicación con 0,5% DMBA en aceite mineral, 2 a 3 veces por semana durante 12 semanas) resultaba adecuado para estudiar el efecto de BNCT sobre los tumores, no resultaba adecuado para estudiar el potencial efecto inhibitorio sobre el desarrollo de segundos tumores primarios y/o recidivas a *largo* plazo a partir de tejido con PMD.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las dificultades de la remoción quirúrgica completa en los casos avanzados de carcinomas de células escamosas de mucosa bucal y la complejidad del manejo terapéutico del campo cancerizado aumentan la probabilidad de recidivas y/o el desarrollo de segundos tumores primarios, reduciendo el tiempo de supervivencia del paciente (por ejemplo, Kankaanranta et al., 2007). Asimismo, la falta de selectividad de daño de la quimioterapia y la radioterapia como terapias antineoplásicas, promueve el interés de evaluar terapias alternativas más efectivas y menos tóxicas, capaces de dañar selectivamente las células tumorales, preservando el tejido normal. Las características de BNCT en cuanto a “targeting” biológico capaz de dañar poblaciones tumorales no identificables macroscópicamente, y su capacidad de inducir daño selectivo en tumor, dio lugar a estudios en nuestro laboratorio que demostraron la eficacia terapéutica de BNCT para el tratamiento de tumores en el modelo de cáncer bucal en hámster. Sin embargo, la inhibición del desarrollo tumoral a partir de tejido con PMD era aún un problema sin resolver. Asimismo, la mucositis en el tejido con PMD limita la dosis que se puede administrar. Dentro de este marco, el objetivo del presente trabajo fue estudiar, a nivel experimental, la eficacia terapéutica del BNCT en cuanto a la inhibición del desarrollo de segundos tumores primarios y/o recidivas en un tejido con cancerización de campo y sus posibles efectos radiotóxicos. Estos estudios debían realizarse en un modelo animal que recapitule los eventos secuenciales involucrados en el desarrollo del cáncer y precancer bucal humano, y pudiera desarrollar aquellos efectos colaterales observados durante el tratamiento con BNCT de tumores de cabeza y cuello.

El protocolo clásico de carcinogénesis, adecuado para los estudios de control tumoral a *corto* plazo, es inadecuado para estudios de tejido con PMD a *largo* plazo. Este protocolo es agresivo, no representa adecuadamente el fenómeno de cancerización de campo que se observa en la mucosa bucal humana e impide el seguimiento de los animales a *largo* plazo. Por lo tanto, el objetivo inicial fue desarrollar un modelo de tejido con PMD en la bolsa de la mejilla del hámster que permitiera un seguimiento a *largo* plazo.

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar a largo plazo (8 meses) la posible radiotoxicidad y el potencial inhibitorio de diferentes protocolos de BNCT sobre el desarrollo de segundos tumores primarios y/o recidivas a partir de un tejido con PMD, en un modelo de cancerización de campo para seguimiento a largo plazo. Nos propusimos contribuir al conocimiento de la radiobiología de BNCT a nivel experimental para el tejido con cancerización de campo buscando optimizar la técnica para el tratamiento integral del cáncer bucal.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos principales:

- Desarrollar un modelo de tejido con PMD en la bolsa de la mejilla del hámster que permita un seguimiento a *largo* plazo.

- Realizar, en este modelo, estudios de biodistribución con aquellos compuestos borados [GB-10, BPA, (GB-10+BPA)] y protocolos de administración que resultaron exitosos en el tratamiento de tumores generados con el protocolo clásico de carcinogénesis, para evaluar su potencial terapéutico y posible radiotoxicidad.

- Realizar estudios de inhibición del desarrollo tumoral y radiotoxicidad en tejido con PMD de una *única* aplicación de BNCT *in vivo* empleando distintos protocolos (basados en los resultados de los estudios de biodistribución) en el modelo de tejido con PMD desarrollado, empleando el haz de neutrones epitérmico termalizado del reactor nuclear RA-6, sito en el Centro Atómico Bariloche.

- Realizar estudios de inhibición del desarrollo tumoral y radiotoxicidad en tejido con PMD de una *doble* aplicación de BNCT *in vivo* empleando aquellos protocolos terapéuticamente efectivos en el estudio de una *única* aplicación (RA-6), utilizando la facilidad construida en el reactor nuclear RA-3, sito en el Centro Atómico Ezeiza. A su vez, en base a los resultados obtenidos, evaluar nuevos protocolos de *doble* BNCT, variando las dosis absorbidas e intervalos entre irradiaciones, para mejorar el efecto terapéutico y reducir los posibles efectos radiotóxicos.

- Analizar la radiotoxicidad de cada uno de los protocolos ensayados (*única* y *doble* aplicación de BNCT) en tejido normal.

Los objetivos se plantearon teniendo en cuenta las siguientes hipótesis de trabajo:

- La incorporación de cantidades terapéuticamente útiles de boro por el tejido con PMD en el modelo de cancerización de campo en la bolsa de la mejilla del hámster, permite plantear la hipótesis que el BNCT inhibirá el desarrollo de tumores a partir del tejido con PMD.

- Estudios previos por nuestro laboratorio demostraron que los protocolos de BNCT empleados inducen control tumoral sin daño al tejido normal y sin exceder la radiotolerancia del tejido con PMD en el modelo de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster para estudios a *corto* plazo. Estos hallazgos permiten plantear la hipótesis que existirá un protocolo de BNCT capaz de inducir control tumoral e inhibir el desarrollo tumoral a partir del tejido con PMD sin daño al tejido normal y sin exceder la radiotolerancia del tejido con PMD.

- Uno de los mecanismos involucrados en el efecto de BNCT sería la inhibición en la síntesis de ADN.

- La aplicación *doble* de BNCT permitiría la inhibición de aquellos focos tumorales que resultaron ser refractarios ante una *única* aplicación de BNCT.

- El escalado de dosis favorecería el efecto terapéutico pero podría aumentar la radiotoxicidad en tejido con PMD.

- El fraccionamiento de la dosis de BNCT reduciría la toxicidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Desarrollo y caracterización del modelo de cancerización de campo para estudios de BNCT a *largo* plazo.

Breve resumen

Tal como se explicó en la sección introductoria, se demostró el éxito terapéutico de una *única* aplicación de BNCT mediado por borofenilalanina (BPA), GB-10 ($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) o (GB-10 + BPA) en el tratamiento de tumores de la bolsa de la mejilla del hámster, sin radiotoxicidad en el tejido normal expuesto (Kreimann et al., 2001b; Trivillin et al., 2004; Trivillin et al., 2006; Pozzi et al., 2009). Sin embargo, el gran desafío sin resolver era controlar el tejido con cancerización de campo, frecuentemente responsable del fracaso terapéutico (Smith y Haffty, 1999). Además, en el modelo experimental de cáncer bucal, este tejido con PMD resulta limitante de dosis (ej. Trivillin et al., 2006), y debe ser evaluado como tal cuando se analiza la seguridad de un protocolo de BNCT para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello.

Con el propósito de estudiar el potencial inhibitorio de BNCT sobre el desarrollo de tumores en el tejido con cancerización de campo y la radiotoxicidad en este tejido limitante de dosis, se realizó un estudio a *corto* plazo de la eficacia de BNCT en el control del tejido con PMD que rodea a los tumores (Heber et al., 2007). Aunque los resultados fueron alentadores, la marcada agresividad de este protocolo de carcinogénesis solo permite estudios de control tumoral y de tejido con PMD a *corto* plazo (1 mes) y no representa adecuadamente el fenómeno de cancerización de campo que se observa en la mucosa bucal humana. Asimismo, no permite el seguimiento de los animales a *largo* plazo.

Luego, con el objetivo de encontrar aquel protocolo de carcinogénesis que permitiera el estudio del tejido con PMD a *largo* plazo (8 meses), que desarrollara tumores en la gran mayoría de los animales (90%) a *largo* plazo (8 meses) y que simulara más cercanamente lo que sucede en la boca humana a nivel de tejido con cancerización de campo durante el proceso de carcinogénesis, evaluamos diferentes protocolos de carcinogénesis. Para cada protocolo se evaluó la condición clínica del animal para analizar la factibilidad de un seguimiento a *largo* plazo y si el tejido teóricamente con PMD efectivamente era capaz de dar lugar al crecimiento tumoral en la gran mayoría de los casos.

Ia. Protocolos de cancerización

Se evaluaron 5 protocolos de carcinogénesis que consistieron en la aplicación tópica del carcinógeno dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) (Sigma Aldrich) al 0,5% en aceite mineral (Sigma Aldrich) en la bolsa de la mejilla derecha de hámsters sirios (*Mesocricetus auratus*) de 6 a 8 semanas de edad:

- Dos veces por semana durante 4 semanas,
- Dos veces por semana durante 6 semanas,
- Dos veces por semana durante 7 semanas,

- Dos veces por semana durante 8 semanas,
- Tres veces por semana durante 12 semanas: corresponde al “protocolo clásico de cancerización”, utilizado en nuestros estudios de BNCT de control tumoral a *corto* plazo citados anteriormente (por ej. Trivillin et al., 2006).

Ib. Seguimiento

Estado general de los animales

Se evaluó la factibilidad del seguimiento a *largo* plazo (8 meses: T32 ó 32 semanas) de los animales, en función de su estado clínico general. Los animales se pesaron semanalmente durante 8 meses. Se calculó el *peso promedio ± desvío estándar* y el *promedio del porcentaje de cambio de peso ± desvío estándar*, para cada tiempo evaluado.

Para desarrollar estos estudios se respetaron las normas locales e institucionales que aseguran la ética y bienestar del animal durante toda la investigación.

Cinética del desarrollo tumoral

Se evaluó el desarrollo tumoral, mediante la eversión y examinación macroscópica de la bolsa de la derecha de los hámsters, comenzando una semana después de finalizada la topicación. Este tiempo se tomó como **T0**. Se consideró como tumor a aquel crecimiento macroscópico (con características macroscópicas de tumor) que hubiera alcanzado, en algún tiempo durante el período de seguimiento, 1 mm³ de volumen. El volumen tumoral se calculó como el producto de los 3 diámetros ortogonales mayores medidos con calibre digital: ancho*largo*alto (Trivillin et al., 2006). Este criterio se basó en estudios subjetivos de correlación entre hallazgos macroscópicos de crecimiento “tumoral” y las correspondientes características histológicas. Este análisis fue realizado en forma independiente por especialistas en análisis anátomo-patológico.

Los parámetros estudiados para caracterizar el modelo de cancerización de campo o tejido con PMD a nivel macroscópico fueron:

- *Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores* a diferentes tiempos de evaluación. Aquellos animales que se sacrificaron para estudios de síntesis de ADN o murieron antes de culminar el período de seguimiento, pero que habían desarrollado tumores previamente a su muerte, fueron incluidos dentro del grupo que desarrolló tumores hasta el último tiempo de seguimiento.
- *T50 y T80* (tiempo al cual el 50/ y 80/ de los animales presentan tumores, respectivamente).
- *Porcentaje de animales con al menos un tumor grande (>10 mm³).*
- *Incidencia de remisiones espontáneas* (medido como el porcentaje de tumores que remitieron del total de tumores que presentaron los animales que cumplieron el período de seguimiento correspondiente al protocolo evaluado).

Síntesis de ADN

En cuanto al análisis a nivel histológico, se evaluó la síntesis de ADN en tejido con PMD en términos de la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). La bromodeoxiuridina (BrdU) es un análogo de la timidina que se incorpora específicamente en el ADN. Aquellas células que se encuentren en síntesis de ADN (células en fase S del ciclo celular) incorporarán BrdU en el ADN, reemplazando a la timidina.

El protocolo consistió en la inyección, por vía intraperitoneal, en bolo, treinta minutos antes del sacrificio de los animales, de 2 ml de una solución de BrdU (10 mg BrdU/ml) en agua destilada. Posteriormente, se extrajo la bolsa derecha –cancerizada- y la izquierda –normal- y se colocaron en formaldehído 10% - PBS para su fijación. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 µm para luego realizar la técnica inmunohistoquímica de la peroxidasa-antiperoxidasa (Sternberg et al., 1970). Seguidamente, se realizó la recuperación antigénica con 0,1 M de buffer citrato a pH 6, en microondas, y para la detección de BrdU se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU (clon IIB5; Biogenex, San Francisco, CA, USA) y el kit de biotina-streptavidina-peroxidasa (Kit Multilink; Biogenex).

Para el análisis histológico, se realizaron tinciones de contraste con hematoxilina-eosina para que los núcleos positivos que se observan marrones (dado que presentan depósitos de diaminobenzidina por haber incorporado BrdU), contrasten contra los núcleos teñidos con hematoxilina, negativos, que se observan azules. El conteo de núcleos positivos fue realizado con un microscopio de luz blanca, a 400X. A lo largo de todo el corte (1 corte por animal), en campos sucesivos, se contaron todos los núcleos marrones suprayacentes a 300 µm de membrana basal del epitelio. Para ello, se utilizó una grilla de 300 µm colocada en el ocular, disponiéndola sobre la membrana basal (Heber et al., 2007).

Se evaluaron 8 a 14 animales por protocolo de carcinogénesis. Se midió una sección de la bolsa por hámster. Previamente, se verificó que todas las lesiones histológicas descritas en el tejido con PMD inducido por el protocolo clásico (12 semanas de topicación) también se encontraban en el tejido con PMD inducido por el protocolo de 6 semanas de topicación. Estas son: NUMF (No Unusual Microscopic Features o sin características microscópicas inusuales), hiperplasia y displasia (Heber et al., 2007). Para cada una de las categorías, se contabilizaron los núcleos positivos y se calculó el *promedio de núcleos BrdU positivos por campo ± desvío estándar*, para cada grupo experimental. Se contabilizaron todos los campos correspondientes a cada categoría histológica. El número de campos correspondientes a cada categoría histológica varía de bolsa en bolsa, de modo que también se ve afectado el número de campos.

Se seleccionaron para su evaluación los protocolos y tiempos de mayor relevancia:

- T0 para los protocolos de 6 y 12 semanas de topicación;
- 8 meses post-T0 para el protocolo 6 semanas (los animales tratados con el protocolo de 12 semanas no pudieron seguirse más allá de los 30 días post-T0).

De la misma forma se evaluó la síntesis de ADN en tejido tumoral (cuando fue posible), 8 meses post-T0 para el protocolo de 6 semanas. Se compararon con los valores a T0 correspondientes al protocolo de 12 semanas previamente reportado por Aromando et al. (2009) (a T0 el material disponible para análisis histológico de tumores correspondientes al protocolo de 6 semanas era muy escaso y, como previamente ya se destacó, el protocolo de 12 semanas no puede ser evaluado a *largo* plazo). Para la evaluación del tejido tumoral, se utilizó un software adaptado de un programa estándar morfométrico para contabilizar los núcleos marrones y azules. Diez campos (255 μm x 185 μm) seleccionados al azar fueron medidos a 200X de magnificación en una sección de cada tumor. Cada campo evaluado contenía aproximadamente 200 ± 100 células tumorales. Se calculó el *índice de proliferación (PI)* como el porcentaje de la relación entre células BrdU-positivas y el total de células contabilizadas. Los valores correspondientes a la bolsa normal (no cancerizada) fueron obtenidas de las series de bolsas contralaterales, no cancerizadas, que sirvieron como controles en estudios anteriores de nuestro grupo (Heber et al., 2007).

Para todos los casos, secciones adyacentes teñidas con hematoxilina-eosina fueron utilizadas para análisis histológico.

Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias en la síntesis de ADN entre los diferentes protocolos de carcinogénesis y tiempos de seguimiento fue evaluada mediante la prueba *t-Student* desapareado. La significancia estadística de las diferencias en la síntesis de ADN entre las categorías histológicas de tejido con PMD fue evaluada con ANOVA simple. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,05$.

II. Estudios de biodistribución y BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *única* aplicación de BNCT, utilizando una dosis total absorbida de 4 Gy a tejido con PMD (Potentially Malignant Disorders: lesiones potencialmente malignas)

Breve resumen

El objetivo consistió en realizar, en el modelo de tejido con PMD, estudios de biodistribución utilizando aquellos compuestos borados [BPA, (GB-10+BPA), GB-10] y protocolos de administración que, empleados como portadores de boro para BNCT, fueron efectivos en controlar los tumores desarrollados por el protocolo clásico de cancerización (Kreimann et al, 2001b; Trivillin et al, 2004, 2006; Pozzi et al, 2009). Una vez corroborada la potencialidad terapéutica de estos protocolos de administración de compuestos borados en este modelo, se planeó realizar estudios de inhibición del desarrollo tumoral y radiotoxicidad de una *única* aplicación de BNCT *in vivo* mediado por estos protocolos de administración de compuestos borados.

IIa. Estudios de biodistribución

Resulta indispensable conocer el contenido de boro en los tejidos para realizar los cálculos dosimétricos previos al BNCT. Con este objetivo, se realiza un estudio de biodistribución previo para conocer su concentración en diferentes tejidos y sangre del animal o del paciente, una vez inyectado el compuesto borado, a tiempos pre-determinados post inyección. De esta forma se puede identificar el intervalo de tiempo que maximice la concentración absoluta de boro en tumor y la relación de concentración de boro en tumor versus tejido normal y tumor versus sangre. Este intervalo de tiempo se seleccionará para realizar la irradiación con neutrones.

Un estudio de biodistribución a nivel experimental consiste en administrar el o los compuestos borados por vía intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.), como infusión o en bolo, según el/los compuestos a utilizar. Al comienzo de la administración y a diferentes tiempos post inyección (para distintos lotes de animales), se toman muestras de sangre, tejido (tumoral, tejido con PMD y normal), así como también pequeñas muestras de diferentes órganos de referencia. De esta manera, podemos determinar la cantidad absoluta de boro en dichos órganos, tejidos y sangre y calcular las relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre. En el caso de los estudios de biodistribución en pacientes, se toman las muestras que son compatibles con la práctica clínica.

En base a estos resultados, podremos:

- Calcular las dosis absorbidas que recibirán el tumor y el resto de los tejidos limitantes de dosis durante el BNCT, empleando distintos tiempos de exposición al haz de neutrones.
- Determinar el tiempo óptimo post-administración del compuesto borado en el cual se logra la mayor concentración absoluta de boro en tumor así como también las mejores relaciones *tumor/tejido normal* y *tumor/sangre*.

En el caso de los estudios de biodistribución en pacientes, se realizan en ocasión de una cirugía para extirpar la masa tumoral mayoritaria. En el momento del tratamiento con BNCT del tumor remanente, se ajusta “online” el tiempo de irradiación mediante la toma de muestras de sangre y rápida medición de la cantidad de boro en sangre. En cambio, la cantidad de boro en los tejidos y órganos es más difícil de medir, pues no se pueden tomar muestras de tejido tumoral y normal durante la irradiación. Lo que se hace entonces es considerar que las concentraciones de boro en los tejidos y órganos guardan la misma relación con la sangre a la obtenida en los estudios de biodistribución previos. De esta manera se ajusta el tiempo de irradiación y, por lo tanto, la fluencia de neutrones. Las relaciones de concentración de boro dependerán del tipo de tumor y compuesto borado. Por ejemplo, para el BPA, existen varios estudios que apoyan que la relación de concentración de boro tumor/sangre es 3,5:1 (Gonzalez et al., 2004b; Henriksson et al., 2008; Kankaaranta et al., 2012).

En el caso de animales de experimentación, se asumen como válidos los valores de concentración de boro obtenidos en estudios de biodistribución previos en grupos adicionales de animales y no se realiza un ajuste de tiempo de irradiación “online”. Para esta tesis, los tiempos post-administración de compuestos borados seleccionados para realizar las irradiaciones se basan en estudios de biodistribución previos en nuestro laboratorio, en el modelo de cancerización clásico de la mejilla del hámster (Kreimann et al., 2001a; Heber et al., 2004). Se calcularon los valores absolutos de contenido de boro (*promedio de valores de todas las muestras de los animales analizados \pm desvío estándar*) en sangre, tejido con PMD y normal, y las relaciones *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* para cada uno de los protocolos [BPA; (GB-10+BPA); GB-10].

A continuación se detalla la preparación de las soluciones de compuesto(s) borado(s), su administración, procesado de tejidos y medición de boro:

Protocolo de administración de BPA

Para el estudio de biodistribución, se administró una solución 0,14 M de BPA-fructosa como una inyección en bolo intraperitoneal en una dosis de 15,5 mg¹⁰B/kg de peso corporal (p.c.). Se tomaron muestras de sangre y tejidos 3hs post-administración del BPA para su posterior medición en el ICP-OES (Espectrómetro de Emisión Óptico por Plasma Inductivo, modelo Perkin-Elmer Optima 3100 XL UV, axial: *ver descripción más abajo*) de acuerdo con los estudios previos de nuestro grupo (Kreimann et al., 2001a).

La solución 0,14 M de BPA-fructosa se preparó utilizando agua miliQ y p-borofenilalanina (BPA, L- enantiómero, >98 / enriquecida en ¹⁰B de Boron Biologicals, Inc. Raleigh, NC) conteniendo 4,9/ de ¹⁰B 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 a pH 10 para que todos los sólidos se solubilizaran. Esta

solución se agitó durante 20 minutos. Finalmente, el pH de la solución se ajustó 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 esterilizó 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 no se almacenó por más de una semana para evitar la posible aparición de precipitados.

Protocolo de administración de GB-10

Para el estudio de biodistribución, se administró una dilución 1:10 en agua miliQ de una solución stock de GB-10 (100 mg ¹⁰B/ml) (donación de “Neutron Therapies, L.L.C., USA”, isotópicamente enriquecido en un 99% en ¹⁰B) en una dosis de 50 mg¹⁰B/kg p.c. como una inyección en bolo en la vena yugular expuesta quirúrgicamente en animales anestesiados, vía intraperitoneal, con una mezcla de ketamina (140 mg/kg p.c.) y xilazina (21 mg/kg p.c.). Se tomaron muestras de sangre y tejidos 3hs post-administración del GB-10 para su posterior medición en el ICP-OES de acuerdo a estudios previos de nuestro laboratorio (Heber et al., 2004).

Protocolo de administración de la combinación (GB-10+BPA)

Para el estudio de biodistribución, el GB-10 (dilución 1:10) se administró en bolo por vía intrayugular en una dosis de 34,5 mg ¹⁰B/kg p.c. El BPA-fructosa (0,14 M) se administró en una dosis total de 31 mg¹⁰B/kg p.c. como nueve inyecciones, cada 20 minutos, intraperitoneales, para simular una infusión. Se tomaron las muestras de sangre y tejidos 3hs post-administración de GB-10 y 1,5hs después de la última inyección de BPA de acuerdo a estudios previos de nuestro laboratorio (Heber et al., 2004).

Procesado de las muestras de sangre y tejidos para ser analizados en el ICP-OES

Sangre. Las muestras de sangre (200-300 µl) se extrajeron bajo anestesia de la vena yugular con una jeringa con heparina. Posteriormente, estas muestras se pesaron y almacenaron a 4°C hasta su procesamiento para su medición en el ICP-OES. Para medirlas en el ICP-OES, se digirieron toda la noche a temperatura ambiente ó a 60°C por 1h en 1 ml de una mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico (Merck) y ácido nítrico (Biopack). Luego de la digestión, y una vez que se comprobó que la solución estaba límpida y de un color amarillento, se agregaron 3 ml de una solución al 5% de detergente tritón X-100 y 1 ml de la mezcla de itrio y estroncio como patrón interno. De esa solución, se extrajo 1 ml para ser medido por ICP-OES.

La concentración de boro se expresó como partes por millón (ppm) de boro o µg de boro/g de muestra:

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

El factor de multiplicación 5 se debe a que, previo a la medición de ^{10}B en sangre, se debe diluir la muestra 5 veces.

Tejidos y órganos. Las muestras de tejidos y órganos se pesaron (30 a 50 mg) y digirieron toda la noche a temperatura ambiente ó a 60°C por 1h en 0,2 ml de una mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico (Merck) y ácido nítrico (Biopack). Luego de la digestión, la solución se observó límpida y de color amarillento. A esta mezcla, se le agregó un volumen de 600 μl de una solución al 5/ de detergente tritón X-100, y 200 μl de una mezcla de itrio y estroncio como estándar interno. Inmediatamente antes del análisis por ICP-OES la mezcla se sonicó durante 15 minutos (Coderre et al., 1998).

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

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

Para todos los casos (medición de concentración de boro en sangre, tejidos y órganos seleccionados), el paso de digestión es muy importante ya que permite que el boro esté disponible para su medición. Más aún, una digestión insuficiente da lugar a la presencia de partículas que pueden tapar el nebulizador del ICP-OES y alterar la medición. En este sentido es importante el uso de un patrón interno, un elemento de concentración conocida que se agrega a cada una de las muestras (el cual no está presente naturalmente en ellas) y que funciona como un control para saber si la muestra ingresó correctamente al área de detección. En este caso, el patrón interno que se usó fue la mezcla de itrio y estroncio descripta. El patrón que se utiliza generalmente es el itrio, siendo sus líneas (iónicas): 371,029 nm y 324,227 nm. El segundo estándar, el estroncio, se evalúa solo en casos particulares. Para realizar el análisis de boro, se estudiaron 4 líneas atómicas: 249,772 nm, 249,677 nm, 208,957 nm, 208,889 nm de las cuales las dos primeras son las de mayor intensidad. Se tomó la segunda línea para realizar los cálculos ya que la primera puede estar interferida por hierro (Fe). Se realizó una curva de calibración cada día de medida y se utilizaron soluciones estándar de ácido bórico (Merck de 5000 ppm). El límite de detección en tejidos fue de 0,06 $\mu\text{g B/g}$ de tejido (ppm). El límite de determinación fue de 0,18 ppm.

Breve Descripción del Espectrómetro de Emisión Óptica por Plasma Inductivo (ICP-OES)

En un ICP-OES (Ilustración 16) la muestra usualmente se ingresa en el instrumento como un flujo de líquido. Dentro del equipo, el líquido es convertido a un aerosol a través de un proceso conocido como nebulización. La muestra, en forma de aerosol, es entonces transportada al plasma (cualquier volumen de gas, que emite radiación, consistente en una mezcla de partículas neutras -átomos y moléculas- y una fracción significativa de partículas cargadas -iones y electrones-) donde es desolvatada (remoción del solvente o del aerosol que contiene la muestra generando partículas microscópicas de sales), vaporizada

(descomposición de las partículas de sal en un gas de moléculas individuales), atomizada (disociación en átomos individuales) y/o ionizada por el plasma. Los iones y átomos excitados en el plasma emiten luz de diferentes longitudes de onda (espectro de emisión) que posteriormente son captadas y medidas en el espectrómetro que forma parte del equipo. La radiación policromática debe ser separada en longitudes de onda individuales para identificar cada elemento y medir la intensidad sin interferencias de otras longitudes de onda próximas. Dicha separación de la luz se realiza mediante un policromador cuya ventaja es poder separar y medir distintas longitudes de onda al mismo tiempo y por lo tanto, con un mismo volumen de muestra, se puede establecer y cuantificar la presencia de diferentes elementos en forma simultánea (Adaptado de <http://www.eaglabs.com/mc/inductively-coupled-plasma-spectroscopy.html>).

La muestra es analizada en forma cualitativa y cuantitativa. Para el análisis cualitativo, es necesario detectar las longitudes de onda características del elemento y, en general, deben leerse al menos tres líneas espectrales para garantizar que la emisión observada no esté interferida. Estas líneas espectrales seleccionadas no deberían estar interferidas por la emisión de otros elementos presentes en la muestra. Si una línea está interferida, ésta debería excluirse del análisis. Para determinar la cantidad de elemento presente en la muestra (análisis cuantitativo), es necesario realizar una curva de calibración relacionando la intensidad de la emisión de luz de alguna de las líneas espectrales con la concentración del elemento, que es una función lineal creciente. Para dicha curva se utilizan soluciones estándar de concentraciones conocidas y se mide en el ICP-OES la intensidad de emisión característica de la señal para el elemento en cuestión. Cuando se mide una muestra incógnita, la intensidad encontrada se compara con la intensidad del elemento de la curva de calibración y de esta forma se calcula la concentración del elemento en la muestra (Adaptado de <http://www.eaglabs.com/mc/inductively-coupled-plasma-spectroscopy.html>).

Ilustración 16. Espectrómetro Óptico de Emisión por Plasma Inductivo (ICP-OES) (Centro Atómico Constituyentes, CNEA).



IIb. Estudios radiobiológicos

En este estudio los animales recibieron una *única* aplicación de BNCT (“*Single*” BNCT) a una dosis total absorbida de 4 Gy, prescripta a tejido con PMD. Por ésta razón los protocolos se rotularon “SBNCT”. Los grupos experimentales evaluados fueron:

Grupo 1 [SBPA-BNCT]: 10 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración.

Grupo 2 [SGB-10-BNCT]: 10 hámsters cancerizados inyectados con GB-10 (1:10) (50 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración.

Grupo 3 [S(GB-10+BPA)-BNCT]: 10 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (31 mg¹⁰B/kg p.c.) y GB-10 (1:10) (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.), tal como fue descrito anteriormente en los estudios de biodistribución, e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración de GB-10 y 1,5 horas después de la última inyección de BPA.

Grupo 4 [SHaz solo]: 10 hámsters cancerizados irradiados con el haz de neutrones solamente (sin inyección previa de compuesto/s borado/s) para estudiar el efecto de la radiación de fondo. Las irradiaciones con “haz solo” fueron realizadas a la mayor fluencia de neutrones (o mayor tiempo de exposición) utilizada en las irradiaciones con los otros tres protocolos. Esta fluencia corresponde al protocolo GB-10-BNCT.

Grupo 5 [Control]: 88 hámsters cancerizados, sham-irradiados, igualados por edad y tiempo de seguimiento.

La diferencia en cantidad de animales del grupo control frente al resto de los grupos experimentales se debe a que se unificaron, en un único grupo, todos los animales controles evaluados a lo largo de este trabajo de tesis. Este grupo control, se utilizó en los diferentes experimentos que serán descritos a lo largo de esta tesis.

Los animales y los investigadores se trasladaron en avión al Centro Atómico Bariloche (CAB) para realizar irradiaciones en el reactor nuclear RA-6 (Ilustración 17, Ilustración 18A y B), realizando el experimento en tres días sucesivos. El reactor RA-6 (Centro Atómico Bariloche, CNEA) es un reactor de investigación de tipo pileta, refrigerado y moderado con agua liviana. Cuando se realizaron las irradiaciones que se describirán a continuación, su núcleo estaba formado por elementos combustibles de uranio enriquecido al 90/ en ²³⁵U (Longhino y Blaumann, 2010). Proveía un haz mixto (térmico y epitérmico) denominado hipertérmico a una potencia de 500 kW. El flujo neutrónico térmico era de $1 \cdot 10^9 \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, con un alcance de 1 cm de profundidad en tejido, aproximadamente (Gonzalez et al., 2004a).

A partir del año 2008, el reactor no estuvo disponible para nuevas irradiaciones. En el marco de la Iniciativa Mundial de la Reducción de la Amenaza Global, se firmó un tratado de

cooperación entre CNEA y DOE (Department of Energy, USA) para iniciar la conversión del reactor RA-6 de alto a bajo enriquecimiento de uranio. Esta iniciativa brindó la oportunidad de aumentar la potencia del reactor a 3 MW, aunque las configuraciones temporales recomiendan su funcionamiento a 1 MW (Longhino y Blaumann, 2010).

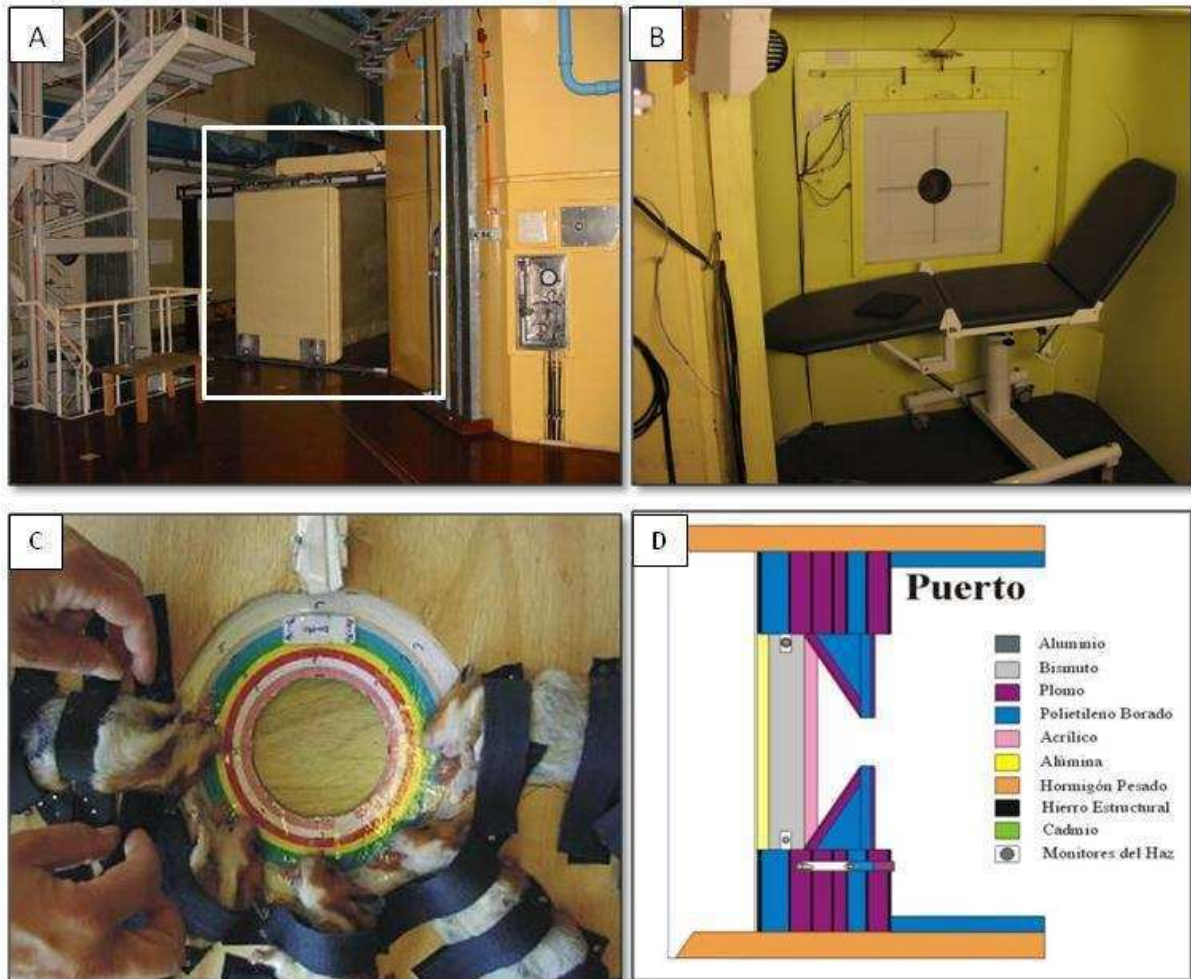
Ilustración 17. Reactor nuclear RA-6, Centro Atómico Bariloche (Centro Atómico Bariloche, CNEA), provincia de Río Negro, Argentina.



Los animales cancerizados fueron tratados una semana después de finalizado el protocolo de carcinogénesis (**T0**). Previo a la irradiación, los animales fueron pesados y revisados para observar cuál era el aspecto de la bolsa y para contabilizar, medir y localizar los tumores que existieran antes del tratamiento. Para el momento de la irradiación, los animales fueron anestesiados vía i.p. con la mezcla ketamina/xilazina (140 mg ketamina/kg p.c. y 21 mg xilazina/kg p.c.). En el caso de los protocolos que incluyen GB-10, los animales fueron anestesiados 3hs antes de la irradiación para la inyección de GB-10. Por ello, se utilizó una dosis de anestesia algo menor para irradiar estos animales (110 mg ketamina/kg p.c. y 16 mg xilazina/kg p.c.).

La Ilustración **18A** y **B** muestran la sala de irradiación. Para la irradiación local de las bolsas de la mejilla derecha de los hámsters, se evirtieron y extendieron para luego ser pegadas con cinta adhesiva en el lugar indicado del dispositivo de irradiación (Ilustración **18C**). Resultó inevitable que parte de la cabeza quedara colocada también en el puerto del haz (el cual mide 15 cm de diámetro) (Ilustración **18D**). El resto del cuerpo quedó blindado por el plomo y polietileno borado del delimitador del haz de neutrones (Ilustración **18D**).

Ilustración 18. (A) Exterior de la sala de irradiación (recuadro blanco); **(B)** Interior de la sala de irradiación mostrando el puerto del haz (visto de frente) y la camilla empleada para el tratamiento de pacientes; **(C)** Disposición de los animales para ser irradiados, con sus bolsas expuestas, ubicados en el puerto del haz (visto de frente). La circunferencia externa del dispositivo corresponde al diámetro de salida del haz de neutrones y los colores marcan un gradiente de dosis; **(D)** Puerto del haz y blindaje: Sección transversal de la geometría del reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche. El diámetro del haz de 15 cm quedó delimitado por un blindaje de polietileno borado y una capa de plomo.



El flujo promedio de neutrones térmicos en la posición de la bolsa de la mejilla del hámster resultó $(3,4 \pm 0,3) \cdot 10^8 \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{seg}^{-1}$. El tiempo de irradiación y dosis totales absorbidas se muestran en la Tabla 3. En la Tabla 4, se muestran las dosis absorbidas (Gy) para cada una de las diferentes componentes de radiación, para cada uno de los protocolos. El cálculo del tiempo de exposición a la radiación se realizó, para cada protocolo, en base a la dosis total absorbida y las dosis absorbidas de cada componente de dosis toleradas por la bolsa normal y tejido con PMD de la mejilla del hámster, la cabeza y el cuerpo de los animales. A su vez, se tomaron en consideración las dosis totales absorbidas que resultaron terapéuticamente efectivas en tumor en estudios anteriores (Kreimann et al., 2001b, Trivillin et al., 2006). Asimismo, como fue descrito anteriormente, se tuvo en cuenta la

concentración de boro de cada tejido obtenido en los estudios de biodistribución. En resumen, se buscó emplear un tiempo de irradiación para cada protocolo [SBPA-BNCT, S(GB-10+BPA)-BNCT y SGB-10-BNCT] tal que las dosis resultantes a los tejidos normal y con PMD no fueran radiotóxicas, que la dosis resultante al tejido tumoral (si se empleara en un modelo para estudiar control tumoral) fuera efectiva terapéuticamente y que la dosis resultante al tejido con PMD ejerciera un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de recidivas y/o segundos tumores primarios.

Tabla 3. Tiempos de irradiación (min.) y dosis totales absorbidas en tejido con PMD y normal.

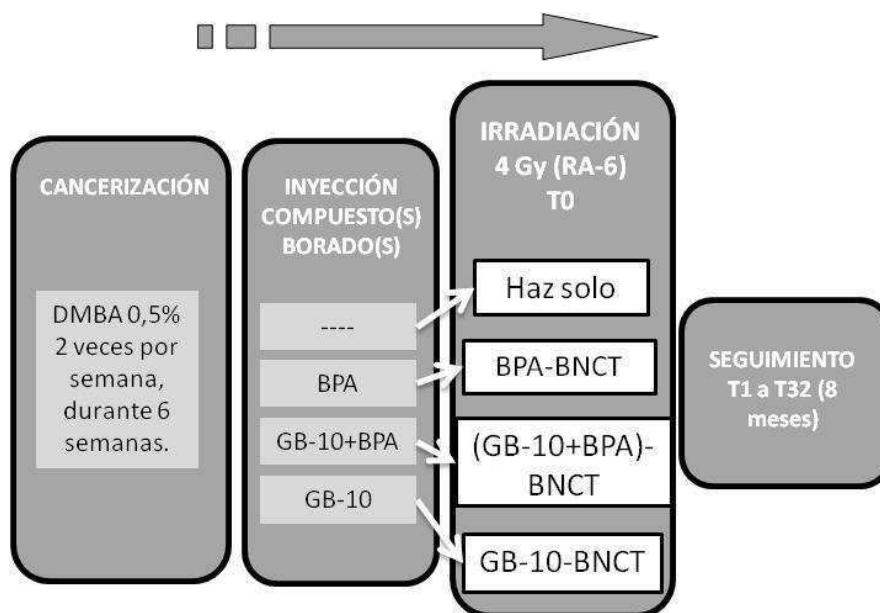
SBNCT 4Gy (RA-6)	Min.	Tejido con PMD (Gy)	Tejido normal (Gy)
SHaz solo	75	4,2±0,1	4,2±0,1
SBPA-BNCT	55	4±2	5±3
S(GB-10+BPA)-BNCT	35	4±2	5±2
SGB-10-BNCT	75	7±2	8±1

Tabla 4. Dosis absorbidas para cada una de las diferentes componentes de radiación, para cada uno de los protocolos.

	Neutrones rápidos	Fotones gamma	Boro (tej. con PMD) (por ppm)	Boro (tej. normal)	Protones inducidos
SHaz solo					
Bolsa de la mejilla	1,04±0,09	2,9±0,1	-	-	0,30±0,03
Cabeza	0,66±0,06	1,41±0,06	-	-	0,060±0,006
Cuerpo	0,33±0,03	0,53±0,02	-	-	0,01±0,001
SBPA-BNCT (15,5 mg¹⁰B/kg peso corporal (p.c.))					
Bolsa de la mejilla	1,02±0,08	1,40±0,06	0,084±0,008	0,084±0,008	0,22±0,02
Cabeza	0,72±0,06	0,95±0,04	-	0,061±0,006	0,15±0,02
Cuerpo	0,41±0,03	0,50±0,02	-	0,031±0,003	0,08±0,01
S(GB-10+BPA)-BNCT (BPA: 31 mg¹⁰B/kg p.c.; GB-10: 34,5 mg¹⁰B/kg p.c.)					
Bolsa de la mejilla	0,48±0,04	1,34±0,05	0,054±0,005	0,054±0,005	0,14±0,01
Cabeza	0,30±0,03	0,66±0,03	-	0,011±0,001	0,020±0,002
Cuerpo	0,16±0,01	0,24±0,01	-	0,00084±0,00008	0,0020±0,0002
SGB-10-BNCT (50 mg¹⁰B/kg p.c.)					
Bolsa de la mejilla	1,04±0,09	2,9±0,1	0,12±0,01	0,12±0,01	0,30±0,03
Cabeza	0,66±0,06	1,41±0,06	-	0,024±0,002	0,060±0,006
Cuerpo	0,33±0,03	0,53±0,02	-	0,0019±0,0002	0,010±0,001

Esquema general de trabajo

A continuación se muestra un esquema correspondiente al estudio de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo desarrollado, empleando una *única* aplicación de BNCT (SBNCT), 4 Gy dosis total absorbida a tejido con PMD, en el reactor RA-6 (Bariloche, Río Negro, Argentina).



Iic. Seguimiento

Estado general de los animales

Se evaluó el estado clínico de los animales mediante inspección visual y se pesaron semanalmente (inclusive el peso inicial pre-irradiación). Se calculó el *peso promedio ± desvío estándar* y el *promedio del porcentaje de cambio de peso ± desvío estándar* para cada tiempo para los animales cancerizados irradiados y también una semana post la última topicación, para los animales cancerizados, sham irradiados (grupo control). El porcentaje de cambio de peso se calculó como:

$$\frac{\text{Peso del animal en tiempo x (Tx)} \times 100}{\text{Peso del animal en T0}}$$

Para desarrollar estos estudios se respetaron las normas locales e institucionales que aseguran la ética y bienestar del animal durante toda la investigación.

Análisis de radiotoxicidad

Se monitoreó semanalmente la potencial radiotoxicidad en términos de mucositis en tejido con PMD y normal, después de cada irradiación. La severidad de la mucositis fue evaluada semi-cuantitativamente teniendo en cuenta los parámetros macroscópicos

eritema, edema, erosión y ulceración. En función de estos parámetros, se clasificó la mucositis en leve, moderada ó severa.

Cinética del desarrollo tumoral

En cuanto al desarrollo tumoral en el modelo de cancerización de campo estudiado, este no nos permite distinguir entre recidivas y segundos tumores primarios post-BNCT. Luego, para este experimento y los siguientes, el desarrollo post BNCT de tumores “nuevos”, según la nomenclatura utilizada por Braakhuis et al. (2003), representará el desarrollo de recidivas y/o segundos tumores primarios.

El desarrollo potencial de tumores nuevos en tejido con PMD fue evaluado mediante la eversión y examinación macroscópica de la bolsa derecha de la mejilla de los hámsters de cada uno de los grupos previamente nombrados, una vez por semana durante 8 meses (32 semanas post tratamiento). Los animales cancerizados se irradiaron una semana después de finalizada la topicación (T0). El primer tiempo de seguimiento fue 1 semana post-irradiación (T1), es decir, 2 semanas después de finalizada la topicación. En el caso de los animales cancerizados sham-irradiados, T1 correspondió a dos semanas post la última topicación, igual que en el caso de los animales irradiados. La diferencia es, naturalmente, que los animales controles no fueron irradiados 1 semana después de finalizada la topicación.

Los parámetros estudiados fueron:

- *Porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos* respecto a los que existían en el momento de la irradiación o, en el caso de los animales controles (cancerizados, sham-irradiados), adicionales a los que existían 1 semana después de finalizado el protocolo de carcinogénesis (tiempo en el cual se realizaron las irradiaciones en los animales tratados). Aquellos animales que murieron previamente a culminar los 8 meses de seguimiento, que habían desarrollado tumores previamente a su muerte, fueron contabilizados dentro del grupo que desarrolló tumores hasta el último tiempo de seguimiento. Este criterio se mantuvo para todos los experimentos que siguen de BNCT *in vivo*.
- *Porcentaje del efecto inhibitorio* de los diferentes protocolos experimentales, referidos al desarrollo tumoral en el grupo control (animales cancerizados, sham-irradiados).
- *T50 y T80* (tiempo después de T0 al cual 50% y 80% de los animales desarrollaron tumores nuevos respecto a T0, respectivamente).

Además, se tomaron fotos de los casos de bolsas que no desarrollaron tumores en ningún tiempo del período de seguimiento (8 meses).

Análisis estadístico

La significancia estadística de los porcentajes acumulados de animales con tumores nuevos de los diferentes grupos de tratamiento versus grupo control fue analizada mediante una tabla de contingencia de 2x2, computando el valor de “p” mediante el test exacto de Fisher, a tiempos representativos. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,05$.

III. Estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT desfasada en el tiempo, con un intervalo de 6 semanas entre irradiaciones con una dosis absorbida de 4 Gy a tejido con PMD en cada irradiación.

Breve resumen

Con el propósito de mejorar la eficacia terapéutica de aquellos protocolos SBNCT que demostraron inhibir el desarrollo de recidivas y/o segundos tumores primarios, se realizó una *doble* aplicación de estos protocolos de BNCT desfasada en el tiempo. La *doble* aplicación de BNCT desfasada en el tiempo se propone para mejorar el “targeting” de distintas poblaciones potencialmente malignas/malignas que podrían ser refractarias o parcialmente refractarias al tratamiento en el momento de la aplicación de BNCT y dar origen al desarrollo y crecimiento tumoral. Además, es clínicamente relevante estudiar la aplicación *doble* de estos protocolos de BNCT ya que sería potencialmente útil para el tratamiento de tumores, en particular los de gran tamaño, pero podría estar contraindicada debido a la potencial radiotoxicidad generada por esta *doble* aplicación en los tejidos limitantes de dosis expuestos. Así, el estudio de la potencial radiotoxicidad en tejido con PMD de estos protocolos adquiere particular relevancia.

IIIa. Estudios de biodistribución

Los valores absolutos de contenido de boro (*promedio de valores de todas las muestras de los animales analizados \pm desvío estándar*) en sangre, tejido con PMD y normal, y la relación *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* para cada uno de los protocolos [BPA; (GB-10+BPA)] son los reportados en el ítem II de esta misma sección.

IIIb. Estudios radiobiológicos

Los animales cancerizados fueron expuestos a una *doble* aplicación de BNCT con un intervalo de 6 semanas entre las aplicaciones a una dosis de 4 Gy prescrita a tejido con PMD en cada irradiación. El tiempo elegido para la segunda aplicación corresponde al momento en el cual el porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos, en el experimento de una *única* aplicación, se encuentra en aumento (sección Resultados ítem II, Ilustración 28). De esta manera esperábamos poder retrasar/inhibir el desarrollo de aquellos focos tumorales que hubieran sido refractarios a la primera aplicación de BNCT.

Se detallan los grupos experimentales evaluados:

Grupo 1 [DBPA-BNCT]: 10 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración. *Doble* aplicación de BNCT, con 6 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 2 [D(GB-10+BPA)-BNCT]: 13 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (31 mg¹⁰B/kg p.c.) y GB-10 (1:10) (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz

de neutrones 3 horas post-administración de GB-10 y 1,5 horas después de la última inyección de BPA. *Doble* aplicación de BNCT, con 6 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 3 [DHaz solo]: 10 hámsters cancerizados irradiados con el haz de neutrones solamente (sin inyección previa de compuesto/s borado/s) para estudiar el efecto de la radiación de fondo. Las irradiaciones con “haz solo” fueron realizadas a la mayor fluencia de neutrones (o mayor tiempo de exposición) utilizada en las irradiaciones con los otros dos protocolos. Esta fluencia corresponde al protocolo BPA-BNCT. *Doble* aplicación de “haz solo”, con 6 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 4 [normales DBPA-BNCT]: 3 hámsters normales (no cancerizados) inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración para estudiar el efecto de BNCT sobre tejido normal. *Doble* aplicación de BNCT, con 6 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 5 [normales D(GB-10+BPA)-BNCT]: 4 hámsters normales (no cancerizados) inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (31 mg¹⁰B/kg p.c.) y GB-10 (1:10) (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración de GB-10 y 1,5 horas después de la última inyección de BPA para estudiar el efecto de BNCT sobre tejido normal. *Doble* aplicación de BNCT, con 6 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 6 [normales DHaz solo]: 3 hámsters normales irradiados con el haz de neutrones solamente (sin inyección previa de compuesto/s borado/s) para estudiar el efecto de la radiación de fondo sobre tejido normal. *Doble* aplicación de “haz solo”, con 6 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 7 [Control]: 88 hámsters cancerizados, sham-irradiados, igualados por edad y tiempo de seguimiento.

Brevemente, tal como se describió en el ítem IIa de esta sección, para el protocolo BPA-BNCT, BPA fue administrado en bolo, intraperitonealmente a una dosis de 15,5 mg¹⁰B/kg p.c. 3hs antes de cada irradiación. Para (GB-10+BPA)-BNCT, GB-10 y BPA fueron administrados conjuntamente. GB-10 fue administrado en bolo, por vía intravenosa, a una dosis de 34,5 mg¹⁰B/kg p.c. y BPA fue administrado como nueve inyecciones, cada 20 minutos, intraperitonealmente, a una dosis total de 31 mg¹⁰B/kg p.c. (simulando una infusión). La irradiación fue realizada 3hs post-administración de GB-10 y 1,5hs luego de la última inyección de BPA.

Los animales se irradiaron en la facilidad térmica del reactor RA-3, Centro Atómico Ezeiza, Provincia de Buenos Aires (Ilustración 19), donde son expuestos a una nube térmica isotrópica mientras que el reactor se encuentra operando normalmente. Por este motivo, se empleó un blindaje de carbonato de ⁶Li para proteger el cuerpo del animal del flujo de

neutrones térmicos mientras que la bolsa del animal se encuentra evertida y pegada sobre un trampolín de acrílico (Ilustración 20) (La facilidad y el blindaje se describen a continuación) (Pozzi et al., 2009). En la Tabla 5 se muestra el tiempo de irradiación y dosis totales absorbidas en tejido con PMD y normal. En la Tabla 6 se muestran las dosis absorbidas para cada una de las diferentes componentes de radiación, para cada uno de los protocolos, para animales cancerizados y normales, respectivamente.

Ilustración 19. Reactor nuclear RA-3, Centro Atómico Ezeiza (CAE-CNEA), provincia de Buenos Aires, Argentina.



Ilustración 20. Blindaje de carbonato de ⁶litio: **(A)** Sin tapa, mostrando la disposición del animal dentro de ella; **(B)** Con tapa; **(C)** Foto de la bolsa a irradiar, pegada en el trampolín de acrílico, expuesta para irradiar.

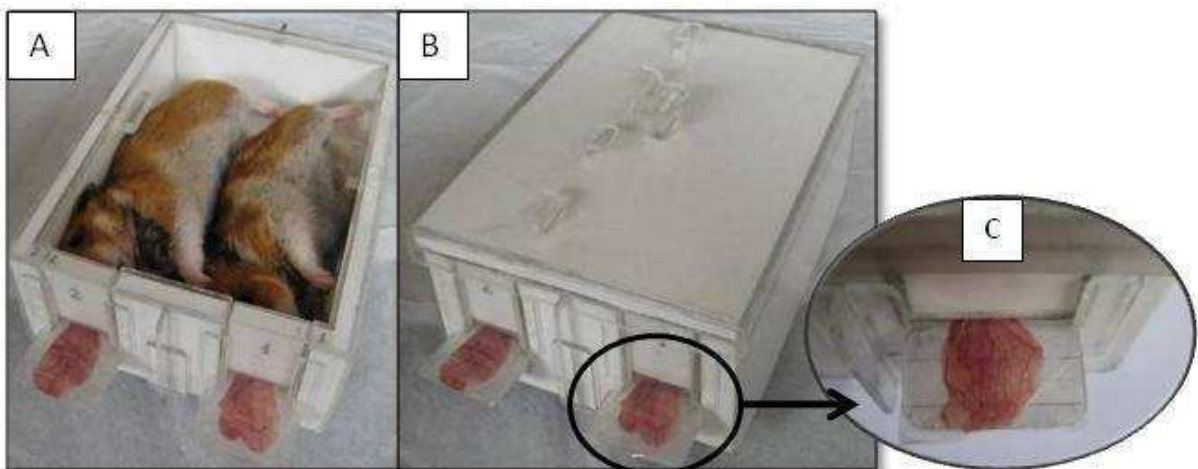


Tabla 5. Tiempos de irradiación (min.) y dosis totales absorbidas en tejido con PMD y normal. Los datos de dosis corresponden a cada una de las dos irradiaciones.

<i>DBNCT 4Gy, 6 semanas intervalo (RA-3)</i>	Min.	Tejido con PMD (Gy)	Tejido normal (Gy)
DHaz solo	5,2	1,01 ± 0,08	1,01 ± 0,08
DBPA-BNCT	5,2	4±2	4±2
D(GB-10+BPA)-BNCT	2,7	4±1	4±2

Tabla 6. Dosis absorbidas para cada una de las diferentes componentes de radiación, para cada uno de los protocolos. Los datos de dosis corresponden a cada una de las dos irradiaciones.

	Neutrones rápidos	Fotones gamma	Boro (tejido con PMD) (por ppm)	Protones inducidos
DHaz solo				
Bolsa de la mejilla	-	0,58±0,07	-	0,43±0,04
DBPA-BNCT (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.)				
Bolsa de la mejilla	-	0,58±0,07	0,15±0,01	0,43±0,04
D(GB-10+BPA)-BNCT (GB-10: 34,5 mg¹⁰B/kg p.c.; BPA: 31 mg¹⁰B/kg p.c.)				
Bolsa de la mejilla	-	0,30±0,04	0,079±0,007	0,22±0,02

Breve descripción de la facilidad construida en el reactor nuclear RA-3, del blindaje de carbonato de ⁶Li para proteger el cuerpo de los animales durante la irradiación, y de la dosimetría experimental realizada para cada irradiación

Facilidad construida en el reactor nuclear RA-3

La Comisión Nacional de Energía Atómica de Argentina (CNEA) adaptó una fuente de neutrones térmicos para ser utilizada en aplicaciones biomédicas para BNCT en el reactor nuclear de producción e investigación RA-3, localizado en el Centro Atómico Ezeiza en la provincia de Buenos Aires (Miller et al., 2009).

El RA-3 (Ilustración 19) es un reactor de piletta abierta, con combustible de uranio enriquecido al 20% en ²³⁵U y un máximo de potencia de 10 MW. Opera continuamente 4 días a la semana y es principalmente utilizado para la producción de radioisótopos. En uno de los lados de la piletta, presenta una columna térmica de grafito que, antes de la modificación, no era accesible mientras que el reactor se encontraba en operación. Para poder acceder durante su operación regular, se construyeron blindajes adicionales y “shutters” para permitir la introducción de muestras a irradiar con el reactor a potencia máxima (Miller et al., 2009).

La facilidad fue construida en 2005 y la operación comenzó en el año 2006, luego de corroborar que los niveles externos de radiación no hubieran sufrido cambios significativos comparados a aquellos registrados antes de la modificación (Miller et al., 2009).

La Ilustración 21 muestra un diagrama de la nueva facilidad, que además se detalla a continuación:

Ilustración 21. (A) Esquema de la facilidad del reactor nuclear RA-3 para irradiación de órganos *ex situ* y pequeños animales. Los números están detallados en el texto; **(B)** Dos vistas externas diferentes de la facilidad; **(C)** Detalle de la puerta superior (cerrada); **(D)** Detalle de la puerta superior (abierta) y el lugar para la inserción de muestras a ser irradiadas.

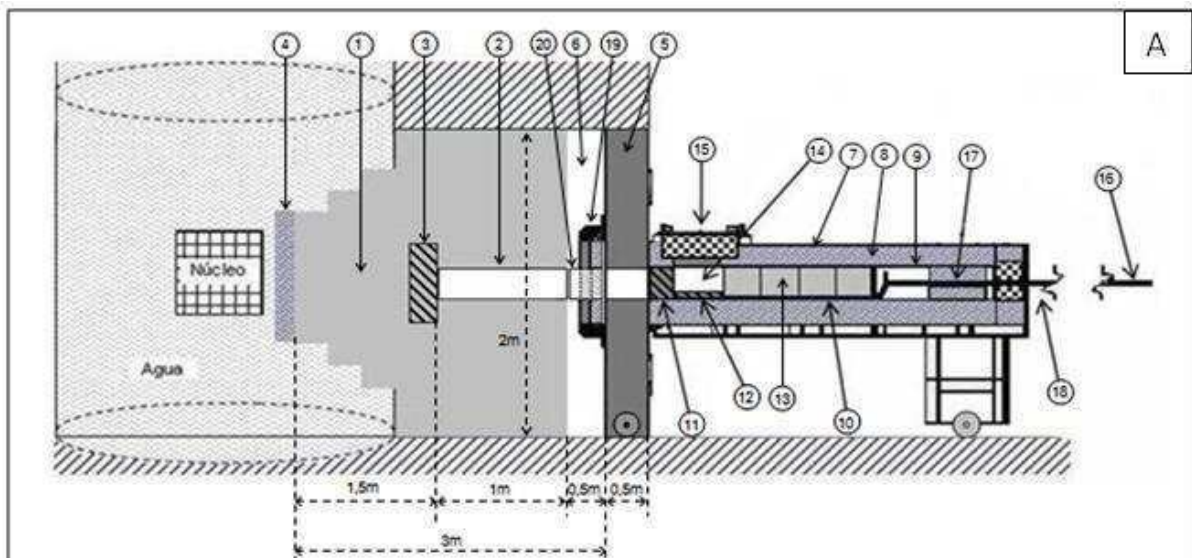
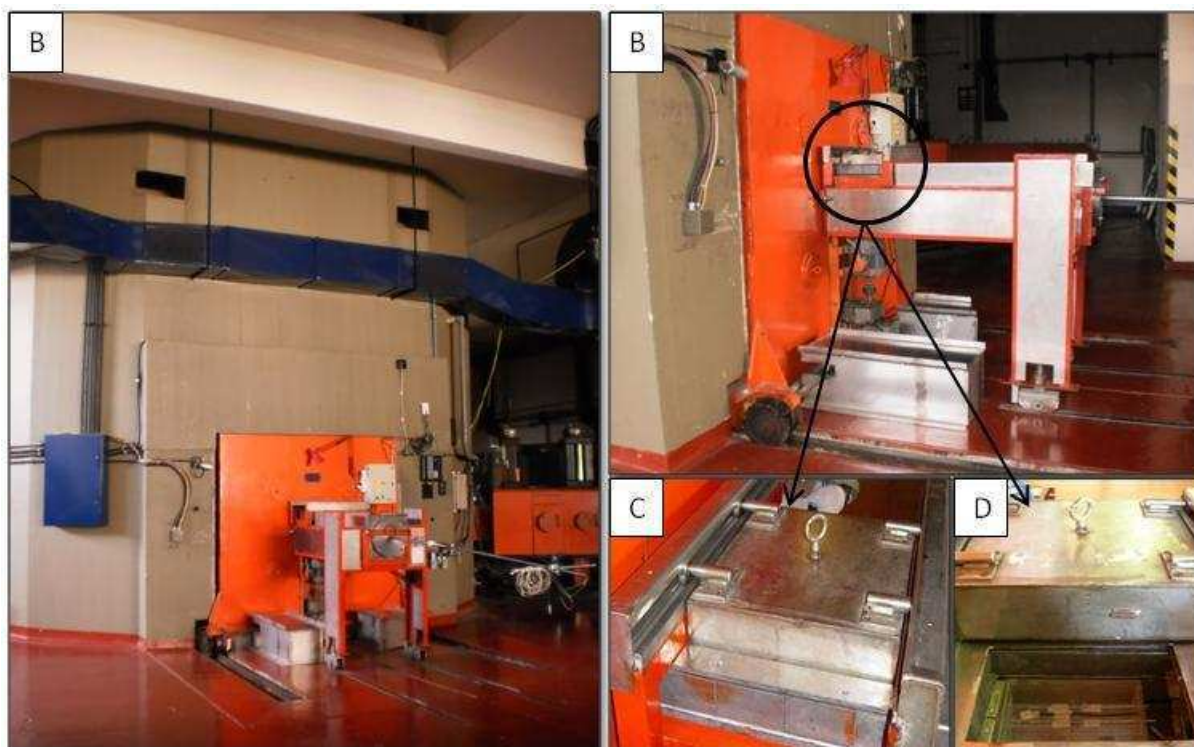


Figura 6-1. Esquema de la facilidad para la irradiación de muestras del reactor RA-3.

- | | |
|--|---|
| 1- Columna térmica con grafito como material principal. | 11- Bloque de bismuto. |
| 2- Túnel de aire. | 12- Bloque base de bismuto. |
| 3- Bloque de bismuto. | 13- Bloques de grafito. |
| 4- Bloque de plomo (fin de la columna térmica). | 14- Cavity porta muestra. |
| 5- Puerta externa. | 15- Puerta corrediza superior. |
| 6- Aire entre la puerta y el final del grafito. | 16- Tubo para desplazar la bandeja porta muestra. |
| 7- Blindaje externo para introducción de muestras. | 17- Blindaje móvil. |
| 8- Cobertura de plomo. | 18- Tubo para desplazar el blindaje móvil. |
| 9- Túnel de aire. | 19- Shutter. |
| 10- Bandeja móvil porta muestra. | 20- Puente móvil para el pasaje de muestras (solidario al shutter). |



*La facilidad tiene una columna térmica, construida de grafito, como su componente principal (1), a la cual se le amplió la sección principal interna (2).

*Para reducir la emisión gamma proveniente del núcleo, se colocó un bloque de bismuto (3) al final del túnel, adicionalmente al bloque de plomo que inicialmente ya existía al final de la columna, cerca del núcleo (4). En el otro extremo, existe una puerta de hierro que cierra la columna (5). Una abertura cuadrada en el centro de esta puerta, que se encuentra alineada con el canal o túnel en el grafito, tiene las mismas dimensiones.

*Entre el grafito y la puerta externa hay un espacio de aire de 0,5 m (6). En contacto con la puerta, un nuevo blindaje externo se construyó para la inserción de muestras a irradiar (7). Está compuesto por paredes de plomo (8) que rodean un túnel (1,1 m de largo) lleno de aire alineado con el túnel de la columna (9).

*Dentro del túnel, existe una bandeja móvil para muestras construida de Zircaloy-4 (Zy-4) (10). Esta bandeja presenta bloques de bismuto al final (11) y en su base (12) como blindaje gamma adicional y, además, bloques de grafito para la reflexión de los neutrones (13). El espacio para las muestras sobre la base de bismuto es de 15 cm x 11 cm x 18 cm (14). Esta bandeja se mueve para insertar y extraer las muestras de la columna. El bloque de bismuto al final de la bandeja presenta dos funciones. Cuando la bandeja se encuentra adentro, durante la irradiación de la muestra, actúa como un blindaje adicional para la emisión de gama del núcleo y, cuando se encuentra afuera, actúa como un blindaje para la radioprotección del operador que está extrayendo o insertando las muestras.

*Una puerta con movimiento lateral se encuentra en la parte superior del blindaje externo (15), construida para poder insertar las muestras en este espacio. Esta puerta está hecha de plomo cubierta por acero inoxidable.

*Un tubo largo de Zy-4 se encuentra unido a la bandeja para ayudar a la inserción y extracción de las muestras (16). Dentro de él se colocan cables de instrumentación para poder realizar mediciones durante la irradiación.

*Un blindaje adicional, movable e independiente, fue construido al final de la bandeja (17) compuesto por cadmio y plomo. Durante la irradiación se coloca dentro del túnel de la columna térmica como blindaje de radioprotección. Un segundo tubo de acero inoxidable fue unido al blindaje para permitir su desplazamiento (18), rodeando al tubo de Zy-4.

*Se montó además un blindaje de gamma y neutrones movable (“shutter”) en la parte interna de la puerta de la columna (19). (Miller et al., 2009)

En cuanto al procedimiento de irradiación de muestras, primero se carga la muestra en el espacio para muestras (abriendo la puerta de arriba del túnel) con el “shutter” cerrado. Luego, una vez que la puerta de arriba del túnel se cierra, el “shutter” puede ser abierto y la bandeja de las muestras y el blindaje movable pueden ser posicionados en el lugar de irradiación, empujando los tubos correspondientes. Se implementó un control de seguridad que solo permite abrir el “shutter” cuando la puerta de arriba del túnel se encuentra cerrada y la bandeja se encuentra en la posición inicial (extraída). Asociado a este control, existe un panel de luces indicadores montado en el lado externo de la puerta de la columna (Miller et al., 2009).

Antes de comenzar las irradiaciones de muestras biológicas se realizaron diversas mediciones, en aire libre, que verificaron que la facilidad (Miller et al., 2009):

- Presentaba un espectro muy bien termalizado y la contribución de neutrones rápidos a la dosis total podía ser considerada despreciable para los experimentos típicos de BNCT.
- El flujo térmico medido en la posición cerca del núcleo cumplía con el valor esperado para poder entregar las dosis requeridas en pocos minutos (disminuyendo la radiación de fondo indeseada).
- La tasa de dosis gamma de fondo también era relativamente baja, y no era un factor limitante para las aplicaciones biomédicas de BNCT.

Dado que el haz presentaba las características deseadas y por su conveniencia de operación, se realizaron varios experimentos biológicos que mostraron una uniformidad de flujo neutrónico muy buena aún para volúmenes de tejido cercanos a 300 cm³, sin que haga falta rotar o mover la muestra durante la irradiación (Miller et al., 2009).

Blindaje de carbonato de litio para proteger el cuerpo de los animales durante la irradiación y dosimetría experimental previa a cada irradiación

En particular, en cuanto a la irradiación de hámsters en esta facilidad, dados los datos dosimétricos (Pozzi et al., 2007) y de radiotolerancia (Kreimann et al., 2001b; Trivillin et al., 2006) de estudios anteriores, se planteó la conveniencia de construir un blindaje para proteger del flujo neutrónico al cuerpo del animal, mientras se expone la bolsa cancerizada. Para ello, se desarrolló una caja fabricada con polvo de carbonato de litio enriquecido al 95% en ⁶Li, compactado hasta obtener un espesor de 6 mm y sellado entre placas de acrílico. La

bolsa del hámster es evertida de la caja y pegada en un trampolín de acrílico (Pozzi et al., 2009) (Ilustración 20).

Para realizar las mediciones de determinación de distribución espacial del flujo térmico y del flujo de neutrones de energía mayor a la térmica dentro del blindaje y en la posición de la bolsa evertida, se evaluó la activación de alambres de cobre-oro colocados en un fantoma de hámster de acrílico y la de hojuelas desnudas y bajo cadmio. Los datos de activación indicaron: un campo neutrónico muy bien termalizado, con una dosis de radiación despreciable de protones “recoil” (producto de la colisión de neutrones rápidos con núcleos de hidrógeno del tejido) (Pozzi et al., 2007).

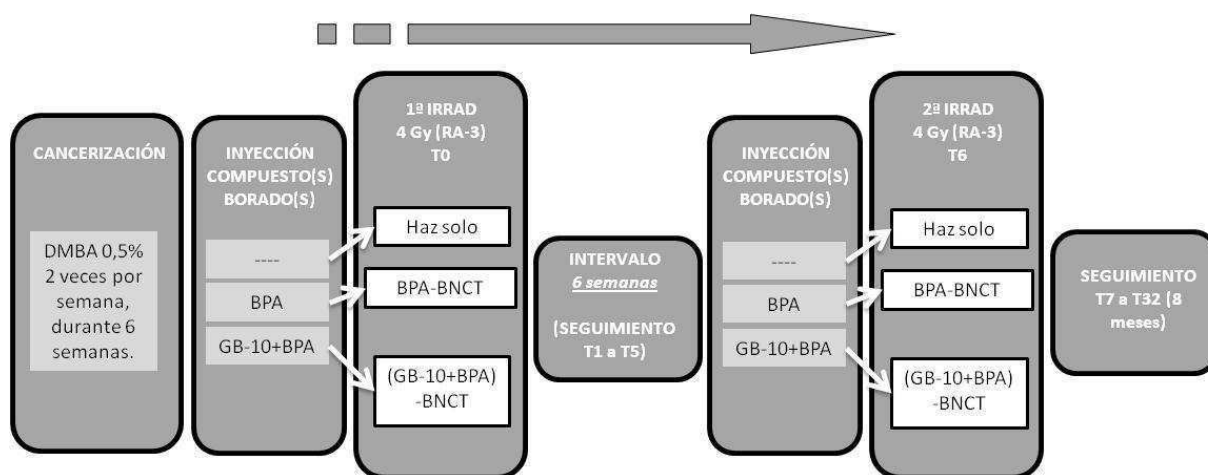
Antes de cada irradiación, un detector autoenergizado (SPND) de rodio “Rhodium Self Powered Neutron Detector” se posiciona en el punto central del trampolín para obtener el valor actualizado de flujo en el día de irradiación, para tener en cuenta potenciales variaciones de flujo locales debido a variaciones de potencia del reactor. De esta manera, en función de la lectura del flujo neutrónico y la concentración de boro en la bolsa a irradiar (obtenida de estudios de biodistribución previos) y la dosis absorbida requerida, se calcula el tiempo de irradiación (Pozzi et al., 2007). El valor promedio de los valores de flujo medidos en el centro del trampolín para las experiencias reportadas en esta tesis realizadas en el reactor RA-3 (ítems III, IV, V y VI) resultó $(7,5\pm 1,6)*10^9 \text{ n}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se especifica que este valor corresponde a la posición central del trampolín dado que existe una variación del flujo de un 20% mayor en la posición más lejana al blindaje y un 20% menor en la posición más cercana a éste. Esto se debe mayoritariamente a la depresión del flujo producida por el blindaje y, en menor medida, a la distancia al núcleo del reactor.

El flujo neutrónico térmico en todas las localizaciones dentro del blindaje fue de al menos un factor 20 veces menor al flujo detectado en la bolsa evertida. Esto demostró que el blindaje de carbonato de litio reduce las dosis de captura en boro y nitrógeno en el cuerpo del animal a niveles altamente aceptables (Pozzi et al., 2009).

En cuanto a la tasa gamma representativa en la posición de irradiación, para las experiencias reportadas en esta tesis, realizadas en el reactor RA-3 (ítems III, IV, V y VI), correspondió a $6,08\pm 0,61 \text{ Gy/h}$. Fue medida utilizando una cámara de ionización de grafito (CI) cuya área sensible se colocó sobre la zona donde se posiciona la bolsa a irradiar para lograr una configuración análoga a la que se utiliza para las irradiaciones.

Esquema general de trabajo

A continuación se muestra un esquema correspondiente al estudio de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT desfasada en el tiempo (DBNCT), con un intervalo de 6 semanas entre irradiaciones, 4 Gy dosis absorbida al tejido con PMD en cada irradiación, en el reactor RA-3 (Centro Atómico Ezeiza, Provincia de Buenos Aires).



IIIc. Seguimiento

Estado general de los animales

Se evaluó el estado clínico de los animales mediante inspección visual y se pesaron semanalmente (inclusive el peso inicial pre-irradiación). Se calculó el *peso promedio \pm desvío estándar* y el *promedio del porcentaje de cambio de peso \pm desvío estándar* para cada tiempo para los animales irradiados cancerizados y normales, normales sin irradiar y, también una semana post la última topicación, para los animales cancerizados, sham-irradiados (grupo control).

Para desarrollar estos estudios se respetaron las normas locales e institucionales que aseguran la ética y bienestar del animal durante toda la investigación.

Análisis de radiotoxicidad

Se monitoreó semanalmente la potencial radiotoxicidad en términos de mucositis en tejido con PMD y normal, después de cada irradiación. La severidad de la mucositis fue evaluada semi-cuantitativamente en función de una escala de mucositis bucal basada en características macroscópicas, adaptada de López Castaño et al. (2005) y Sonis et al. (2000). Se clasifica según los hallazgos en la zona de mayor severidad. Se calculó el *porcentaje de animales con cada grado de mucositis*, por protocolo:

Grado 0: apariencia normal, sin erosión ni vasodilatación;

Grado 1: eritema y/o edema y/o vasodilatación, sin evidencia de erosión mucosa;

Grado 2: eritema y/o edema severo, vasodilatación y/o erosión superficial;

Grado 3: eritema y/o edema severo, vasodilatación y formación de úlceras <2 mm en diámetro;

Grado 4: eritema y/o edema severo, vasodilatación, formación de úlceras \geq 2 mm y <4 mm en diámetro y/o áreas de necrosis <4 mm en diámetro;

Grado 5: eritema y/o edema severo, vasodilatación, formación de úlceras de \geq 4 mm ó múltiples úlceras \geq 2 mm en diámetro y/o áreas de necrosis \geq 4 mm en diámetro.

En cuanto a los tiempos de seguimiento en el análisis de radiotoxicidad, se siguieron los animales periódicamente hasta la completa resolución de la mucositis (grados 0 y 1). Se tomaron fotos para ejemplificar los efectos radiotóxicos observados.

También se evaluó la mucositis a nivel microscópico en un set adicional de animales, tratados con los mismos protocolos de BNCT mencionados anteriormente y sacrificados a distintos tiempos clínicamente relevantes. Los tiempos evaluados se eligieron en base a los estudios de radiotoxicidad macroscópicos realizados previamente, donde se observó que el pico de mucositis se evidenciaba una semana post irradiación, para cada una de las irradiaciones, y que la remisión de la mucositis se completaba a las tres semanas después de cada irradiación.

Grupo 1 [DBPA-BNCT]: 5 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración. *Doble* aplicación de BNCT, con 6 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 2 [D(GB-10+BPA)-BNCT]: 5 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (31 mg¹⁰B/kg p.c.) y GB-10 (1:10) (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración de GB-10 y 1,5 horas después de la última inyección de BPA. *Doble* aplicación de BNCT, con 6 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 3 [DHaz solo]: 5 hámsters cancerizados irradiados con el haz de neutrones solamente (sin inyección previa de compuesto/s borado/s) para estudiar el efecto de la radiación de fondo. Las irradiaciones con “haz solo” fueron realizadas a la mayor fluencia de neutrones (o mayor tiempo de exposición) utilizada en las irradiaciones con los otros dos protocolos. Esta fluencia corresponde al protocolo BPA-BNCT. *Doble* aplicación de “haz solo”, con 6 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 4 [Control]: 3 hámsters cancerizados sham-irradiados, igualados por edad y tiempos de seguimiento de los grupos experimentales (pre 1º irradiación (T0); pre 2º irradiación (T6); 9 semanas post 1º irradiación (T9), último tiempo de seguimiento).

Se tomaron muestras del tejido de las bolsas en el momento del sacrificio y se procesaron para histología de rutina. Se evaluó un corte de bolsa por cada animal. Los cortes fueron teñidos para su análisis con hematoxilina-eosina.

Cinética del desarrollo tumoral

El desarrollo potencial de tumores nuevos en tejido con PMD fue evaluado mediante la eversión y examinación macroscópica de la bolsa derecha de la mejilla de los hámsters de cada uno de los grupos previamente nombrados (ítem IIIb), una vez por semana durante 8

meses (32 semanas post primera irradiación). En cuanto al grupo control, el desarrollo tumoral se evaluó una semana después de finalizar la topicación (T0).

Los parámetros estudiados fueron:

- *Porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos respecto a T0.*
- *T50 y T80 (tiempo después de T0 al cual 50% y 80% de los animales desarrollaron nuevos tumores respecto a T0, respectivamente).*

Además, se tomaron fotos de las bolsas que no desarrollaron tumores en ningún tiempo del período de seguimiento (8 meses).

Síntesis de ADN

Se evaluó el potencial efecto de los distintos protocolos de tratamiento sobre la síntesis de ADN en el tejido con PMD (bolsas derechas de los diferentes grupos). Esta técnica fue previamente detallada en el ítem Ib de esta misma sección. Se sacrificaron los animales a los 8 meses post tratamiento, para cada protocolo evaluado. Se evaluaron cuatro animales para cada uno de los protocolos de BNCT estudiados y 9 animales para el grupo control. Se contabilizaron los núcleos positivos para cada categoría histológica (NUMF, hiperplasia y displasia) y se calculó el *promedio de núcleos BrdU positivos por campo \pm desvío estándar*, para cada grupo experimental, en una sección de bolsa por cada animal. Secciones adyacentes teñidas con hematoxilina-eosina fueron utilizadas para análisis histológico.

En estudios previos se verificó que el tratamiento con BNCT no induce alteraciones significativas en el área nuclear promedio y en el número promedio de núcleos/unidad de área (Heber et al., 2007). Esto permitió una comparación directa entre el número de núcleos BrdU-positivos entre los grupos BNCT y control.

Análisis estadístico

La significancia estadística de los porcentajes acumulados de animales con tumores nuevos de los diferentes grupos de tratamiento versus grupo control fue analizada mediante una tabla de contingencia de 2x2, computando el valor de "p" mediante el test exacto de Fisher, a tiempos representativos. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,05$.

La significancia estadística de las diferencias en la síntesis de ADN entre los diferentes protocolos de BNCT versus el grupo control, para cada categoría histológica y entre los protocolos de BNCT versus el grupo control, sin distinción de categorías, fue evaluada mediante prueba *t-Student* desapareado. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,05$.

IV. Estudios de biodistribución y BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT con un intervalo de 2 semanas entre irradiaciones, 4 Gy dosis absorbida en tejido con PMD en cada irradiación, versus una *única* aplicación de BNCT a la misma dosis total absorbida (8 Gy).

Breve resumen

Aunque el protocolo DBNCT con 6 semanas de intervalo entre irradiaciones (sección Resultados ítem III) indujo una inhibición significativa en el desarrollo tumoral, sin costo adicional en términos de radiotoxicidad en tejido normal y tejidos limitantes de dosis, intentamos mejorar estos resultados probando nuevos protocolos, aumentando la dosis entregada en cada irradiación y/o variando el intervalo entre irradiaciones.

IVa. Estudios de biodistribución

Para el experimento DBNCT (4 Gy en cada irradiación, 2 semanas de intervalo), los valores absolutos de contenido de boro en sangre, tejido con PMD y normal, y la relación *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* para cada uno de los protocolos [BPA; (GB-10+BPA)] son los reportados en el ítem II de esta misma sección.

En el caso del experimento de *única* aplicación de BNCT a 8 Gy, se realizaron nuevos estudios de biodistribución, donde el procesado de tejidos para ICP-OES sufrió una leve modificación, detallada a continuación. La descripción del ICP-OES se realizó en el ítem II de esta misma sección. Además, se utilizó el Espectrómetro de Emisión por Plasma Inductivo de Masa (ICP-MS, ELAN DRC2, Perkin Elmer), el cual presenta límites de detección y determinación más bajos que el ICP-OES, para realizar mediciones complementarias de boro en las muestras biológicas evaluadas y confirmar los valores de concentración de boro en tejido por un método independiente. Más abajo, se detalla el procesado de muestras para ICP-MS y el funcionamiento del equipo. Se calcularon los valores absolutos de contenido de boro (*promedio de valores de todas las muestras de los animales analizados \pm desvío estándar*) en sangre, tejido con PMD y normal, y la relación *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* para cada uno de los protocolos [BPA; (GB-10+BPA)].

Nuevo protocolo de procesado de las muestras de sangre, tejidos y órganos para ser analizados en el ICP-OES

El procesado de las muestras de sangre, tejidos y órganos para su medición en el ICP-OES fue levemente modificado respecto a lo descrito en el ítem II de esta sección para optimizar las mediciones.

Brevemente:

Las muestras de tejido (30–50 mg) fueron digeridas por 1h a 100°C en 0,25 ml de una mezcla (1:1) ácido sulfúrico concentrado ultra puro (J. T. Baker) y ácido nítrico destilado “sub-boiling” de 65/ (Carlo Erba). Una vez completada la digestión, se agregaron 0,2 ml de una solución de itrio (0,5 ppm)-estroncio (25 ppm) como estándar interno, previo al agregado de 0,55 ml de una solución 5/ triton X-100 en agua. Las muestras fueron

sonicadas por 90 min. En el caso de las muestras de sangre, 200–300 μ l fueron digeridos a 100°C en 1,25 ml de una mezcla (1:1) ácido sulfúrico concentrado ultra puro (J. T. Baker) y ácido nítrico destilado “sub-boiling” de 65/ (Carlo Erba). Una vez completada la digestión, se agregó 1 ml itrio (0,5 ppm)-estroncio (25 ppm) como estándar interno previo a la adición de 2,75 ml de una solución 5/ triton X-100 en agua. La curva de calibración fue preparada con soluciones estándar de ácido bórico (enriquecido 99,8/ en ^{10}B) de concentración 0 ppm hasta 1 ppm.

Procesado de las muestras de sangre y tejidos para ser analizados en el ICP-MS

Sangre. Las muestras de sangre (200-300 μ l) se extrajeron, bajo anestesia, de la vena yugular con una jeringa con EDTA 5/ v/v y fueron pesadas inmediatamente. Hasta su uso, las muestras de sangre fueron almacenadas en EDTA 5/ v/v a 4°C. Las muestras se procesaron para la medición de boro por ICP-MS. Fueron digeridas en tubos Falcon de 15 ml por 1h a 100°C en 0,25 ml de una mezcla (1:1) ácido sulfúrico concentrado ultra puro (J. T. Baker) y ácido nítrico destilado “sub-boiling” de 65/ (Carlo Erba). Una vez completada la digestión, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó agua MilliQ hasta un volumen final de 10 ml. Las sangres digeridas fueron almacenadas a temperatura ambiente por no más de 3 días previos a su medición. Al momento de la medición fueron vortexeadas y aproximadamente 0,20 ml de la sangre digerida (dependiendo de la concentración de boro estimada) se colocó en un nuevo tubo Falcon y se mezcló con 0,20 ml de una mezcla (1:1) ácido sulfúrico concentrado ultra puro y ácido nítrico “sub-boiling”. Como estándar interno se agregó 0,25 ml de ^6Li (1 ppm). Se llevó a volumen de 10 ml con agua MilliQ. Previo a la medición, las muestras fueron nuevamente vortexeadas. La curva de calibración, que se elaboró en el día de la medición, fue preparada con soluciones estándar de ácido bórico (enriquecido 99,8/ en ^{10}B) de concentración 0 ppb hasta 20 ppb.

Tejidos y órganos. Todas las muestras fueron pesadas inmediatamente luego de su extracción y conservadas a -20°C hasta su uso. Las muestras de tejido (30–50 mg) fueron digeridas en tubos Falcon de 15 ml por 1h a 100°C en 0,25 ml de una mezcla (1:1) ácido sulfúrico concentrado ultra puro (J. T. Baker) y ácido nítrico destilado “sub-boiling” de 65/ (Carlo Erba). Una vez completada la digestión, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó agua MilliQ hasta un volumen final de 10 ml. Las muestras digeridas fueron almacenadas a temperatura ambiente por no más de 3 días previos a su medición. Al momento de la medición fueron vortexeadas y aproximadamente 1 ml de la muestra digerida (dependiendo de la concentración de boro estimada) se colocó en un nuevo tubo Falcon y se mezcló con 0,20 ml de una solución (1:1) de ácido sulfúrico concentrado ultra puro y ácido nítrico “sub-boiling”. Como estándar interno se agregó 0,25 ml de ^6Li (1 ppm). Se llevó a volumen de 10 ml con agua MilliQ. Previo a la medición, las muestras fueron nuevamente vortexeadas. La curva de calibración, que se elaboró en el día de la medición, fue preparada con soluciones estándar de ácido bórico (enriquecido 99,8/ en ^{10}B) de concentración 0 ppb hasta 20 ppb.

Breve Descripción del Espectrómetro de Emisión por Plasma Inductivo de Masa (ICP-MS)

El ICP-MS (Espectrómetro de Emisión por Plasma Inductivo de Masa) (Ilustración 22) mide la mayoría de los elementos de la tabla periódica. Los límites de detección del equipo son de partes por trillón (ppt) para la mayoría de la tabla. La mayoría de los análisis son cuantitativos; sin embargo, puede ser excelente como instrumento semicuantitativo. (http://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf)

Las muestras, generalmente líquidas, son introducidas en un plasma de argón como gotas de aerosol generados por un nebulizador. El plasma seca el aerosol, disocia las moléculas y luego remueve un electrón de los componentes, formando iones con una única carga, los cuales son dirigidos hacia un dispositivo de filtrado de masa denominado espectrómetro de masa. La mayoría de los sistemas ICP-MS emplean un espectrómetro de masa cuadrupolo que rápidamente escanea el rango de masas. A un tiempo determinado, un único cociente de masa-carga podrá pasar a través del espectrómetro de masa. Una vez que salen del espectrómetro de masa, los iones chocan contra el primer dinodo de un multiplicador de electrones, que sirve de detector. Este impacto genera una cascada de electrones, que son amplificados hasta que se convierten en un pulso medible. El software compara las intensidades de los pulsos respecto a los estándares, que componen la curva de calibración, para determinar la concentración de cada elemento. (http://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf)

El análisis cuantitativo realizado con ICP-MS determina qué cantidad de un elemento específico existe en el material analizado. En un análisis cuantitativo típico, la concentración de cada elemento es determinada comparando las cuentas medidas para un isótopo seleccionado contra una calibración externa generada para ese elemento. Los estándares líquidos para calibración son preparados de la misma forma que para los estudios con ICP-OES. Estos estándares se utilizan para realizar la curva de calibración. Las muestras incógnitas son corridas y las intensidades de las señales son comparadas contra la curva de calibración para determinar la concentración de la muestra. (http://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf)

Ilustración 22. Espectrómetro de Emisión por Plasma Inductivo (ICP-MS) (Centro Atómico Ezeiza, CNEA).



IVb. Estudios radiobiológicos

Comenzamos estudiando los efectos terapéuticos y radiotóxicos de una *doble* aplicación de BNCT utilizando la misma dosis absorbida en cada irradiación, descrita en el ítem III de esta sección (4 Gy dosis absorbida en tejido con PMD) pero variamos el intervalo entre irradiaciones. El tiempo elegido para la segunda aplicación en este nuevo protocolo corresponde al momento en el cual, en el experimento SBNCT 4 Gy dosis total absorbida a tejido con PMD (esta sección, ítem II), todavía se evidencia un 100% de efecto inhibitorio en el desarrollo tumoral (sección Resultados ítem II, Ilustración 28). De esta manera esperábamos poder retrasar/inhibir el desarrollo de aquellos focos tumorales que fueron refractarios a la primera aplicación de BNCT.

Se detallan los grupos experimentales evaluados en el protocolo **DBNCT, 4 Gy dosis absorbida en tejido con PMD en cada irradiación, 2 semanas de intervalo entre aplicaciones:**

Grupo 1 [DBPA-BNCT]: 11 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración. *Doble* aplicación de BNCT, con 2 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 2 [D(GB-10+BPA)-BNCT]: 10 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (31 mg¹⁰B/kg p.c.) y GB-10 (1:10) (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración de GB-10 y 1,5 horas después de la última inyección de BPA. *Doble* aplicación de BNCT, con 2 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 3 [DHaz solo]: 10 hámsters cancerizados irradiados con el haz de neutrones solamente (sin inyección previa de compuesto/s borado/s) para estudiar el efecto de la radiación de fondo. Las irradiaciones con “haz solo” fueron realizadas a la mayor fluencia de neutrones (o mayor tiempo de exposición) utilizada en las irradiaciones con los otros dos protocolos, que correspondió al protocolo BPA-BNCT. *Doble* aplicación de “haz solo”, con 2 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 4 [normal DBPA-BNCT]: 6 hámsters normales (no cancerizados) inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración para estudiar el efecto de BNCT sobre el tejido normal. *Doble* aplicación de BNCT, con 2 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 5 [normal D(GB-10+BPA)-BNCT]: 6 hámsters normales (no cancerizados) inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (31 mg¹⁰B/kg p.c.) y GB-10 (1:10) (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post administración de GB-10 y 1,5 horas después de la última inyección de BPA para estudiar el efecto de BNCT sobre tejido normal. *Doble* aplicación de BNCT, con 2 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 6 [normal DHaz solo]: 6 hámsters normales irradiados con el haz de neutrones solamente (sin inyección previa de compuesto/s borado/s) para estudiar el efecto de la radiación de fondo sobre tejido normal. *Doble* aplicación de “haz solo”, con 2 semanas de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 7 [Control]: 88 hámsters cancerizados, sham-irradiados, igualados por edad y tiempo de seguimiento.

El protocolo de 2 aplicaciones se comparó con un protocolo de aplicación *única* a una dosis absorbida a tejido con PMD igual a la dosis total (8 Gy) que se administra con la suma de ambas aplicaciones a 4 Gy.

Se detallan los grupos experimentales evaluados en el protocolo **SBNCT, 8 Gy dosis total absorbida a tejido con PMD:**

Grupo 1 [SBPA-BNCT]: 6 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración. *Única* aplicación de BNCT.

Grupo 2 [S(GB-10+BPA)-BNCT]: 6 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (31 mg¹⁰B/kg p.c.) y GB-10 (1:10) (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas postadministración de GB-10 y 1,5 horas después de la última inyección de BPA. *Única* aplicación de BNCT.

Grupo 3 [SHaz solo]: 6 hámsters cancerizados irradiados con el haz de neutrones solamente (sin inyección previa de compuesto/s borado/s) para estudiar el efecto de la radiación de fondo. Las irradiaciones con “haz solo” fueron realizadas a la mayor fluencia de neutrones (o mayor tiempo de exposición) utilizada en las irradiaciones con los otros dos protocolos que correspondió al protocolo SBPA-BNCT. *Única* aplicación de “haz solo”.

Grupo 4 [normales SBPA-BNCT]: 6 hámsters normales (no cancerizados) inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración para estudiar el efecto de BNCT sobre tejido normal. *Única* aplicación de BNCT.

Se analizó radiotoxicidad en tejido normal solo con el protocolo SBPA-BNCT dado que es el protocolo de BNCT que mayor radiotoxicidad genera en tejido con PMD y tejido normal (ANEXO 2-Tabla 59).

Grupo 5 [Control]: 88 hámsters cancerizados, sham-irradiados, igualados por edad y tiempo de seguimiento.

Para ambos protocolos, *DBNCT* y *SBNCT*, para el protocolo BPA-BNCT, BPA fue administrado en bolo intraperitonealmente, a una dosis de 15,5 mg¹⁰B/kg p.c. 3hs antes de la irradiación. En el caso de (GB-10+BPA)-BNCT, GB-10 y BPA fueron administrados conjuntamente. El GB-10 fue aplicado en forma de una inyección en bolo intravenosa, a una dosis de 34,5 mg¹⁰B/kg p.c. y BPA como nueve inyecciones i.p., cada 20 minutos, a una dosis total de 31 mg¹⁰B/kg p.c. La irradiación se realizó 3hs post-administración de GB-10 y 1,5 hs luego de la última inyección de BPA.

Los animales fueron irradiados en la facilidad térmica construida en el reactor RA-3 empleando un blindaje de carbonato de ⁶litio para proteger el cuerpo del animal mientras la bolsa de la mejilla es evertida y pegada sobre el trampolín para su exposición (Miller et al., 2009; Pozzi et al., 2009 - ítem III de esta sección) (Ilustración 20). La Tabla 7 muestra las dosis totales absorbidas en tejido con PMD y los tiempos de irradiación para los protocolos *DBNCT* y *SBNCT*. Las Tabla 8 y Tabla 9, corresponden a las dosis absorbidas para cada una de las diferentes componentes de radiación, para cada uno de los protocolos, para cada irradiación del experimento *DBNCT* (4 Gy, 2 semanas de intervalo entre irradiaciones) y para el protocolo *SBNCT* (8 Gy), respectivamente.

En cuanto a los experimentos realizados en animales normales, se expusieron a la misma fluencia de neutrones que recibió el tejido con PMD para alcanzar determinada dosis absorbida. De esta forma se busca simular la dosis que recibirían los tejidos normales si se expusieran simultáneamente con el tejido con PMD.

Tabla 7. Tiempos de irradiación (min.) y dosis totales absorbidas en tejido con PMD para los protocolos DBNCT y SBNCT. En particular, para el protocolo DBNCT, las dosis mostradas corresponden a cada irradiación.

DBNCT 4 Gy, 2 semanas de intervalo (RA-3)		Min. Tejido con PMD (Gy)	
DHaz solo	4,6	0,9±0,1	
DBPA-BNCT	4,6	4±2	
D(GB-10+BPA)-BNCT	2,4	4±1	
SBNCT 8 Gy (RA-3)		Min. Tejido con PMD (Gy)	
SHaz solo	11,3	2,3±0,2	
SBPA-BNCT	11,3	8±2	
S(GB-10+BPA)-BNCT	6,3	8±2	

Tabla 8. Dosis absorbidas para cada una de las diferentes componentes de radiación, para cada uno de los protocolos, para cada irradiación del experimento DBNCT (4 Gy cada irradiación a tejido con PMD, 2 semanas de intervalo entre irradiaciones).

	Neutrones rápidos	Fotones gamma	Boro (tejido con PMD) (por ppm)	Protones inducidos
DHaz solo				
	-	0,46±0,05	-	0,4±0,1
DBPA-BNCT (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.)				
Bolsa de la mejilla	-	0,46±0,05	0,16±0,03	0,4±0,1
D(GB-10+BPA)-BNCT (GB-10: 34,5 mg¹⁰B/kg p.c.; BPA: 31 mg¹⁰B/kg p.c.)				
Bolsa de la mejilla	-	0,23±0,02	0,08±0,02	0,23±0,05

Tabla 9. Dosis absorbidas para cada una de las diferentes componentes de radiación, para cada uno de los protocolos, para el experimento SBNCT (8 Gy a tejido con PMD).

	Neutrones rápidos	Fotones gamma	Boro (tejido con PMD) (por ppm)	Protones inducidos
SHaz solo				
Bolsa de la mejilla	-	1,3±0,1	-	1,0±0,2
SBPA-BNCT (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.)				
Bolsa de la mejilla	-	1,3±0,1	0,36±0,08	1,0±0,2
S(GB-10+BPA)-BNCT (GB-10: 34,5 mg¹⁰B/kg p.c.; BPA: 31 mg¹⁰B/kg p.c.)				
Bolsa de la mejilla	-	0,69±0,07	0,20±0,04	0,6±0,1

Modelado computacional: “Hamster Tool”

Como fue descrito anteriormente (ítem III de esta sección), el cálculo de los tiempos de irradiación de los protocolos era realizado experimentalmente en base a los flujos neutrónicos, la concentración de boro, y la dosis prescrita en el tejido con PMD de la bolsa de la mejilla del hamster. Al inicio de cada año, el perfil de flujo neutrónico se mide en tres puntos pre-establecidos en el trampolín mediante alambres de Au-Cu. Antes de cada irradiación, un SPND se posiciona en el punto central del trampolín y en función de la lectura del flujo neutrónico de éste se establecía el tiempo de irradiación para alcanzar, en el punto medido (central), la dosis prescrita.

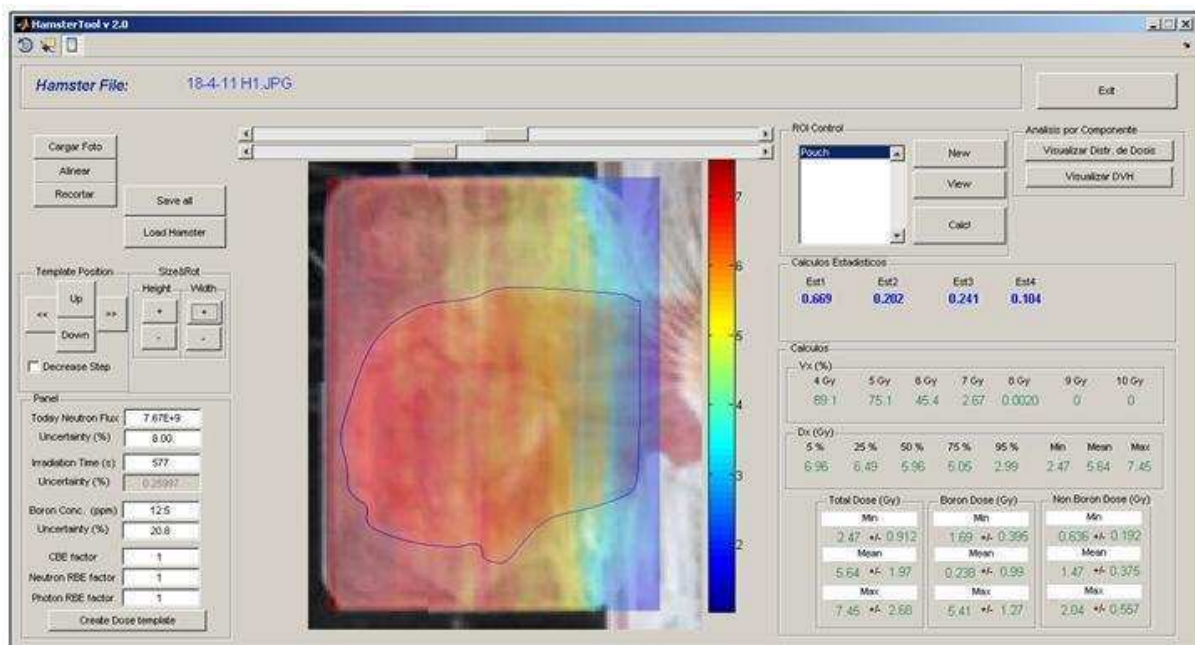
Para complementar la dosimetría experimental y mejorar la prescripción de dosis en estos protocolos, Farías et al. (2011) realizaron un estudio computacional utilizando el código de transporte neutrónico Monte Carlo N-Particle (MCNP) con el objetivo de desarrollar un modelo computacional de la bolsa de la mejilla del hámster evertida en el trampolín. Este modelo se introdujo en el modelo MCNP existente de la facilidad biomédica del RA-3, desarrollado por Bortolussi et al. (2011b) con el fin de simular la distribución tridimensional del flujo neutrónico y las diferentes componentes de dosis punto a punto. Basados en este modelo genérico de la bolsa de la mejilla del hámster, se desarrolló una interfaz gráfica (GUI) en lenguaje Matlab® que permite el cálculo de la distribución espacial de dosis para cada bolsa de la mejilla del hámster a partir de una fotografía y la visualización de la dosis entregada en cada punto del volumen tratado. Brevemente, se describe a continuación, el desarrollo de la herramienta. Dentro del marco de éste trabajo de tesis, se aportaron los datos biológicos necesarios para que el estudio computacional se ajustara lo mejor posible a la situación real del experimento biológico en cuestión.

Los trabajos comenzaron mediante la realización y validación del modelo del blindaje neutrónico. Para esto se reprodujo en MCNP el blindaje neutrónico en la posición adoptada dentro de la facilidad del reactor RA-3. Se reprodujeron los alambres de activación utilizados durante la caracterización experimental del blindaje en sus respectivas posiciones (punto cercano al blindaje, punto central y punto más lejano al blindaje, en el trampolín). Los valores de flujo neutrónico obtenidos computacionalmente se compararon con los valores experimentales, observándose un acuerdo superior al 90% en todos los puntos. Como siguiente paso, se estudiaron las variaciones en la distribución de flujo neutrónico ante variaciones en el volumen de la bolsa de la mejilla del hámster. Este estudio resultó adecuado no solo para estimar el flujo neutrónico sino también para estimar las variaciones en el flujo neutrónico debido a diferencias en las dimensiones de las bolsas de los hámsters posicionados en el dispositivo de irradiación. Dado que se demostró que no existen variaciones importantes en el flujo neutrónico debido a diferencias entre las bolsas de la mejilla de los hámsters evaluados, se desarrolló una plantilla genérica de las componentes de dosis de interés en el volumen, que puede ser adaptada para cada hamster tratado. De esta forma, se puede alcanzar fácilmente una dosimetría personalizada para cada forma de bolsa de hámster. Para facilitar y agilizar el estudio dosimétrico en cada hámster, se desarrolló una interfaz gráfica de usuario (GUI) mediante el programa Matlab®. En base a la

fotografía de la bolsa en la posición evertida pre-irradiación y en la plantilla dosimétrica genérica, el GUI permite al usuario dibujar la bolsa de la mejilla del hámster en la foto y generar una región de interés (ROI). La GUI asigna, a cada punto espacial que pertenece a la ROI, el correspondiente valor de dosis (absorbida o equivalente) y calcula los indicadores estadísticos y cuantitativos de interés para el usuario. Como la plantilla dosimétrica se calcula solo una vez, se aplica un factor de corrección para ajustar los valores absolutos de las componentes de dosis, que pueden variar debido a cambios sutiles del reactor, a partir de los valores medidos por el SPND antes de cada irradiación (Farías et al, 2011).

Como ejemplo, se muestra la captura de pantalla del programa de simulación “Hamster Tool” para el protocolo SBPA-BNCT (8 Gy) (Ilustración 23).

Ilustración 23. Ejemplo de captura de pantalla del programa de simulación “Hamster tool” con la foto de la bolsa de la mejilla del hámster pegada en el trampolín para su irradiación, correspondiente al protocolo SBPA-BNCT (8 Gy a tejido con PMD).



Como se ve en la figura, la foto de la bolsa pegada en el trampolín se ingresa en el programa junto con los datos de flujo, tiempo de irradiación y concentración de boro (con sus respectivos porcentajes de incerteza). Luego, se marca la ROI, conformada por los bordes de la bolsa, para obtener un mapa de dosis en color que permite conocer la dosis punto a punto simulada en la bolsa irradiada, a partir de los parámetros ingresados. El programa permite calcular diferentes parámetros:

- Estadístico 1 (Diferencia relativa): $(\text{Dosis máxima} - \text{Dosis mínima}) / \text{Dosis máxima}$.
- Estadístico 2: Desvío estándar de la dosis / Dosis media de la dosis recibida.

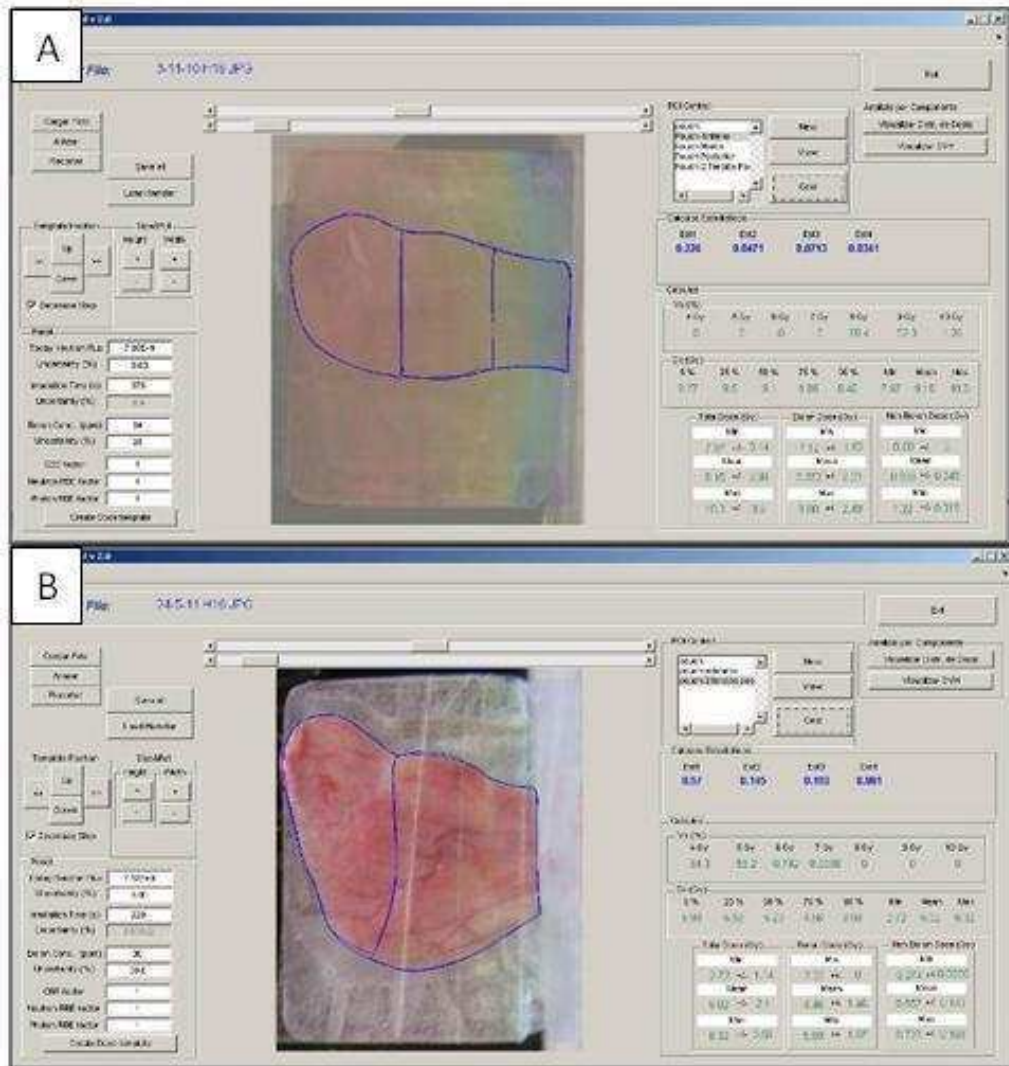
- Estadístico 3: (Mínima dosis recibida por el 25/ del volumen – Mínima dosis recibida por el 75/ del volumen) / Mínima dosis recibida por el 50/ del volumen.
- Estadístico 4: Mediana (Diferencia de la dosis absorbida puntual – Mínima dosis recibida por el 50/ del volumen) / Mínima dosis recibida por el 50/ del volumen.
- Porcentaje de volumen de bolsa que recibió X Gy: 4 Gy, 5 Gy, 6 Gy, 7 Gy, 8 Gy, 9 Gy y 10 Gy.
- Distribución en volumen de dosis acumulada, es decir, que dosis recibió al menos un 5/ , 25/ , 50/ , 75/ y 95/ de bolsa de la mejilla del hamster.
- Dosis media absorbida en toda la bolsa irradiada, la dosis máxima y mínima (con sus desvíos). A su vez el programa permite ingresar los datos de CBE y RBE para calcular dosis absorbidas equivalentes.
- Componente boro media, máxima y mínima (con sus desvíos).
- Componente no boro media, máxima y mínima (con sus desvíos).

A su vez, el programa permite generar un histograma dosis-volumen de bolsa irradiada que nos indica qué volumen de la bolsa recibió una determinada dosis acumulada. Como ejemplo, se presentan en la sección Resultados correspondientes a este ítem (IV), los histogramas para los protocolos del experimento SBNCT (8 Gy).

El programa también permite calcular los mismos parámetros descritos pero en diferentes regiones de la bolsa (Ilustración 24A y B). En nuestro trabajo, separamos la bolsa en 2 regiones: **anterior** (lejano al blindaje, zona que presentó mayor radiotoxicidad en el experimento SBNCT 8 Gy) y **medio-posterior** (medio y al lado del blindaje) (Ilustración 24B).

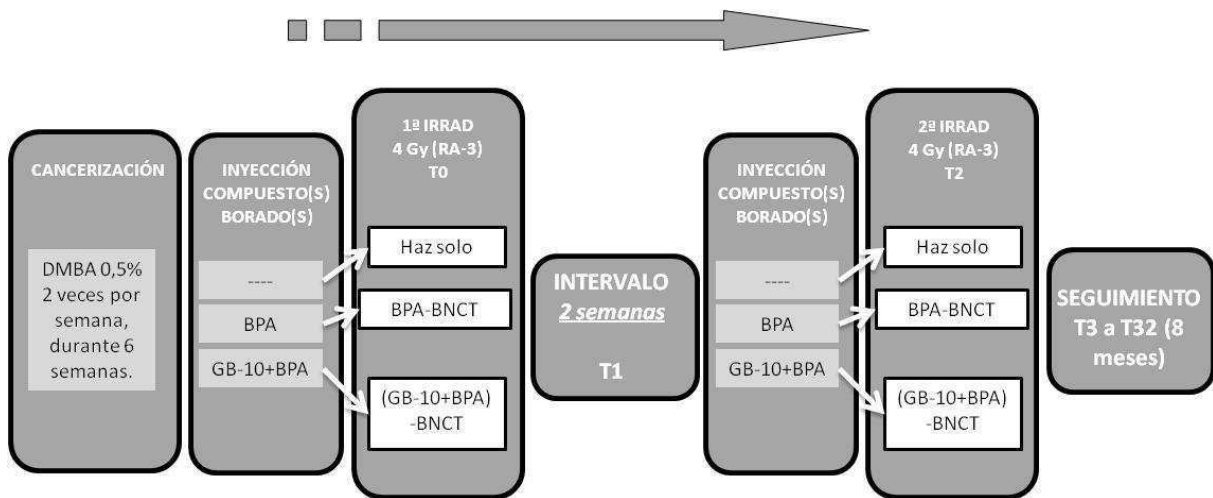
En cuanto al análisis retrospectivo de la dosis en las diferentes regiones de la bolsa se analizarán, en la sección Resultados de los ítems IV, V y VI: el estadístico 1, el cual analiza la inhomogeneidad relativa de dosis recibida por la bolsa pegada en el trampolín; el porcentaje de volumen de bolsa que al menos recibió X Gy; dosis mínima recibida por un volumen (Vx) de bolsa irradiada; dosis máxima, media y mínima absorbida en toda la bolsa irradiada (con sus desvíos); la componente boro media, máxima y mínima (con sus desvíos); y la componente no boro media, máxima y mínima (con sus desvíos).

Ilustración 24. Modelado computacional de diferentes regiones de la bolsa de la mejilla del hámster: **(A)** 3 regiones: anterior (lejano al blindaje), medio, posterior (al lado del blindaje); **(B)** 2 regiones: anterior y medio-posterior.

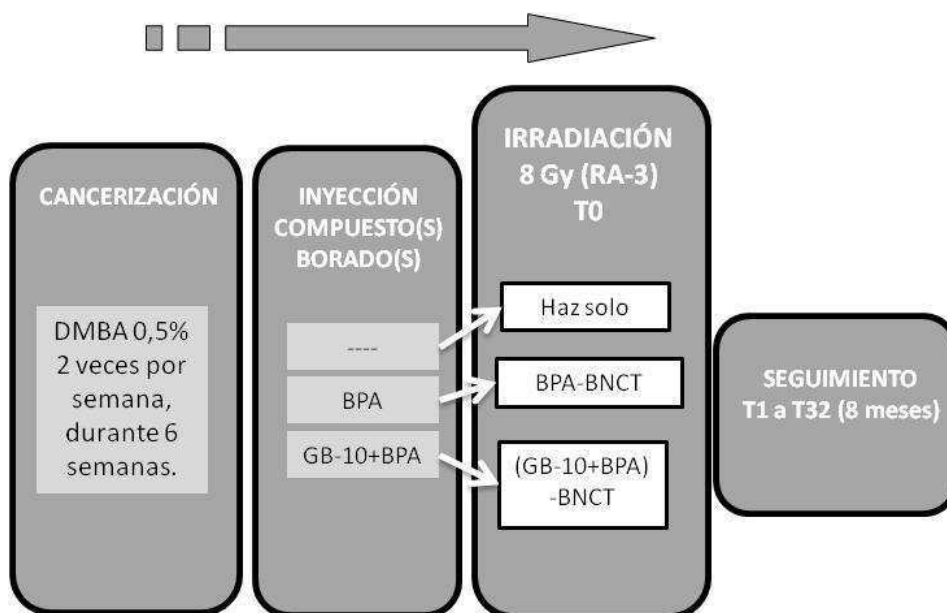


Esquema general de trabajo

A continuación se muestra un esquema correspondiente al estudio de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT desfasada en el tiempo (DBNCT), con un intervalo de 2 semanas entre irradiaciones, 4 Gy dosis absorbida en cada irradiación a tejido con PMD, en el reactor RA-3 (Centro Atómico Ezeiza, provincia de Buenos Aires, Argentina).



El siguiente esquema corresponde al estudio de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *única* aplicación de BNCT (SBNCT), 8 Gy dosis total absorbida a tejido con PMD, en el reactor RA-3 (Centro Atómico Ezeiza, provincia de Buenos Aires, Argentina).



IVc. Seguimiento

Estado general de los animales

Se evaluó el estado clínico de los animales mediante inspección visual y se pesaron semanalmente (inclusive el peso inicial pre-irradiación). Se calculó el *peso promedio \pm desvío estándar* y el *promedio del porcentaje de cambio de peso \pm desvío estándar* para cada tiempo para los animales irradiados cancerizados y normales, normales sin irradiar y, también una semana post la última topicación, para los animales cancerizados, sham-irradiados (grupo control).

Para desarrollar estos estudios se respetaron las normas locales e institucionales que aseguran la ética y bienestar del animal durante toda la investigación.

Análisis de radiotoxicidad

Se monitoreó semanalmente la potencial radiotoxicidad en términos de mucositis en tejido con PMD y normal, post cada irradiación. La severidad de la mucositis fue evaluada semi-cuantitativamente en función de una escala de mucositis bucal basada en características macroscópicas, adaptada de López Castaño et al. (2005) y Sonis et al. (2000) y descrita anteriormente (esta sección, ítem III). Se calculó el *porcentaje de animales con cada grado de mucositis*, por protocolo. En cuanto a los tiempos de seguimiento en el análisis de radiotoxicidad, se siguieron los animales periódicamente hasta la completa resolución de la mucositis (grados 0 y 1). Se tomaron fotos para ejemplificar los efectos radiotóxicos observados.

Además, como método complementario al análisis de radiotoxicidad, se evaluó la aplicación de la Termografía Infrarroja Dinámica, como complemento al seguimiento macroscópico de la mucositis en algunos de los animales tratados con el protocolo DBNCT (4 Gy dosis absorbida a tejido con PMD en cada irradiación, 2 semanas de intervalo). La descripción de la técnica y resultados se encuentran en el **ANEXO 1: IMAGENOLOGÍA DINÁMICA INFRARROJA: Estudios complementarios para evaluar radiotoxicidad.**

Cinética del desarrollo tumoral

El desarrollo potencial de tumores nuevos en tejido con PMD fue evaluado mediante la eversión y examinación macroscópica de la bolsa derecha de la mejilla de los hámsters de cada uno de los grupos previamente nombrados, una vez por semana durante 8 meses (32 semanas post primera irradiación). En cuanto al grupo control, el desarrollo tumoral se evaluó una semana después de finalizar la topicación (T0).

Los parámetros estudiados fueron:

- *Porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos respecto a T0.*
- *T50 y T80 (tiempo después de T0 al cual 50/ y 80/ de los animales desarrollaron nuevos tumores respecto a T0, respectivamente).*

Además, se tomaron fotos de las bolsas que no desarrollaron tumores en ningún tiempo del período de seguimiento (8 meses).

Análisis estadístico

La significancia estadística de los porcentajes acumulados de animales con tumores nuevos de los diferentes grupos de tratamiento versus grupo control fue analizada mediante una tabla de contingencia de 2x2, computando el valor de "p" mediante el test exacto de Fisher, a tiempos representativos. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,05$.

V. Estudios de biodistribución y BNCT “piloto” *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *única* aplicación de BNCT, dosis total absorbida de 6 Gy a tejido con PMD.

Breve resumen

Dado que los animales de los protocolos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT (8 Gy) presentaron mucositis severa con pérdida de tejido con PMD, mientras que los correspondientes a DBNCT (4 Gy cada irradiación) mostraron mucositis leve pero un efecto terapéutico sub-óptimo, nuestro siguiente objetivo consistió en encontrar una dosis total absorbida entre 4 Gy y 8 Gy, que genere efectos radiotóxicos leves o moderados a nivel clínico y permitan realizar una segunda irradiación. Para ello comenzamos con la dosis que recibió la parte media-posterior de la bolsa irradiada con SBNCT 8 Gy, que correspondió a una dosis media de 6 Gy, calculada a partir del “Hamster tool”.

Va. Estudios de biodistribución

Los valores de concentración de boro para el protocolo BPA en tejido con PMD (empleado para calcular el tiempo requerido para administrar la dosis absorbida deseada) se obtuvieron mediante mediciones complementarias de boro en ICP-OES e ICP-MS. Se midieron como tejidos de referencia sangre y tejido normal. La digestión de sangre y tejidos para ICP-OES e ICP-MS corresponde a lo explicado en el ítem IVa de esta misma sección.

Se calcularon los valores absolutos de contenido de boro (*promedio de valores de todas las muestras de los animales analizados \pm desvío estándar*) en sangre, tejido con PMD y normal, y la relación *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre*.

Vb. Estudios radiobiológicos

Se detallan los grupos experimentales evaluados:

Grupo 1 [SBPA-BNCT]: 4 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración. *Única* aplicación de BNCT.

Grupo 2 [Control]: 88 hámsters cancerizados sham-irradiados, igualados por edad y tiempo de seguimiento.

En cuanto a la administración del BPA, fue administrado en bolo intraperitonealmente, a una dosis de 15,5 mg¹⁰B/kg p.c. 3 hs antes de la irradiación.

Los animales fueron irradiados en la facilidad térmica construida en el reactor RA-3 empleando un blindaje de carbonato de ⁶litio para proteger el cuerpo del animal mientras la bolsa de la mejilla es evertida, y pegada sobre el trampolín para su exposición (esta sección, ítem III Ilustración 20; Miller et al., 2009; Pozzi et al., 2009). La Tabla 10 muestra las dosis

totales absorbidas en tejido con PMD y los tiempos de irradiación. La Tabla 11 muestra las componentes de dosis.

Tabla 10. Tiempos de irradiación (min.) y dosis totales absorbidas en tejido con PMD.

SBNCT 6 Gy (RA-3) Min. Tejido con PMD (Gy)		
SBPA-BNCT	9,6	6,0±1,2

Tabla 11. Dosis absorbidas para cada una de las diferentes componentes de radiación.

	Neutrones rápidos	Fotones gamma	Boro (tejido con PMD) (por ppm)	Protones inducidos
SBPA-BNCT (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.)				
Bolsa de la mejilla	-	1,0±0,1	0,33±0,07	0,9±0,2

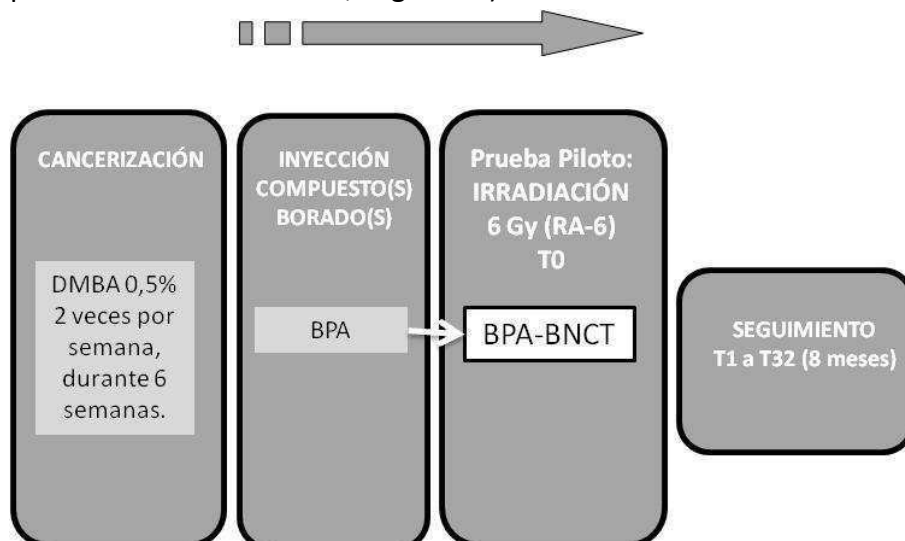
Esta prueba piloto se realizó solamente con el protocolo BPA-BNCT dado que, en todos los experimentos llevados a cabo hasta el momento, corresponde al protocolo que mayor radiotoxicidad provocó en tejido con PMD (sección Resultados ítems III y IV).

En base a los efectos radiotóxicos ocurridos post la primera irradiación realizada (sección Resultados ítem V, ANEXO 2-Tabla 67), no fue posible realizar una segunda irradiación (es por ello que llamamos a este protocolo SBNCT: “single” BNCT).

Se realizó el análisis retrospectivo de la dosis en las diferentes regiones de la bolsa de los animales tratados utilizando el “Hamster tool”, tal como se explicó en el ítem IV de esta sección.

Esquema general de trabajo

A continuación se muestra un esquema correspondiente al estudio piloto de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *única* aplicación de BNCT (SBNCT), 6 Gy dosis total absorbida a tejido con PMD, en el reactor RA-3 (Centro Atómico Ezeiza, provincia de Buenos Aires, Argentina).



Vc. Seguimiento

Estado general de los animales

Se evaluó el estado clínico de los animales mediante inspección visual y se pesaron semanalmente (inclusive el peso inicial pre-irradiación). Se calculó el *peso promedio \pm desvío estándar* y el *promedio del porcentaje de cambio de peso \pm desvío estándar* para cada tiempo para los animales irradiados cancerizados y, también una semana post la última topicación, para los animales cancerizados, sham-irradiados (grupo control).

Para desarrollar estos estudios se respetaron las normas locales e institucionales que aseguran la ética y bienestar del animal durante toda la investigación.

Análisis de radiotoxicidad

Se monitoreó semanalmente la potencial radiotoxicidad en términos de mucositis en tejido con PMD y normal, post irradiación. La severidad de la mucositis fue evaluada semi-cuantitativamente en función de una escala de mucositis bucal basada en características macroscópicas, adaptada de López Castaño et al. (2005) y Sonis et al. (2000) y descripta anteriormente (esta sección, ítem III). Se calculó el *porcentaje de animales con cada grado de mucositis*, por protocolo. En cuanto a los tiempos de seguimiento en el análisis de radiotoxicidad, se siguieron los animales periódicamente hasta la completa resolución de la mucositis (grado 0 y 1). Se tomaron fotos para ejemplificar los efectos radiotóxicos observados.

Cinética del desarrollo tumoral

El desarrollo potencial de tumores nuevos en tejido con PMD fue evaluado mediante la eversión y examinación macroscópica de la bolsa derecha de la mejilla de los hámsters, una vez por semana durante 8 meses (32 semanas post irradiación). En cuanto al grupo control, el desarrollo tumoral se evaluó una semana después de finalizar la topicación (T0).

Los parámetros estudiados fueron:

- *Porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos respecto a T0.*
- *T50 y T80 (tiempo después de T0 al cual 50% y 80% de los animales desarrollaron nuevos tumores respecto a T0, respectivamente).*

Análisis estadístico

La significancia estadística de los porcentajes acumulados de animales con tumores nuevos de los diferentes grupos de tratamiento versus grupo control fue analizada mediante una tabla de contingencia de 2x2, computando el valor de "p" mediante el test exacto de Fisher, a tiempos representativos. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,05$.

VI. Estudios de biodistribución y BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT con un intervalo de 4 semanas entre irradiaciones, 5 Gy dosis absorbida a tejido con PMD en cada irradiación.

Breve resumen

La prueba piloto de irradiación con una dosis absorbida de 6 Gy demostró una radiotoxicidad severa (grado 5), con pérdida de tejido con PMD en la región anterior de la bolsa. Sin embargo, en la porción de bolsa que no se necrosó, observamos una tendencia marcada a la inhibición tumoral. Empleando el modelo computacional desarrollado por Farías et al. (2011), estimamos que la dosis media que recibió la zona de la bolsa que no se necrosó fue de 5 Gy. Luego, el siguiente objetivo consistió en explorar el potencial de esta nueva dosis absorbida de 5 Gy en términos de radiotoxicidad e inhibición tumoral. Si los efectos radiotóxicos lo permitieran, se realizaría una segunda irradiación ampliando el intervalo a 4 semanas.

VIa. Estudios de biodistribución

Para el protocolo BPA, se utilizaron los valores reportados en la sección Resultados ítem V, Tabla 32. En cuanto al protocolo (GB-10+BPA), se realizaron estudios complementarios de medición de contenido de boro (*promedio de valores de todas las muestras de los animales analizados \pm desvío estándar*) en sangre, tejido con PMD y normal, y se calcularon nuevamente las relaciones *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* para el protocolo (GB-10+BPA). Los valores de concentración de boro se obtuvieron mediante ICP-OES e ICP-MS. La digestión de la sangre y tejidos para ICP-OES e ICP-MS corresponde a lo explicado en el ítem IVa de esta misma sección.

VIc. Estudios radiobiológicos

Mediante la herramienta computacional de Farías et al. (2011) se determinó que la porción de bolsa no necrosada en la prueba piloto SBNCT 6 Gy (ítem V), había recibido una dosis media de 5 Gy (Resultados ítem VI, Tabla 35). Es por ello que decidimos trabajar con una dosis media de 5 Gy, considerando realizar una segunda irradiación en el caso que las características post 1° irradiación de la bolsa lo permitieran, con un intervalo de 1 mes entre aplicaciones.

El tiempo elegido para la segunda aplicación en este nuevo protocolo corresponde al momento en el cual se resuelve totalmente la mucositis en el tejido con PMD remanente en los grupos de animales irradiados con SBNCT 8 Gy y 6 Gy, y al tiempo en el cual el porcentaje de animales con tumores nuevos post-irradiación resulta significativamente menor al control (Resultados ítems III, IV y V). De esta manera esperamos reducir la radiotoxicidad en tejido con PMD mejorando el efecto terapéutico versus los experimentos mencionados.

Se detallan los grupos experimentales evaluados:

Grupo 1 [DBPA-BNCT]: 6 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración. *Doble* aplicación de BNCT, con 1 mes de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 2 [D(GB-10+BPA)-BNCT]: 6 hámsters cancerizados inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (31 mg¹⁰B/kg p.c.) y GB-10 (1:10) (34,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración de GB-10 y 1,5 horas después de la última inyección de BPA. *Doble* aplicación de BNCT, con 1 mes de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 3 [DHaz solo]: 6 hámsters normales irradiados con el haz de neutrones solamente (sin inyección previa de compuesto/s borado/s) para estudiar el efecto de la radiación de fondo. Las irradiaciones con “haz solo” fueron realizadas a la mayor fluencia de neutrones (o mayor tiempo de exposición) utilizada en las irradiaciones con los otros dos protocolos. Esta fluencia corresponde al protocolo BPA-BNCT. *Doble* aplicación de “haz solo”, con 1 mes de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 4 [normal DBPA-BNCT]: 4 hámsters normales (no cancerizados) inyectados con BPA-fructosa 0,14 M (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.) e irradiados con el haz de neutrones 3 horas post-administración para estudiar el efecto de BNCT sobre tejido normal. *Doble* aplicación de BNCT, con 1 mes de intervalo entre ambas aplicaciones.

Grupo 5 [Control]: 88 hámsters fueron cancerizados sham-irradiados, igualados por edad y tiempo de seguimiento.

Tal como se explicó en los experimentos anteriores, para el protocolo BPA-BNCT, BPA fue administrado en bolo, intraperitonealmente a una dosis de 15,5 mg¹⁰B/kg p.c. 3hs antes de cada irradiación. Para (GB-10+BPA)-BNCT, GB-10 y BPA fueron administrados en conjunto. GB-10 fue administrado en bolo, intravenoso, a una dosis de 34,5 mg¹⁰B/kg p.c. y BPA fue administrado como nueve inyecciones, cada 20 minutos, intraperitonealmente, a una dosis total de 31 mg¹⁰B/kg p.c. La irradiación fue realizada 3hs post-administración de GB-10 y 1,5hs luego de la última inyección de BPA.

Los animales fueron irradiados en la facilidad térmica construida en el reactor RA-3, Centro Atómico Ezeiza (provincia de Buenos Aires) empleando un blindaje de carbonato de ⁶litio para proteger el cuerpo del animal mientras la bolsa de la mejilla es evertida y pegada sobre el trampolín para su exposición (Miller et al., 2009; Pozzi et al., 2009 – esta sección ítem III). La Tabla 12 muestra las dosis totales absorbidas en tejido con PMD y los tiempos de irradiación. La Tabla 13 muestra las componentes de dosis calculadas con la herramienta “Hamster Tool”. Para calcular el tiempo de irradiación, en función de la concentración de boro en tejido con PMD, para cada protocolo, para entregar 5 Gy dosis media absorbida al tejido con PMD, se utilizó la herramienta computacional “Hamster Tool” de Farías et al.

(2011). En cuanto a los experimentos realizados en animales normales, se expusieron a la misma fluencia de neutrones que recibió el tejido con PMD.

Se analizó radiotoxicidad en tejido normal solo con el protocolo *DBPA-BNCT* dado que es el protocolo de BNCT que mayor radiotoxicidad genera en tejido con PMD y en tejido normal (ANEXO 2-Tabla 72).

Tabla 12. Tiempos de irradiación (min.) y dosis medias totales absorbidas en tejido con PMD. Cada parámetro corresponde a cada irradiación. El tiempo de irradiación fue calculado utilizando el “Hamster Tool”.

<i>DBNCT</i> 5Gy, 4 semanas de intervalo (RA-3)	Min. Tejido con PMD (Gy)	
<i>D</i>Haz solo	8,1	1,2±0,3
<i>DBPA-BNCT</i>	8,1	5±2
<i>D(GB-10+BPA)-BNCT</i>	3,5	5±2

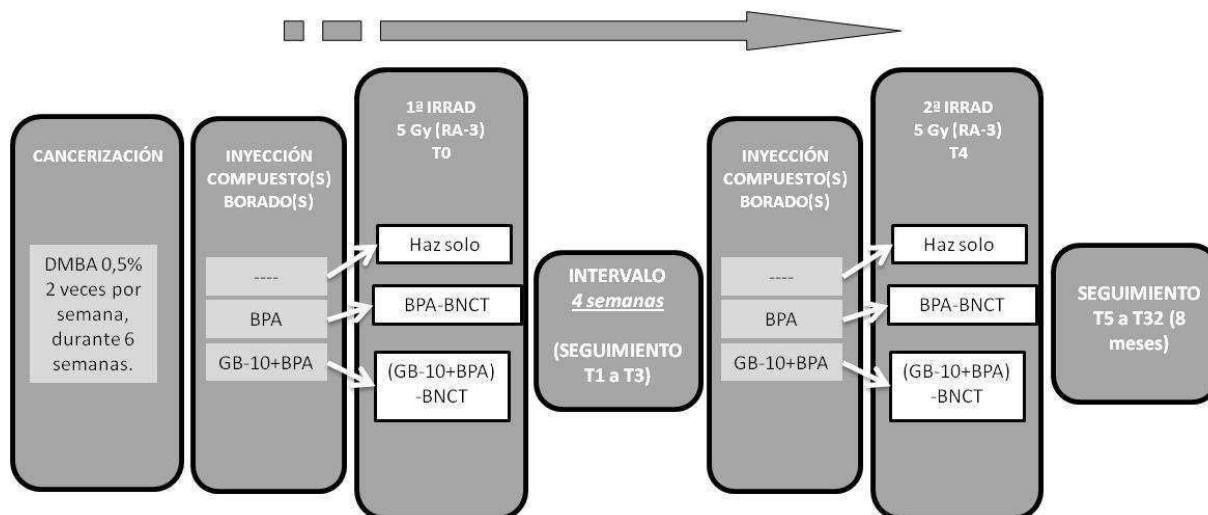
Tabla 13. Dosis medias absorbidas para cada una de las diferentes componentes de radiación, para cada uno de los protocolos. Cada parámetro corresponde a cada irradiación, y fue calculado utilizando el “Hamster Tool”.

	Neutrones rápidos	Fotones gamma	Boro (tejido con PMD) (por ppm)	Protones inducidos
<i>D</i>Haz solo				
Bolsa de la mejilla	-	0,35±0,07	-	0,84±0,06
<i>DBPA-BNCT</i> (15,5 mg¹⁰B/kg p.c.)				
Bolsa de la mejilla	-	0,35±0,07	0,27±0,09	0,84±0,06
<i>D(GB-10+BPA)-BNCT</i> (GB-10: 34,5 mg¹⁰B/kg p.c.; BPA: 31 mg¹⁰B/kg p.c.)				
Bolsa de la mejilla	-	0,16±0,03	0,12±0,06	0,39±0,03

Se realizó el análisis retrospectivo de la dosis en las diferentes regiones de la bolsa de los animales tratados utilizando el “Hamster tool”, tal como se explicó en el ítem IV de esta sección.

Esquema general de trabajo

A continuación se muestra un esquema correspondiente al estudio de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT desfasada en el tiempo (*DBNCT*), con un intervalo de 4 semanas entre irradiaciones, 5 Gy dosis media absorbida en cada irradiación a tejido con PMD (10 Gy dosis media total absorbida), en el reactor RA-3 (Centro Atómico Ezeiza, provincia de Buenos Aires, Argentina).



VId. Seguimiento

Estado general de los animales

Se evaluó el estado clínico de los animales mediante inspección visual y se pesaron semanalmente (inclusive el peso inicial pre-irradiación). Se calculó el *peso promedio \pm desvío estándar* y el *promedio del porcentaje de cambio de peso \pm desvío estándar* para cada tiempo para los animales irradiados cancerizados y normales, normales sin irradiar y, también una semana post la última topicación, para los animales cancerizados, sham-irradiados (grupo control).

Para desarrollar estos estudios se respetaron las normas locales e institucionales que aseguran la ética y bienestar del animal durante toda la investigación.

Análisis de radiotoxicidad

Se monitoreó semanalmente la potencial radiotoxicidad en términos de mucositis en tejido con PMD y normal, post cada irradiación. La severidad de la mucositis fue evaluada semi-cuantitativamente en función de una escala de mucositis bucal basada en características macroscópicas, adaptada de López Castaño et al. (2005) y Sonis et al. (2000) y descrita anteriormente (esta sección, ítem III). Se calculó el *porcentaje de animales con cada grado de mucositis*, por protocolo. En cuanto a los tiempos de seguimiento en el análisis de radiotoxicidad, se siguieron los animales periódicamente hasta la completa resolución de la mucositis (grado 0 y 1). Se tomaron fotos para ejemplificar los efectos radiotóxicos observados.

Cinética del desarrollo tumoral

El desarrollo potencial de tumores nuevos en tejido con PMD fue evaluado mediante la eversión y examinación macroscópica de la bolsa derecha de la mejilla de los hámsters de cada uno de los grupos previamente nombrados, una vez por semana durante 8 meses (32 semanas post primera irradiación). En cuanto al grupo control, el desarrollo tumoral se evaluó una semana después de finalizar la topicación (T0).

Los parámetros estudiados fueron:

- *Porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos respecto a T0.*
- *T50 y T80 (tiempo después de T0 al cual 50% y 80% de los animales desarrollaron tumores nuevos respecto a T0 respectivamente).*

Además, se tomaron fotos de las bolsas que no desarrollaron tumores en ningún tiempo del período de seguimiento (8 meses).

Análisis estadístico

La significancia estadística de los porcentajes acumulados de animales con tumores nuevos de los diferentes grupos de tratamiento versus grupo control fue analizada mediante una tabla de contingencia de 2x2, computando el valor de "p" mediante el test exacto de Fisher, a tiempos representativos. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

I. Desarrollo y caracterización del modelo de cancerización de campo para estudios de BNCT a *largo* plazo.

Breve resumen

Tal como se explicó anteriormente, controlar el tejido con PMD resulta central en la terapia oncológica. Habiendo previamente demostrado el éxito terapéutico de una *única* aplicación de BNCT mediado por BPA (borofenilalanina), GB-10 ($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) o (GB-10 + BPA) en el tratamiento de tumores de la bolsa de la mejilla del hamster, sin radiotoxicidad en el tejido normal expuesto (Kreimann et al., 2001; Trivillin et al., 2004, 2006; Pozzi et al., 2009), se realizó un estudio a *corto* plazo de BNCT en el control del tejido con PMD o tejido cancerizado que rodea a los tumores (Heber et al., 2007). Aunque los resultados fueron alentadores, la marcada agresividad de este protocolo de carcinogénesis solo permitió estudios de control tumoral y de tejido con PMD a *corto* plazo. Luego, con el objetivo de encontrar aquel protocolo de carcinogénesis que permitiera el estudio del tejido con PMD a *largo* plazo (8 meses), que indujera el desarrollo de tumores en aproximadamente el 90% de los animales y que simulara más cercanamente el proceso de cancerización que ocurre en la boca humana, se evaluaron diferentes protocolos de carcinogénesis en cuanto al estado clínico del animal (y la consiguiente factibilidad de realizar un seguimiento a *largo* plazo) y el desarrollo tumoral a partir del tejido con PMD, durante el período de seguimiento que fue posible alcanzar dependiendo del estado del animal.

Estado general de los animales

El protocolo de 12 semanas solo permitió un seguimiento a *corto* plazo (1 mes post-T0) debido al rápido desarrollo de tumores de gran tamaño que impedían la alimentación y comprometían la calidad de vida de los animales. De esta forma, el protocolo de 12 semanas resulta adecuado para inducir tumores para estudios de control tumoral a *corto* plazo pero no resulta útil para estudios a *largo* plazo que resultan necesarios en los estudios de tejido con PMD.

En cuanto a los protocolos de 4 y 6 semanas, permitieron un seguimiento a *largo* plazo (8 meses post-T0) mientras que los protocolos de 7 y 8 semanas permitieron un período de evaluación *intermedio* (3 meses post-T0).

Luego, la factibilidad del seguimiento a *largo* plazo varió con la agresividad de los protocolos de carcinogénesis.

Cinética del desarrollo tumoral

La Tabla 14 muestra el *número de topicaciones con DMBA correspondiente a cada protocolo* (desde 36 aplicaciones en el protocolo de 12 semanas a 8 aplicaciones en el protocolo de 4 semanas) y el *porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores en el tejido con PMD a T0* (una semana después de finalizado el protocolo de cancerización)

y a tiempos representativos post-T0, para cada uno de los protocolos de carcinogénesis. En base a la tabla, podemos observar como el porcentaje acumulado de animales con tumores aumentó progresivamente con la agresividad de los protocolos de carcinogénesis y tiempo post-T0.

Tabla 14. Número de topicaciones de DMBA correspondientes a cada protocolo de carcinogénesis y porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores a T0 y tiempos representativos post-T0, para cada uno de los diferentes protocolos de carcinogénesis. “n” indica el número de animales analizados.

Protocolo de carcinogénesis	Nº topicaciones	Tiempo (meses)								
		T0	1	2	3	4	5	6	7	8
12 semanas (n=19)	36	90/	100/	-	-	-	-	-	-	-
8 semanas (n=19)	16	47/	90/	95/	100/	-	-	-	-	-
7 semanas (n=19)	14	32/	74/	79/	90/	-	-	-	-	-
6 semanas (n=88)	12	9/	59/	72/	83/	88/	88/	90/	93/	93/
4 semanas (n=21)	8	0/	19/	33/	38/	38/	38/	38/	38/	38/

En cuanto al *T50* (tiempo al cual 50% de los animales desarrollaron tumores), disminuyó con el aumento de la agresividad de los protocolos de carcinogénesis, es decir: **21 días** para el protocolo de 6 semanas, **14 días** para el de 7 semanas y **3 días** para el de 8 semanas. En el caso del protocolo de 12 semanas, para **T0**, el 90% de los animales ya había desarrollado tumores. En el caso del protocolo de 4 semanas, **no se alcanzó** el 50% de los animales con tumores en ningún tiempo, durante todo el período de seguimiento de 8 meses.

En cuanto al *T80* (tiempo al cual 80% de los animales desarrollaron tumores), resultó ser **T0** para el protocolo de 12 semanas, **4 semanas** post-T0 para el protocolo de 8 semanas, **7 semanas** post-T0 para el protocolo de 7 semanas y **10 semanas** para el protocolo de 6 semanas. En cuanto al protocolo 4 semanas, se obtuvo un máximo de 38% de animales con tumores a los 8 meses. Luego, el fracaso del protocolo de 4 semanas en garantizar el desarrollo tumoral en la mayoría de los animales hizo que este protocolo resultara inadecuado para generar un tejido con PMD para estudiar el potencial efecto inhibitorio del BNCT (u otras estrategias terapéuticas) en el desarrollo tumoral, a *largo* plazo. En cuanto a los protocolos de 7, 8 y 12 semanas, se alcanzó el 90% y 100% de animales con tumores a *mediano* y *corto* plazo (3 meses para los protocolos de 7 y 8 semanas y 1 mes para el de 12 semanas). Si bien estos protocolos de carcinogénesis garantizarían el desarrollo tumoral en virtualmente todos los animales, resultaron inadecuados para generar modelos de tejido con PMD para seguimiento a *largo* plazo ya que indujeron cierto grado de toxicidad sistémica a *mediano-corto* plazo. En cuanto al protocolo de 6 semanas, se alcanzó un 93% de animales con tumores a los 8 meses, lo que corrobora que este protocolo es capaz de generar

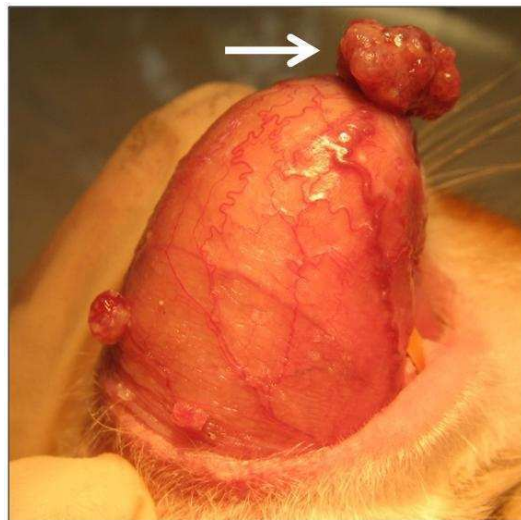
tumores en la mayoría de los animales, permitiendo un seguimiento a *largo* plazo. Esto simula más adecuadamente el proceso de carcinogénesis en la boca humana.

La Tabla 15 muestra el *porcentaje de animales con al menos un tumor grande (>10 mm³)*. Se observa claramente como la incidencia de tumores grandes aumentó con el tiempo y la agresividad de los protocolos de carcinogénesis. A continuación, como ejemplo, se muestra la bolsa de un animal cancerizado con el protocolo de 6 semanas que, a los 8 meses, desarrolló un tumor mayor a 10 mm³ (Ilustración 25).

Tabla 15. Porcentaje de animales disponibles para evaluación con al menos un tumor grande (>10 mm³) a tiempos representativos post-T0 para cada uno de los protocolos de carcinogénesis. “n” indica el número de animales analizados.

Protocolo de carcinogénesis	Tiempo (meses)		
	1	3	8
12 semanas (n=19)	100/	-	-
8 semanas (n=19)	26/	79/	-
7 semanas (n=19)	21/	26/	-
6 semanas (n=88)	6/	26/	36/
4 semanas (n=21)	0/	0/	0/

Ilustración 25. Ejemplo de una bolsa de un animal cancerizado con el protocolo de 6 semanas que, a los 8 meses, desarrolló un tumor mayor a 10 mm³ (tamaño del tumor marcado con la flecha: 252 mm³).



En cuanto a las *remisiones espontáneas*, tuvieron un rango de entre 6 a 25/ para los protocolos de 4, 6 y 7 semanas en sus correspondientes períodos de seguimiento. Los protocolos de 8 y 12 semanas no mostraron remisiones espontáneas a lo largo del período de seguimiento.

Análisis histológico y síntesis de ADN

Además del estudio a nivel macroscópico, se realizó un análisis microscópico de aquellos animales expuestos al protocolo de 6 semanas (Ilustración 26) confirmando la existencia de las mismas categorías histológicas que son conocidas en el tejido con PMD del protocolo clásico de 12 semanas (Heber et al 2007), estas son: NUMF (No Unusual Microscopic Features: epitelio sin lesiones aparentes pero con fibrosis subepitelial); hiperplasia; displasia. Estas áreas también coexisten con los tumores.

La Tabla 16 muestra el *promedio de núcleos marcados con BrdU/campo en cada categoría histológica* de tejido con PMD (NUMF, hiperplasia y displasia) para el protocolo de carcinogénesis de 12 semanas en T0 y para el protocolo de 6 semanas en los tiempos T0 y 8 meses post-T0. En general, los núcleos marcados con BrdU aumentaron progresivamente con el tiempo y agresividad del protocolo. Si se observan los valores de núcleos marcados con BrdU a T0 para todas las categorías histológicas, los valores fueron significativamente menores para el protocolo de 6 semanas versus el de 12 semanas ($p < 0,002$). Además, aún a los 8 meses post-T0, estos valores continuaron siendo significativamente menores a los del tiempo T0 del protocolo de 12 semanas, para todas las categorías histológicas ($p < 0,03$). Comparando los valores promedio de núcleos marcados en T0 versus 8 meses post-T0 para el protocolo de 6 semanas, a los 8 meses post-T0 los valores fueron mayores que para T0 en todas las categorías histológicas, aunque la diferencia alcanzó significancia estadística para las categorías NUMF e hiperplasia ($p < 0,0001$). En casi todos los casos correspondientes al tejido cancerizado (tanto con el protocolo de 6 semanas como el de 12 semanas), los valores resultaron significativamente mayores ($p < 0,0001$) al del tejido normal (no cancerizado) ($0,8 \pm 1,2$ núcleos marcados BrdU/campo). La única excepción fue el valor para NUMF a T0 para el protocolo de 6 semanas ($0,7 \pm 1,2$ núcleos marcados BrdU/campo) que no exhibió una diferencia estadísticamente significativa respecto al valor para tejido normal correspondiente.

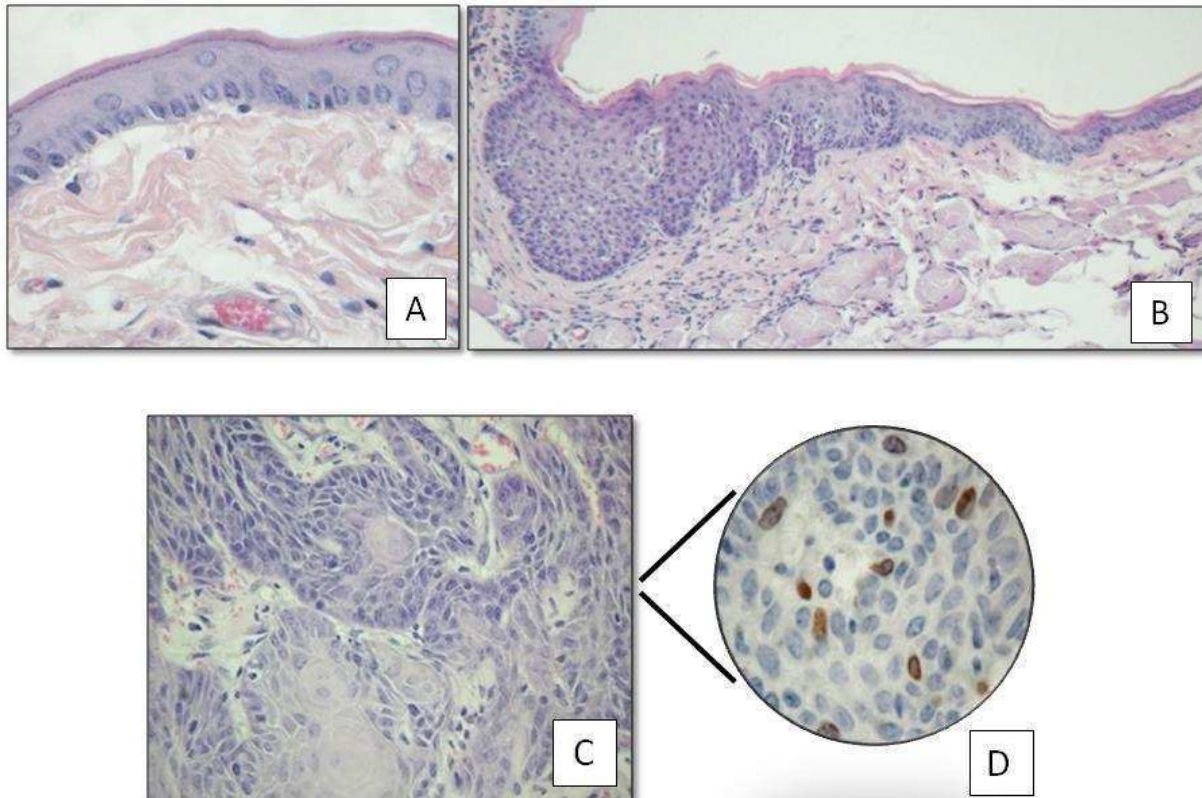
Tabla 16. Promedio de núcleos marcados con BrdU por campo en epitelio normal (no cancerizado) y en cada una de las categorías histológicas del tejido con PMD para el protocolo de carcinogénesis de 6 semanas a T0 y 8 meses post-T0, y para el protocolo de carcinogénesis de 12 semanas a T0. Los valores se expresan como media±desvío estándar. “n” indica el número total de campos medidos por protocolo. NUMF: No Unusual Microscopic Features.

Protocolos de carcinogénesis	T0			8 meses post-T0		
	NUMF	hiperplasia	displasia	NUMF	hiperplasia	displasia
<i>Epitelio normal (no cancerizado): 0,8±1,2 (n=758)</i>						
6 semanas	0,7±1,2 (n=226)	1,6±2,1 (n=186)	5,2±7,6 (n=6)	1,7±1,7 (n=248)	3,7±3,2 (n=205)	10,6±4,6 (n=8)
12 semanas	4,0±3,6 (n=618)	9,2±6,9 (n=286)	18,0±9,5 (n=79)	-	-	-

En cuanto al *promedio de núcleos marcados por campo asociados a las categorías histológicas*, para cada protocolo de cancerización, este valor aumentó significativamente cuanto mayor era la agresividad histológica de la lesión, es decir: NUMF<hiperplasia<displasia ($p<0,0001$).

Por último, se calculó el *índice de proliferación (PI)* en tejido tumoral, para ambos protocolos. Este índice resultó significativamente mayor ($p=0,0001$) a T0 para el protocolo de 12 semanas ($18,0\pm 5,8\%$, n=18 tumores) que a los 8 meses post-T0 para el protocolo de 6 semanas ($6,0\pm 4,1\%$, n=6 tumores). En la Ilustración 26D se muestra un ejemplo representativo de un área tumoral correspondiente al protocolo de carcinogénesis de 6 semanas que exhibe núcleos marcados con BrdU.

Ilustración 26. Ejemplos representativos de las alteraciones epiteliales correspondientes al protocolo de carcinogénesis de 6 semanas: **(A)** Epitelio normal en una bolsa no cancerizada (Hematoxilina y Eosina -H&E-, magnificación final: 260X); **(B)** Transición entre epitelio NUMF, hiperplásico y displásico en una bolsa cancerizada (H&E, magnificación final: 120X); **(C)** Área de tumor que exhibe cordones tumorales con diferenciación córnea y atipía (H&E, magnificación final: 210X); **(D)** Marcado inmunohistoquímico de BrdU en un área tumoral. Marrón: núcleos BrdU positivos [células en fase S (síntesis de ADN)], que contrastan contra los núcleos negativos para la marcación de BrdU (magnificación final: 500X).



Conclusión parcial

Dados los resultados descritos podemos concluir que el protocolo de 6 semanas permite un seguimiento a *largo* plazo (8 meses post-T0), asegurando un desarrollo tumoral en el 93% de los animales a los 8 meses y presenta las mismas categorías histológicas observadas en el tejido con cancerización clásica (12 semanas). Este protocolo menos agresivo que el protocolo de cancerización clásica está asociado con una disminución en la síntesis de ADN y proliferación celular en los tumores desarrollados.

II. Estudios de biodistribución y BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *única* aplicación de BNCT, utilizando una dosis total absorbida de 4 Gy a tejido con PMD.

Breve resumen

Una vez desarrollado el modelo de cancerización de campo para estudios a *largo* plazo, se pretendió estudiar el efecto inhibitorio a *largo* plazo de los mismos protocolos de BNCT que demostraron ser terapéuticamente efectivos en controlar los tumores inducidos por el protocolo clásico de cancerización (Kreimann et al., 2001, Trivillin et al., 2004, 2006; Pozzi et al., 2009). El objetivo con relevancia clínica de este estudio fue encontrar un protocolo de BNCT que resultara terapéutico para el tumor (demostrado en estudios previos), no radiotóxico para el tejido normal expuesto al haz de neutrones, y que inhibiera el desarrollo de segundos tumores primarios y/o recidivas en tejido con PMD, sin exceder su radiotolerancia.

Estudios de biodistribución

La Tabla 17 presenta los valores absolutos de contenido de boro en sangre, tejido con PMD y tejido normal y las *relaciones tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* para cada uno de los protocolos de administración de los compuestos borados. Para todos los casos, el valor de captación absoluta de boro en tejido con PMD se encontró en el rango de los valores aproximados que se consideran clásicamente útiles para control tumoral en el modelo clásico de carcinogénesis (aproximadamente 20 ppm). Consideramos este valor como terapéuticamente útil dado que, a priori, no conocíamos el rango de valores absolutos de concentración de boro que podrían resultar efectivos para inhibir el desarrollo tumoral en tejido con PMD, sin exceder su radiotolerancia.

La relación de contenido de boro entre el *tejido con PMD/tejido normal*, para todos los protocolos, reveló que no existe una acumulación preferencial en tejido con PMD (para los tres protocolos resultó **0,9/1**). Sin embargo, observamos una acumulación selectiva del tejido con PMD versus sangre (Tabla 17).

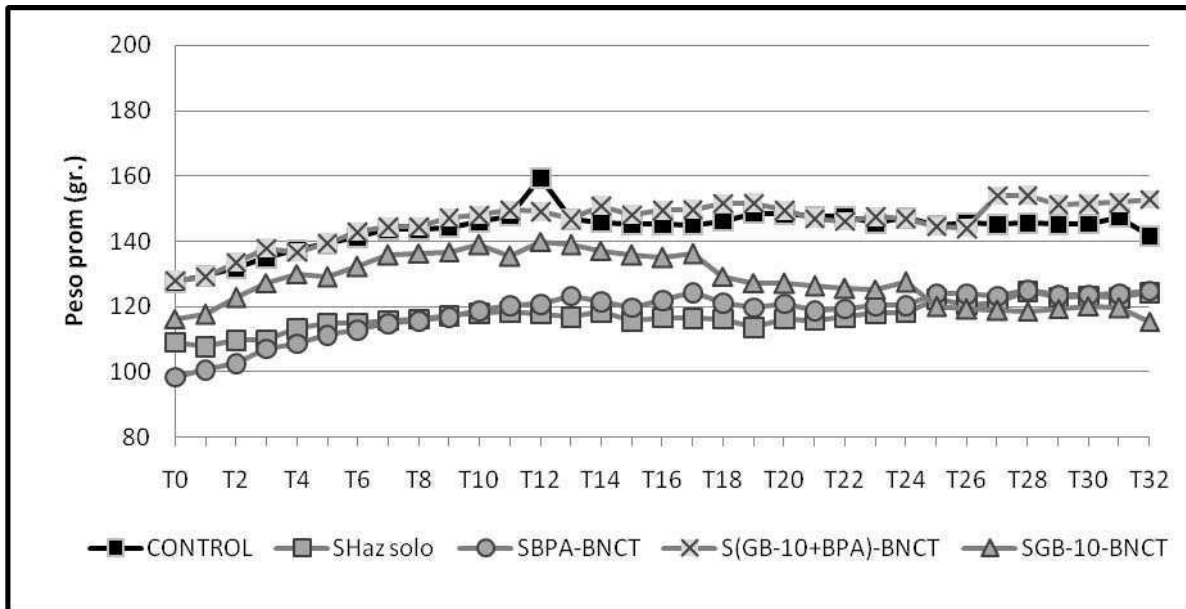
Tabla 17. Concentración absoluta de boro (media±desvío estándar) (ppm) en tejido con PMD, tejido normal y sangre empleados para los cálculos de dosis para cada protocolo. Las relaciones *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* resultan de la división de las medias de cada tejido reportadas en esta tabla. “n” indica número de muestras.

Tejido/Protocolo	GB-10 50 mg ¹⁰ B/kg	BPA 15,5 mg ¹⁰ B/kg	GB-10+BPA GB-10: 34,5 mg ¹⁰ B/kg+ BPA: 31 mg ¹⁰ B/kg
Tejido con PMD	24,4±9,7 (n=23)	19,7±9,4 (n=23)	45±15 (n=24)
Tejido normal	28±18 (n=6)	22±11 (n=6)	50±20 (n=6)
Sangre	18,1±7,3 (n=6)	4,8±2,4 (n=6)	24±11 (n=8)
Tejido con PMD/tejido normal	0,9/1,0	0,9/1,0	0,9/1,0
Tejido con PMD/sangre	1,4/1,0	4,1/1,0	1,9/1,0

Estado general de los animales

En cuanto al patrón de aumento de peso corporal, todos los grupos cancerizados irradiados exhibieron una tendencia similar a la del grupo control (animales cancerizados sham-irradiados) (Ilustración 27; ANEXO 2-Tabla 44 y Tabla 45). Al final del período de seguimiento, el promedio de ganancia de peso aproximado para todos los grupos osciló entre 13 y 20%. Las pequeñas fluctuaciones en peso corporal podrían deberse asimismo a la necesidad de anestesiarse al animal periódicamente para la evaluación macroscópica de la bolsa de la mejilla. A su vez, los animales irradiados no presentaron signos clínicos de radiotoxicidad tales como síndrome gastrointestinal, diarrea, alteraciones neurológicas como falta de coordinación, alteraciones en el comportamiento, alopecia, entre otras.

Ilustración 27. Peso promedio (gr) para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos de tratamiento: SHaz solo; SBPA-BNCT; S(GB-10+BPA)-BNCT; SGB-10-BNCT. En el gráfico no se incluyen los desvíos estándar para facilitar la visualización. La tabla con las medias y desvíos estándar para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2-Tabla 44.



Análisis de radiotoxicidad

Todos los animales que fueron irradiados no presentaban mucositis al momento de la irradiación. En algunos casos, el tejido con PMD tratado con los protocolos de BNCT exhibió una mucositis temprana, leve y reversible que resolvió para la tercera semana post-tratamiento. Este efecto fue mayor y más frecuente en el grupo SBPA-BNCT pero en todos los casos fue reversible. Las bolsas normales tratadas con los protocolos experimentales fueron indistinguibles de las bolsas normales no tratadas, tanto macroscópicamente como microscópicamente, hasta el último punto evaluado.

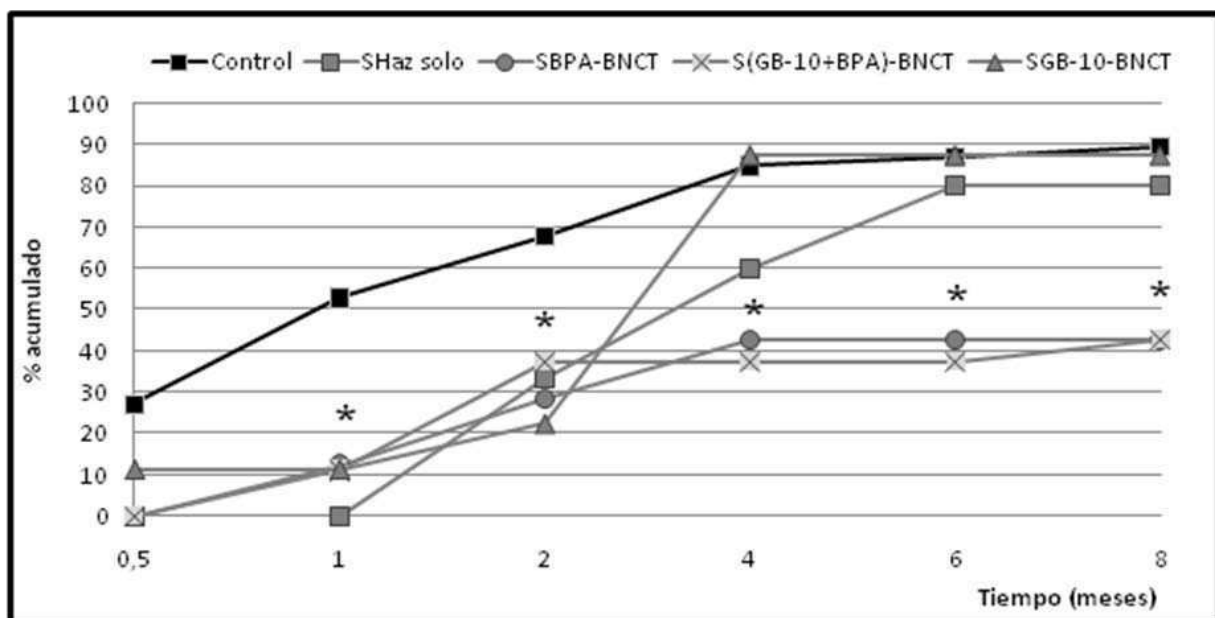
Cabe destacar que, cuando realizamos este experimento, todavía no habíamos desarrollado la escala de 5 grados de mucositis detallada en la sección Materiales y Métodos, ítem III. Es por esto que no se detallan los grados que pudieran haber sufrido estos animales y se hace una descripción subjetiva. Se consideró poco confiable clasificar la mucositis retrospectivamente usando la nueva escala en base a las fotos tomadas.

Cinética del desarrollo tumoral

La Ilustración 28 (ANEXO 2-Tabla 46) muestra el *porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos* en tejido con PMD a diferentes tiempos post T0 (0,5, 1, 2, 4, 6 y 8 meses) para el control (cancerizados, sham-irradiados) y cada uno de los protocolos de tratamiento. El desarrollo de tumores “nuevos” (haciendo un paralelo con la nomenclatura usada para los grupos tratados) en tejido con PMD en los controles representa la cinética espontánea del desarrollo tumoral en el modelo de tejido con PMD. Los

protocolos SHaz solo, SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT ejercieron una inhibición del 100% en el desarrollo tumoral versus el grupo control durante una mes para el protocolo SHaz solo y durante dos semanas para los protocolos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT. A 1 mes post-tratamiento, los protocolos SHaz solo, S(GB-10+BPA)-BNCT, SGB-10-BNCT exhibieron valores significativamente menores que los controles ($p=0,0124$; $p=0,0309$; $p=0,0309$, respectivamente). Respecto al grupo SBPA-BNCT la diferencia no resultó significativa, aunque con un $p=0,0590$, cercano al límite de significancia ($p\leq 0,05$). A los 2 meses, los protocolos de tratamiento que exhibieron diferencias significativas versus el grupo control fueron SBPA-BNCT ($p=0,0494$) y SGB-10-BNCT ($p=0,0107$). A 4, 6 y 8 meses post-tratamiento, los valores fueron similares entre los grupos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT, y significativos frente al grupo control: SBPA-BNCT (respectivamente a los tiempos 4, 6 y 8 meses: $p=0,0204$; $0,0072$; $0,0072$) y S(GB-10+BPA)-BNCT (respectivamente a los tiempos 4, 6 y 8 meses: $p=0,0062$; $0,0017$; $0,0072$). En estos tiempos, los grupos SGB-10-BNCT y SHaz solo ya no diferían del control.

Ilustración 28. Porcentaje (%) acumulado de animales que exhibieron desarrollo tumoral en tejido con PMD para el grupo control y cada uno de los protocolos de tratamientos (SBNCT, 4 Gy, RA-6). Se grafican los valores correspondientes a algunos tiempos representativos. Las líneas llenas corresponden a una interpolación lineal. La tabla con todos los valores de porcentajes acumulados para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2-Tabla 46. Un asterisco indica significancia estadística versus el grupo control. Nivel de significancia $p\leq 0,05$.



Basados en estos datos, calculamos el *porcentaje de efecto inhibitorio* de los diferentes protocolos de tratamiento en el desarrollo de tumores nuevos en tejido con PMD a los mismos tiempos representativos, referidos al desarrollo tumoral en el grupo control (Tabla 18). Los tres protocolos de SBNCT indujeron un efecto inhibitorio en el desarrollo

tumoral en tejido con PMD, alcanzando un máximo de 77-100% de inhibición. El efecto inhibitorio de SHaz solo se perdió luego de los 2 meses, similarmente a lo observado para el protocolo SGB-10-BNCT. El efecto inhibitorio del SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT persistió en 51% hasta el último punto evaluado (T32: 8 meses post T0).

Tabla 18. Porcentaje de efecto inhibitorio de los diferentes protocolos experimentales en el desarrollo de tumores nuevos en tejido con PMD a tiempos representativos, referidos al desarrollo tumoral en el grupo control (cancerizado, sham-irradiado).

Tiempo post-tratamiento (meses)	SHaz solo (%)	SGB-10-BNCT (%)	SBPA-BNCT (%)	S(GB-10+BPA)-BNCT (%)
0,5	100	26	100	100
1	100	77	73	77
2	46	64	52	38
4	27	0	48	54
6	2	0	48	54
8	9	0	51	51

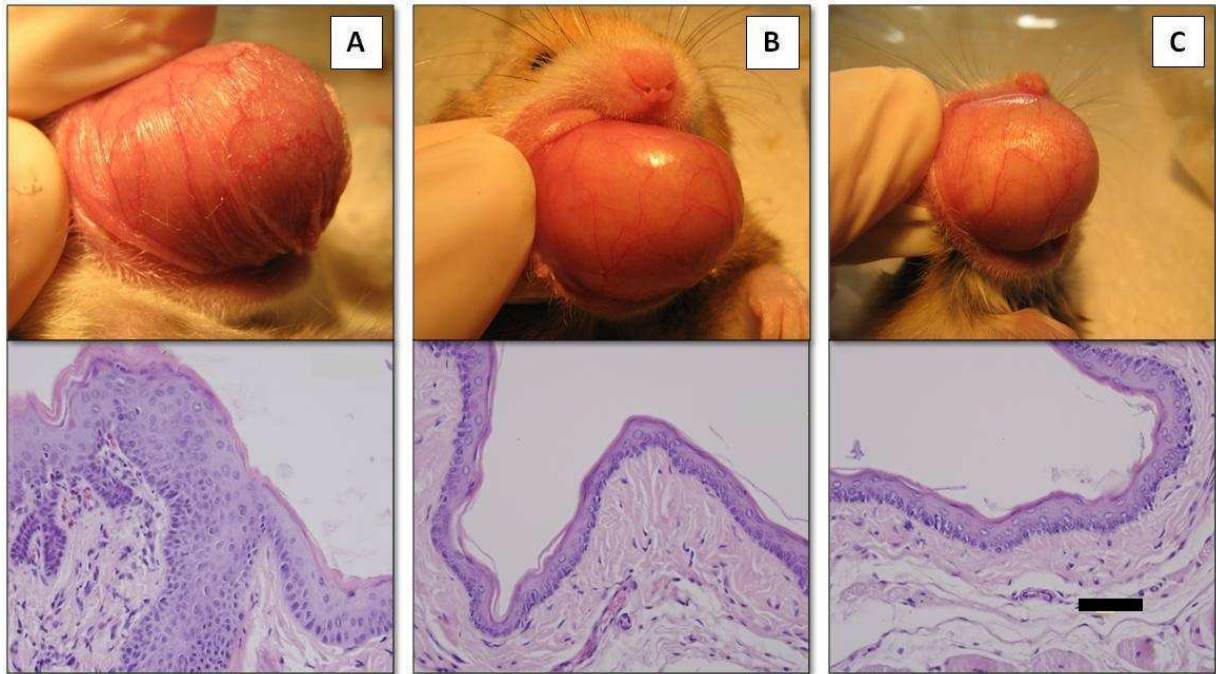
Los valores de T50 (tiempo después de T0 al cual 50% de los hámsters exhibieron desarrollo de tumores nuevos en tejido con PMD) correspondió a: Control: **4 semanas**; SHaz solo: **11 semanas**; SBPA-BNCT: **no alcanzado** en el período de seguimiento de 32 semanas; S(GB-10+BPA)-BNCT: **11 semanas**; SGB-10-BNCT: **10 semanas** (Tabla 19). En cuanto al T80 (tiempo después de T0 al cual 80% de los hámsters exhibieron desarrollo de tumores nuevos en tejido con PMD), respalda el efecto inhibitorio observado para los protocolos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT, dado que **no alcanzaron** este valor en los 8 meses de seguimiento (a diferencia del resto de los protocolos estudiados) (Tabla 19).

Tabla 19. T50 y T80: tiempo al cual, respectivamente, el 50% y 80% de los animales desarrollaron tumores nuevos post T0.

SBNCT (4 Gy) - RA-6	T50	T80
Control	4 semanas	13 semanas
SHaz solo	11 semanas	20 semanas
SBPA-BNCT	no alcanza	no alcanza
S(GB-10+BPA)-BNCT	11 semanas	no alcanza
SGB-10-BNCT	10 semanas	15 semanas

Por último, a los 8 meses post-tratamiento, las bolsas cancerizadas y tratadas con SBPA-BNCT ó S(GB-10+BPA)-BNCT que no desarrollaron tumores tenían la apariencia macroscópica e histológica de una bolsa normal (no cancerizada) en lugar de la apariencia de una bolsa cancerizada, sham-irradiada (Ilustración 29). Esto demostraría la capacidad del BNCT de revertir las características macroscópicas e histológicas del tejido con PMD.

Ilustración 29. (A) Bolsa control (cancerizada, sham-irradiada); **(B)** Bolsa cancerizada 8 meses post SBPA-BNCT; **(C)** Bolsa normal (no cancerizada, no tratada). Debajo, en cada caso, se muestra la correspondiente imagen microscópica característica (H&E, magnificación final: 130X). Barra negra: 70 μ m.



Conclusión parcial

A pesar que no existió una acumulación preferencial de boro en tejido con PMD versus el tejido normal, se observó claramente un efecto terapéutico promisorio con efectos radiotóxicos leves-moderados y reversibles en tejido con PMD con el protocolo SBNCT, 4 Gy dosis total absorbida en tejido con PMD, en el reactor RA-6. En particular, este efecto se mantuvo hasta los 8 meses post-irradiación para los protocolos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT. Los grupos SHaz solo y SGB-10-BNCT solamente ejercieron un efecto inhibitorio transiente, temprano.

III. Estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT desfasada en el tiempo, con un intervalo de 6 semanas entre irradiaciones, 4 Gy dosis absorbida a tejido con PMD en cada irradiación.

Breve resumen

Con el propósito de mejorar la eficacia terapéutica de BNCT descrita en los resultados del ítem II (SBNCT, 4 Gy, RA-6), se continuó estudiando el efecto inhibitorio y la radiotoxicidad de una *doble* aplicación de BNCT, desfasada en el tiempo por 6 semanas, de aquellos protocolos que resultaron terapéuticamente efectivos a *largo* plazo: BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT. La *doble* aplicación de BNCT desfasada en el tiempo se propone para mejorar el “targeting” de distintas poblaciones potencialmente malignas/malignas que podrían ser refractarias o parcialmente refractarias al tratamiento en el momento de la aplicación de BNCT y dar origen al desarrollo y crecimiento tumoral. Además, la aplicación *doble* de estos protocolos de BNCT resulta potencialmente útil para el tratamiento de tumores, en particular los de gran tamaño, pero podría estar contraindicada debido a la potencial radiotoxicidad generada por esta *doble* aplicación en los tejidos limitantes de dosis expuestos. En este marco, la relevancia clínica del estudio del tejido con PMD radica en explorar la capacidad inhibitoria de BNCT sobre el desarrollo tumoral y los potenciales efectos radiotóxicos.

Estudios de biodistribución

Los valores de boro empleados para los cálculos de dosis fueron los descritos en el ítem II de esta misma sección. Se repiten a continuación en la Tabla 20.

Tabla 20. Concentración absoluta de boro (media±desvío estándar) (ppm) en tejido con PMD, tejido normal y sangre empleados para los cálculos de dosis para cada protocolo. Las relaciones *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* resultan de la división de las medias de cada tejido reportadas en la tabla. “n” indica número de muestras.

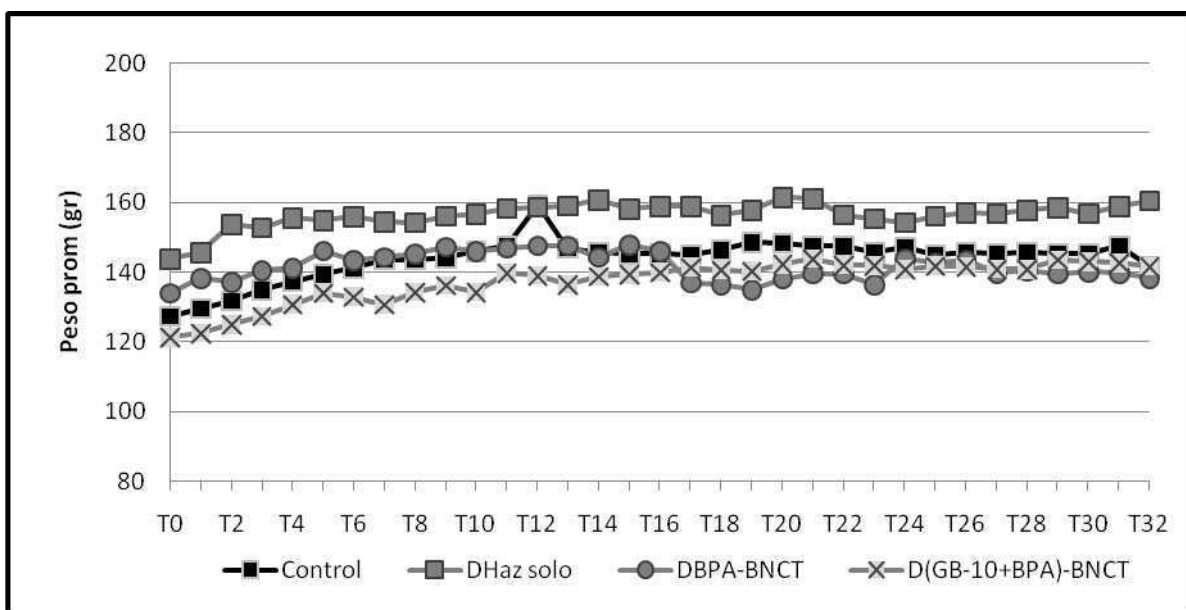
Tejido/Protocolo	BPA 15,5 mg ¹⁰ B/kg	GB-10+BPA GB-10: 34,5 mg ¹⁰ B/kg + BPA: 31 mg ¹⁰ B/kg
Tejido con PMD	19,7±9,4 (n=23)	45±15 (n=24)
Tejido normal	22±11 (n=6)	50±20 (n=6)
Sangre	4,8±2,4 (n=6)	24±11 (n=8)
Tejido con PMD/tejido normal	0,9/1,0	0,9/1,0
Tejido con PMD/sangre	4,1/1,0	1,9/1,0

Estado general de los animales

En cuanto al patrón de aumento de peso corporal, todos los grupos de animales cancerizados, tratados con cada protocolo de BNCT, exhibieron una tendencia similar a la del grupo control (animales cancerizados, sham-irradiados) (Ilustración 30; ANEXO 2-Tabla 47 y Tabla 48). Al final del período de seguimiento el promedio de ganancia de peso aproximado para todos los grupos osciló entre 6 y 16%. Las pequeñas fluctuaciones en peso corporal podrían deberse asimismo a la necesidad de anestesiarse al animal periódicamente para la evaluación macroscópica de la bolsa de la mejilla.

Todos los animales normales irradiados con los protocolos de DBNCT presentaron signos clínicos normales. Para el caso de los protocolos DBNCT, exhibieron una tendencia de aumento de peso similar a la del grupo normal tratado con DHaz solo (ANEXO 2-Tabla 49). Al comparar los animales normales tratados DBNCT respecto al grupo normal sin irradiar, se observa que el porcentaje de ganancia de peso hasta T8 (tiempo al cual se observó la resolución completa de la mucositis en animales cancerizados tratados), resultó mayor para el grupo normal sin irradiar (37% versus 15%, respectivamente). Consideramos que esta diferencia se debe a que los animales irradiados son anestesiados semanalmente para su revisión, lo cual alteraría la alimentación e hidratación del animal.

Ilustración 30. Peso promedio (gr) para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos de tratamiento empleando una *doble* aplicación de BNCT con un intervalo de 6 semanas entre irradiaciones, 4 Gy a tejido con PMD en cada irradiación: DHaz solo; DBPA-BNCT; D(GB-10+BPA)-BNCT. En el gráfico no se incluyen los desvíos estándar para facilitar la visualización. La tabla con las medias y desvíos estándar para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en la ANEXO 2-Tabla 47.



Ninguno de los grupos irradiados, cancerizados y normales, exhibieron signos clínicos de radiotoxicidad (síndrome gastrointestinal, diarrea, alteraciones neurológicas tales como

falta de coordinación, alteraciones en el comportamiento, alopecia, etc) a lo largo de todo el período de seguimiento.

Análisis de radiotoxicidad

Todos los animales que fueron irradiados presentaban, al momento de la primera irradiación (DBNCT), mucositis grado 0. El tejido con PMD tratado con el protocolo DHaz solo y D(GB-10+BPA)-BNCT, post cada irradiación, exhibió solo mucositis grado 1 a diferencia del grupo DBPA-BNCT, que presentó animales que alcanzaron mucositis grado 2 (*ver más abajo los resultados correspondientes al análisis microscópico de la mucositis*). La severidad de la mucositis luego de la segunda irradiación no fue exacerbada por la primera irradiación. Para los tres protocolos, al momento de la segunda irradiación, la mucositis había resuelto por completo. (ANEXO 2-Tabla 50)

En tejido normal tratado con los protocolos D(GB-10+BPA)-BNCT y DBPA-BNCT, se observó un máximo de grado 1, post 2ª irradiación. Todos los animales normales tratados con DHaz solo presentaron grado 0 para todos los tiempos evaluados. (ANEXO 2-Tabla 51)

En cuanto al grupo control (cancerizado, sham-irradiado), todos los animales exhibieron mucositis grado 0 salvo un único animal que exhibió mucositis grado 1 en T6. Se asignó mucositis grado 1 aún en el caso de eritema leve. Este grado de mucositis fue previamente observado asociado a carcinogénesis inducido por DMBA en la bolsa de la mejilla del hámster (Yang et al., 2009) y a ocasionales traumas menores causados por pellets de comida.

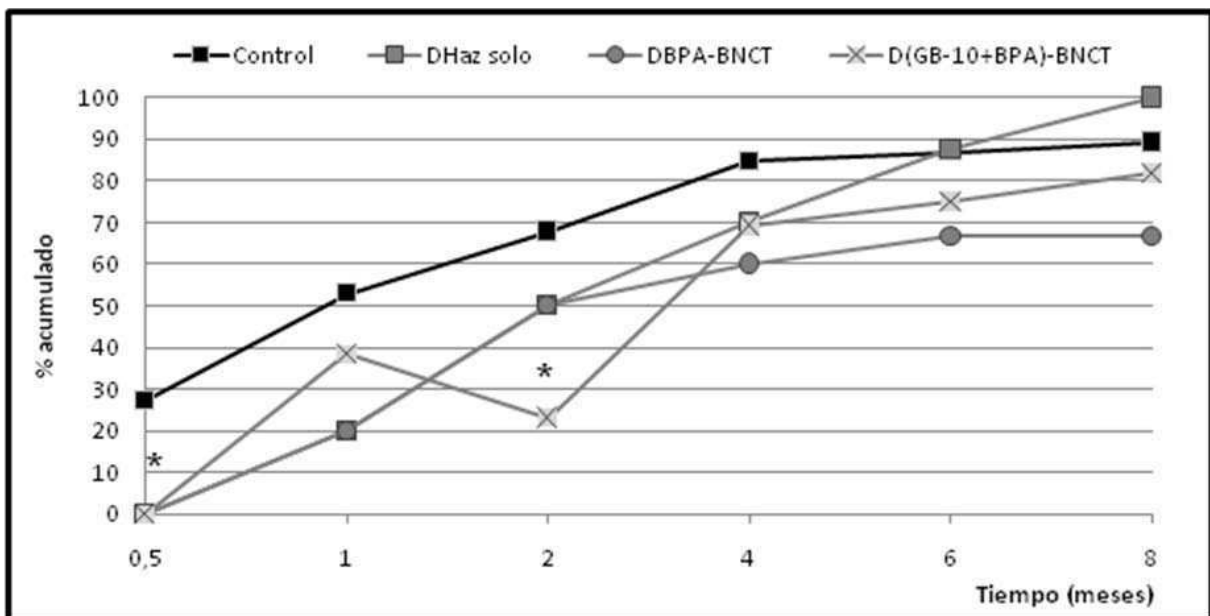
En cuanto al análisis microscópico de la mucositis, observamos que las descripciones macroscópicas correlacionan con los hallazgos microscópicos. En cuanto al grado 2, a nivel de microscopía óptica, se detectaron microúlceras y sectores con epitelio muy atrófico. Se observó un infiltrado agudo (presencia de polimorfonucleares) en la superficie de las áreas ulceradas. En el resto de la bolsa, se observó un infiltrado crónico (linfoplasmocitario). En cuanto al grado 1, en consonancia con lo que se describe a nivel macroscópico, solo se observaron vasos muy congestivos sin epitelio ulcerado, con infiltrado inflamatorio escaso y crónico. Para el grado 0, no se detectó vasodilatación ni lesiones a nivel epitelial. La diferencia general entre los animales control (cancerizados, sham-irradiados) con mucositis grado 0 y los cancerizados tratados con grado 0, fue la presencia de un infiltrado inflamatorio crónico leve en los expuestos a irradiación.

Cinética del desarrollo tumoral

Hasta las 2 semanas post-T0, se observó una inhibición temprana del 100% para todos los protocolos evaluados. Luego, se observó una tendencia a la inhibición en el desarrollo tumoral por parte de los grupos DHaz solo, DBPA-BNCT y D(GB-10+BPA)-BNCT, que persistió hasta 4 meses, 8 meses y 4 meses post T0, respectivamente. El efecto inhibitorio no alcanzó significancia estadística para el grupo DHaz solo. Solo al mes post primera irradiación resultó un “p” algo más cercano a 0,05 ($p=0,0913$). Para el grupo DBPA-

BNCT, las diferencias en porcentaje acumulado versus el grupo control no alcanzaron significancia estadística pero en los tiempos 1 mes, 4 meses, 6 y 8 meses los “p” obtenidos resultaron cercanos a 0,05 ($p=0,0913$; $0,0753$; $0,0889$; $0,0889$, respectivamente). En cuanto al grupo $D(GB-10+BPA)-BNCT$, las diferencias resultaron significativas en los tiempos 0,5 meses ($p=0,0346$) y 2 meses ($p=0,0040$). (Ilustración 31; ANEXO 2-Tabla 52).

Ilustración 31. Porcentaje (✓) acumulado de animales que exhibieron desarrollo tumoral en tejido con PMD para cada uno de los protocolos de tratamiento y el grupo control. Se grafican los valores correspondientes a algunos tiempos representativos. Las líneas llenas corresponden a una interpolación lineal. La tabla con todos los valores de porcentajes acumulados para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2-Tabla 52. Un asterisco indica significancia estadística versus el grupo control. Nivel de significancia $p \leq 0,05$.



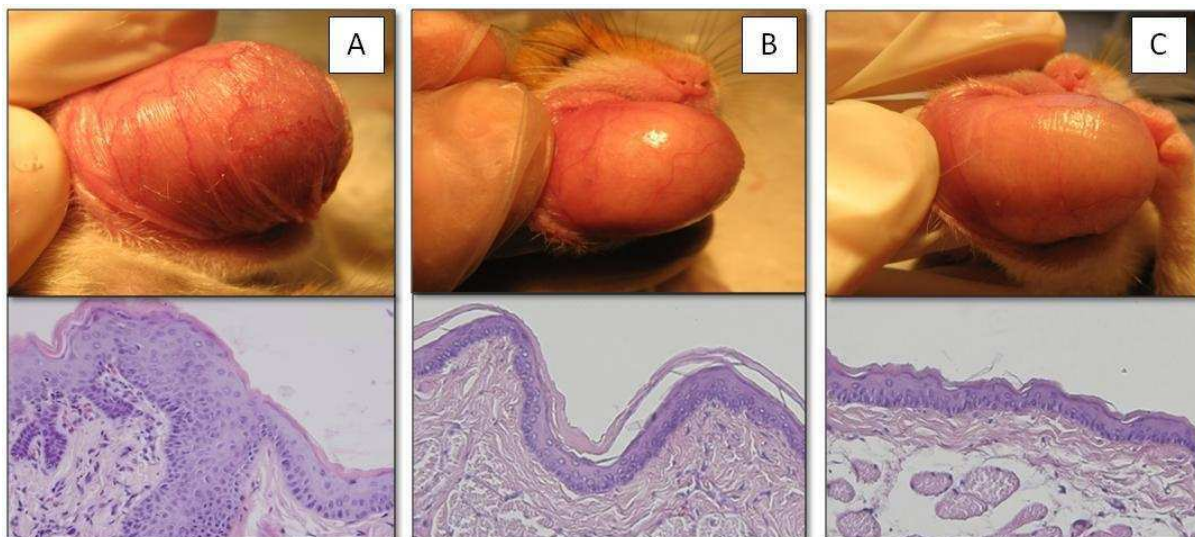
Los valores de $T50$ y $T80$ (tiempo después de $T0$ al cual 50% y 80% de los animales respectivamente exhibieron desarrollo de tumores nuevos en tejido con PMD) también evidenciaron el efecto inhibitorio del tratamiento (Tabla 21). $T50$ fue **4 semanas** para el grupo control; **8 semanas** para los grupos $DHaz$ solo y $DBPA-BNCT$ y **15 semanas** para el grupo $D(GB-10 + BPA)-BNCT$. En cuanto al $T80$, fue de **13 semanas** para el control, **20 semanas** para el grupo $DHaz$ solo y **18 semanas** para $D(GB-10 + BPA)-BNCT$. En cambio, para el grupo $DBPA-BNCT$, **no se alcanzó el valor de 80%** de animales con desarrollo tumoral durante el período de seguimiento de 8 meses.

Tabla 21. T50 y T80: tiempo al cual, respectivamente, el 50/ y 80/ de los animales desarrollaron tumores nuevos post T0.

<i>DBNCT</i> (4 Gy, 6 sem) - RA-3	T50	T80
Control	4 semanas	13 semanas
DHaz solo	8 semanas	20 semanas
DBPA-BNCT	8 semanas	no alcanza
D(GB-10+BPA)-BNCT	15 semanas	18 semanas

Las bolsas cancerizadas de los animales en los grupos *D(GB-10+BPA)-BNCT* y *DBPA-BNCT* que no desarrollaron tumores durante los 8 meses de seguimiento fueron macroscópicamente e histológicamente similares a las bolsas que nunca fueron cancerizadas (normales) y difieren de las bolsas de los animales control (cancerizados, sham-irradiados) a los 8 meses post sham-irradiación (Ilustración 32). Nuevamente, esto demostraría la capacidad del BNCT de revertir las características macroscópicas e histológicas del tejido con PMD.

Ilustración 32. (A) Bolsa cancerizada, 8 meses post sham-irradiación (imagen tomada de la Ilustración 29); (B) Bolsa cancerizada tratada con *DBPA-BNCT* 8 meses post-irradiación; (C) Bolsa normal (no cancerizada, no irradiada). Debajo de cada foto, en cada caso, se muestra la correspondiente imagen de microscopía óptica (H&E, magnificación final: 130X).



Síntesis de ADN

La Tabla 22 muestra la síntesis de ADN expresada en términos del promedio de núcleos marcados con BrdU por campo. Una reducción estadísticamente significativa en los valores síntesis de ADN fue observada para los grupos tratados con *DBNCT* versus el control para las categorías histológicas NUMF (para ambos protocolos el valor “p” resultó menor a 0,0001) e hiperplasia (*DBPA-BNCT*: $p=0,0085$; *D(GB-10+BPA)-BNCT*: $p= 0,0005$). En cuanto a las displasias, resultaron prácticamente ausentes en los grupos tratados con *DBNCT*. Al

agrupar los valores (sin distinción de categoría histológica), el promedio de número de núcleos BrdU positivos/campo fue de $0,6\pm 1,1$ para DBPA-BNCT y $1,0\pm 1,6$ para D(GB-10+BPA)-BNCT. Estos valores resultaron significativamente menores al valor correspondiente al grupo control ($p < 0,0001$).

Tabla 22. Promedio de núcleos marcados con BrdU/campo para cada uno de los grupos a los 8 meses post-T0 de seguimiento. “n” indica número total de campos medidos por protocolo.
^a: no todas las bolsas exhibieron áreas correspondientes a todas las categorías histológicas.

	Núcleos marcados con BrdU/campo para cada categoría histológica			Núcleos marcados con BrdU/campo (sin distinción de categoría histológica)
	NUMF	hiperplasia	Displasia	
Control	1,7±1,7 (n=247)	3,7±3,2 (n=204)	10,6±4,6 (n=8)	2,8±2,9 (n=459)
DBPA-BNCT	0,46±0,95 (n=180)	1,7±1,9 (n=19)	^a (n=0)	0,6±1,1 (n=119)
D(GB-10+BPA)-BNCT	0,67±0,91 (n=212)	2,1±2,5 (n=66)	0 (n=1)	1,0±1,6 (n=279)

Conclusión parcial

La *doble* aplicación de los protocolos de BNCT que fueron terapéuticamente útiles como *única* aplicación en la inhibición de tumores nuevos a partir de tejido con PMD (esta sección, ítem II), no excedió la radiotolerancia del tejido con PMD (tejido dosis limitante) o de los tejidos normales; la mucositis en tejido con PMD post segunda irradiación no se vio exacerbada por la primera irradiación; indujo una reducción en la síntesis de ADN en tejido con PMD a los 8 meses post-tratamiento; e inhibió parcialmente el desarrollo de tumores nuevos en tejido con PMD.

IV. Estudios de biodistribución y BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT con un intervalo de 2 semanas entre irradiaciones, 4 Gy a tejido con PMD en cada irradiación, versus una *única* aplicación de BNCT a la misma dosis total absorbida (8 Gy).

Breve resumen

Como se explicó en el ítem III de esta sección, el protocolo *DBNCT* con 6 semanas de intervalo entre irradiaciones, indujo una inhibición parcial en el desarrollo de tumores nuevos, sin costo adicional en términos de radiotoxicidad en tejido normal y dosis limitante. Luego, el objetivo de este ítem consistió en mejorar estos resultados probando nuevos protocolos, aumentando la dosis entregada en cada irradiación y/o variando el intervalo entre irradiaciones.

Se intentó mejorar los resultados acortando el intervalo entre irradiaciones de 6 a 2 semanas. Asimismo, se comparó el protocolo de *DBNCT* con el de *SBNCT* a la misma dosis total a tejido con PMD en términos de inhibición de desarrollo tumoral y radiotoxicidad. Se buscó analizar el efecto del fraccionamiento de la dosis total en 2 aplicaciones iguales en cuanto a efecto terapéutico y toxicidad.

Estudios de biodistribución

En la Tabla 23 se muestran los valores de concentración absoluta de boro que se emplearon para los cálculos dosimétricos para los dos protocolos, *DBNCT* y *SBNCT* para sangre, tejido con PMD y normal. La concentración de boro en tejido con PMD utilizado en el protocolo *DBNCT* fue $19,7 \pm 9,4$ ppm para *DBPA*-BNCT y 45 ± 15 ppm para *D(GB-10+BPA)*-BNCT, valores utilizados en los ítems II y III (esta sección, Tabla 17 y Tabla 20). Un nuevo grupo de estudios de biodistribución fue realizado previamente a las irradiaciones con el protocolo *SBNCT* con la intención de reconfirmar los valores para un nuevo lote de BPA. Admitiendo las conocidas variaciones del contenido de boro en tejido, ambos grupos de datos de biodistribución fueron consistentes. Sin embargo, decidimos utilizar los nuevos valores correspondientes a tejido con PMD para el cálculo de dosis en el grupo *SBNCT*: $16,0 \pm 5,6$ ppm para *SBPA*-BNCT y $34,0 \pm 8,5$ ppm para *S(GB-10+BPA)*-BNCT.

Para ambos protocolos, *DBNCT* y *SBNCT*, el valor de captación absoluta de boro en el tejido con PMD se encuentra en el rango de utilidad terapéutica (aproximadamente 20 ppm). La relación de contenido de boro entre el *tejido con PMD/tejido normal* reveló que no hay una acumulación preferencial de boro en el tejido con PMD (Tabla 23). Sin embargo, para todos los casos, se demostró una acumulación selectiva en tejido con PMD versus sangre (Tabla 23).

Tabla 23. Concentración absoluta de boro (media±desvío estándar) (ppm) en tejido con PMD, tejido normal y sangre empleados para los cálculos de dosis para cada protocolo. Las relaciones *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* resultan de la división de las medias de cada tejido reportadas en la tabla. “n” indica número de muestras.

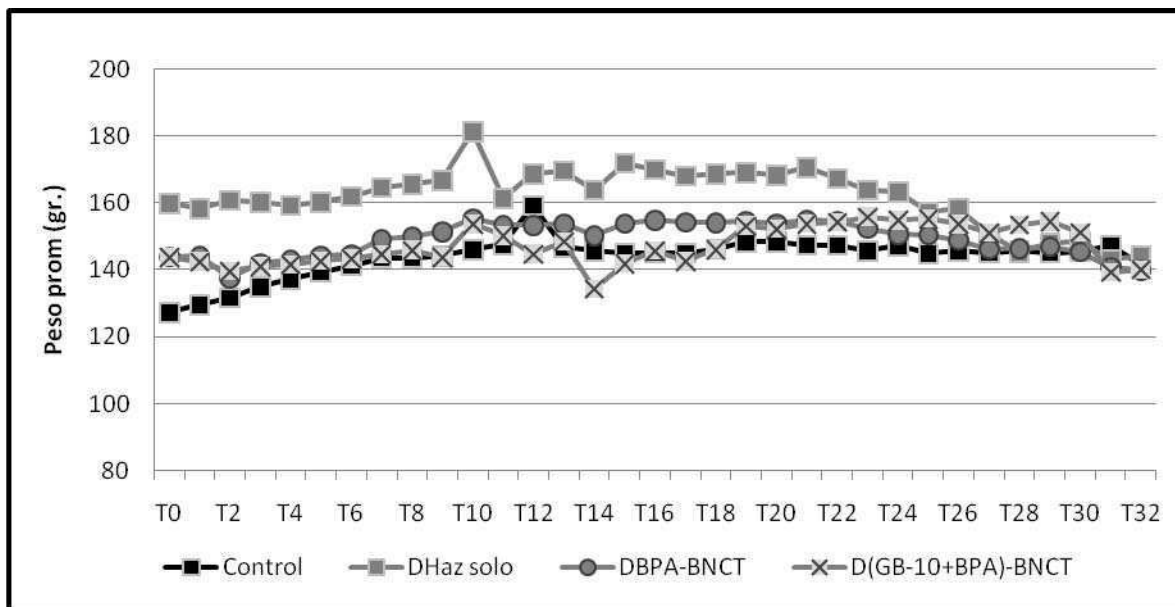
Tejido/ Protocolo	BPA 15,5 mg ¹⁰ B/kg	GB-10+BPA GB-10: 34,5 mg ¹⁰ B/kg + BPA: 31 mg ¹⁰ B/kg	BPA 15,5 mg ¹⁰ B/kg	GB-10+BPA GB-10: 34,5 mg ¹⁰ B/kg + BPA: 31 mg ¹⁰ B/kg
Tej. con PMD	19,7±9,4 (n=23)	45±15 (n=24)	16,0±5,6 (n=38)	34,0±8,5 (n=42)
Tej. normal	22±11 (n=6)	50±20 (n=6)	15,0±5,3 (n=24)	34,7±8,7 (n=24)
Sangre	4,8±2,4 (n=6)	24±11 (n=8)	5,4±1,9 (n=24)	22,2±5,6 (n=16)
Tej. con PMD /tej. normal	0,9/1,0	0,9/1,0	1,1/1,0	1,0/1,0
Tej. con PMD /sangre	4,1/1,0	1,9/1,0	2,9/1,0	1,5/1,0

Estado general de los animales

En cuanto al patrón de aumento de peso corporal en los animales cancerizados tratados con DBNCT, todos los grupos de animales cancerizados, tratados con cada protocolo de BNCT, exhibieron una tendencia similar a la del grupo control (animales cancerizados, sham-irradiados) (Ilustración 33; ANEXO 2-Tabla 53 y Tabla 54). Al final del período de seguimiento el promedio de variación de peso aproximado para todos los grupos osciló entre 4 y 13%. Las pequeñas fluctuaciones en peso corporal podrían deberse asimismo a la necesidad de anestésiar el animal periódicamente para la evaluación macroscópica de la bolsa de la mejilla.

En cuanto a los animales normales irradiados con los protocolos de DBPA-BNCT (Anexo 2-Tabla 55), los signos clínicos resultaron normales. Se observó que el porcentaje de ganancia de peso hasta T8 (tiempo al cual se observó la resolución completa de la mucositis en animales cancerizados tratados), resultó menor al normal sin irradiar (8% versus 37%, respectivamente). Consideramos que esta diferencia se debería a que los animales irradiados son anestesiados semanalmente para su revisión, produciendo trastornos en la alimentación e hidratación.

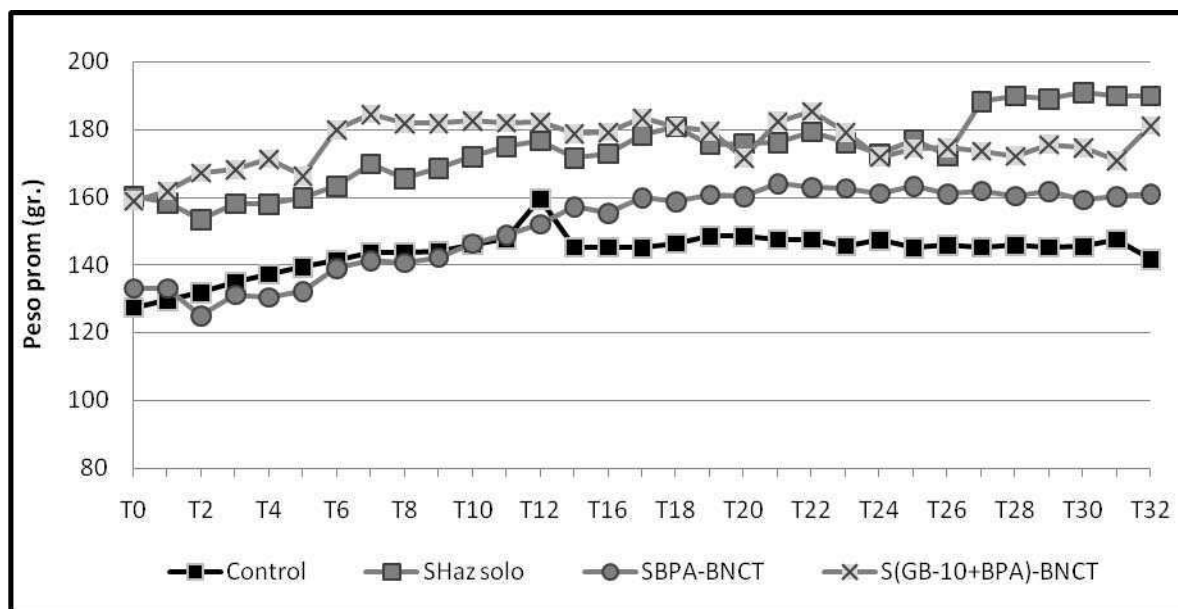
Ilustración 33. Peso promedio (gr) para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos de tratamiento empleando una *doble* aplicación de BNCT con un intervalo de 2 semanas entre irradiaciones, 4 Gy a tejido con PMD en cada irradiación: DHaz solo; DBPA-BNCT; D(GB-10+BPA)-BNCT. En el gráfico no se incluyen los desvíos estándar para facilitar la visualización. La tabla con las medias y desvíos estándar para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2- Tabla 53.



En cuanto al protocolo SBNCT, todos los grupos de animales cancerizados, tratados con cada protocolo de BNCT, exhibieron una tendencia similar a la del grupo control (animales cancerizados sham-irradiados) (Ilustración 34; ANEXO 2 - Tabla 56 y Tabla 57). Al final del período de seguimiento el promedio de aumento de peso aproximado para todos los grupos osciló entre 13 y 22%. Las pequeñas fluctuaciones en peso corporal podrían deberse asimismo a la necesidad de anestésiar el animal periódicamente para la evaluación macroscópica de la bolsa de la mejilla.

Respecto al grupo normal tratado con SBPA-BNCT (ANEXO 2-Tabla 58), se observó que el porcentaje de ganancia de peso hasta el tiempo de resolución completa de la mucositis en animales cancerizados tratados (T8: 8 semanas), resultó menor al grupo normal sin irradiar (2% versus 37%, respectivamente). Consideramos que esta diferencia podría deberse a una alteración en la alimentación e hidratación de los animales debido a que, semanalmente, se anestésian para su revisión y a la mucositis grado 5 inducida por estos protocolos de BNCT (ver más abajo). Tal como se explicó en la sección introductoria, en los humanos, la presencia de mucositis altera el gusto y genera dolor en la boca del paciente, resultando en una menor ingesta de alimentos.

Ilustración 34. Peso promedio (gr) para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos de tratamiento empleando una única aplicación de BNCT con 8 Gy dosis total absorbida a tejido con PMD: SHaz solo; SBPA-BNCT; S(GB-10+BPA)-BNCT. En el gráfico no se incluyen los desvíos estándar para facilitar la visualización. La tabla con las medias y desvíos estándar para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2- Tabla 56.

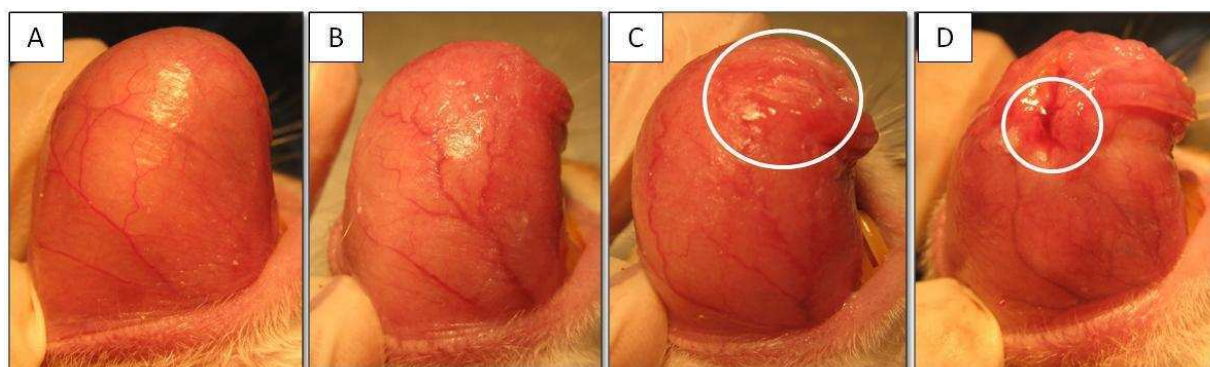


Ninguno de los grupos irradiados con ambos protocolos (DBNCT y SBNCT), cancerizados y normales, exhibieron signos clínicos de radiotoxicidad (síndrome gastrointestinal, diarrea, alteraciones neurológicas tales como falta de coordinación, alteraciones en el comportamiento, alopecia, etc) a lo largo de todo el período de seguimiento.

Análisis de radiotoxicidad

Doble aplicación, 2 semanas de intervalo (4 Gy a tejido con PMD en cada irradiación): Todos los animales que fueron irradiados presentaban, al momento de la primera irradiación, mucositis grado 0. Tal como se muestra en el ANEXO 2-Tabla 59, DHaz solo indujo hasta una mucositis grado 1. Los protocolos DBNCT, en cambio, indujeron mucositis moderada (grado 1-2) en tejido con PMD, reversible, con un pico en 7-14 días, que resolvió para la tercer semana luego de la segunda irradiación. Se observó que la mucositis luego de la segunda aplicación no fue exacerbada por la primera aplicación. No se observó mucositis grado 4 ó 5 en ninguno de los animales tratados con DBNCT. Solo un animal exhibió grado 3 luego de la primera aplicación de DBPA-BNCT. Se observó un mayor porcentaje de animales con mucositis grado 2 para el protocolo DBPA-BNCT versus D(GB-10+BPA)-BNCT (64/ versus 20/). En la Ilustración 35 se muestran ejemplos macroscópicos representativos de los diferentes grados de mucositis observados.

Ilustración 35. Ejemplos representativos de los diferentes grados de mucositis a nivel macroscópico para el protocolo *DBNCT*, 4 Gy cada irradiación, 2 semanas de intervalo entre aplicaciones: **(A)** *D(GB-10+BPA)-BNCT*, 14 días post primera irradiación, mucositis grado 0; **(B)** *DBPA-BNCT*, 7 días post segunda irradiación, mucositis grado 1; **(C)** *DBPA-BNCT*, 7 días post segunda irradiación, mucositis grado 2. Se resalta con un círculo la erosión, característica distintiva de la mucositis grado 2; **(D)** *DBPA-BNCT*, 14 días post primera irradiación, mucositis grado 3. Se muestra una bolsa que desarrolló una úlcera (círculo) post tratamiento.



En cuanto al efecto radiotóxico del protocolo *DBPA-BNCT* en tejido normal, post primera irradiación, un animal exhibió mucositis grado 2. Post segunda irradiación, se observó mucositis grado 1 en un animal. El resto de los animales exhibió mucositis grado 0. (ANEXO 2-Tabla 60)

Además del análisis macroscópico, se estudió como método complementario al análisis de radiotoxicidad la Termografía Infrarroja Dinámica. La descripción de la técnica y resultados se encuentran en el **ANEXO 1: IMAGENOLOGÍA DINÁMICA INFRARROJA: Estudios complementarios para evaluar radiotoxicidad.**

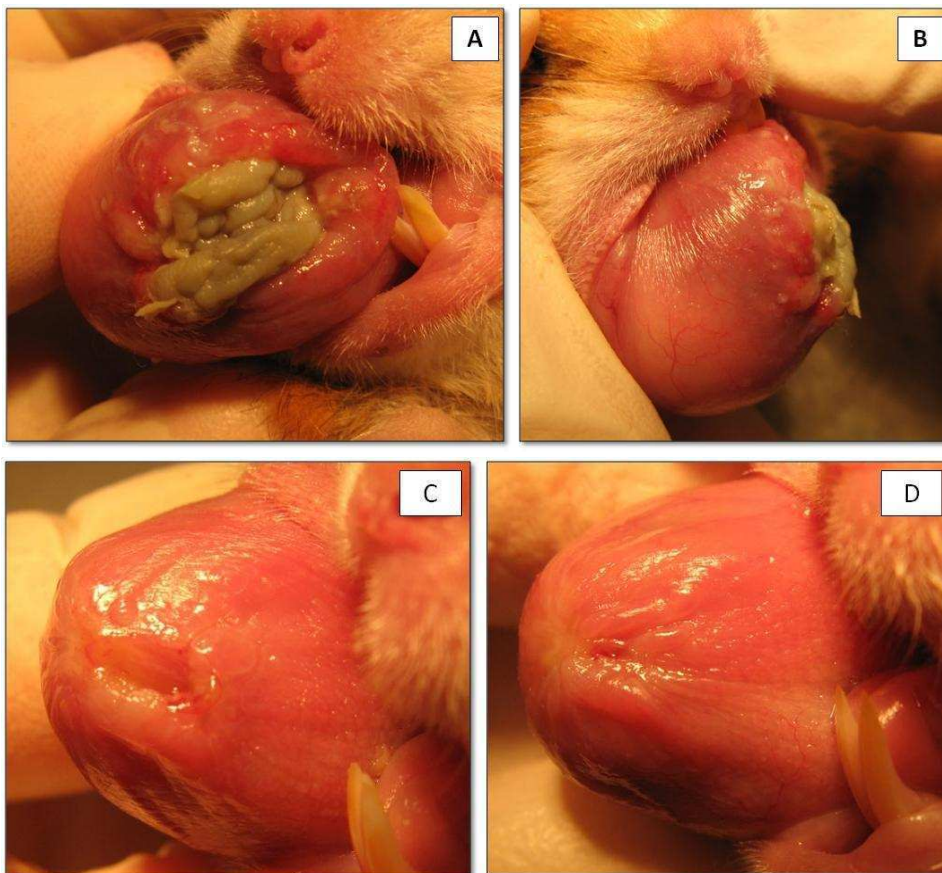
Única aplicación (8 Gy): Todos los animales que fueron irradiados presentaban, al momento de irradiación, mucositis grado 0. En el caso del protocolo *SBNCT* en animales cancerizados, los grupos *SBPA-BNCT* y *S(GB-10+BPA)-BNCT* causaron una mucositis severa (grado 5) con pérdida ostensible de tejido con PMD en el 100% de los animales tratados, que tuvo su pico aproximadamente a los 16 días y 14 días luego de la irradiación, respectivamente (ANEXO 2-Tabla 61). La resolución de la mucositis fue evaluada en la porción remanente de bolsa, expuesta a menores niveles de dosis (ver más abajo “Análisis Computacional”). La mucositis en el tejido remanente resolvió totalmente a las 4 semanas luego de *SBPA-BNCT* y *S(GB-10+BPA)-BNCT*. Se considera resolución total en el tejido remanente cuando se alcanza la total cicatrización de la mucositis grado 5 después de la pérdida de tejido y grado 0/1 en el resto de la bolsa.

La Ilustración 36 muestra un ejemplo de un animal cancerizado tratado con S(GB-10+BPA)-BNCT 8 Gy, con mucositis grado 5, 13 días post irradiación. Se observa, en la punta de la bolsa evertida, un área de necrosis con erosión en sus bordes, eritema y edema. Al momento de la irradiación, esta zona se encuentra pegada en el trampolín en el punto más lejano del blindaje y más cercano al núcleo del reactor (esta zona corresponde a la región anterior analizada mediante el “Hamster Tool” - *ver explicación más abajo*). En este punto, el flujo neutrónico resulta 20% más alto que el reportado para el medido en el punto medio del trampolín. En el resto de la bolsa solamente se observa eritema.

El protocolo SHaz solo exhibió un máximo de mucositis grado 1 a la semana post irradiación, en el 33% de los animales. (ANEXO 2- Tabla 61)

En cuanto a los efectos de estos protocolos en tejido normal, SBNCT (8 Gy) indujo una mucositis severa (grado 5) en el 100% de los animales, con pérdida ostensible de tejido normal (ANEXO 2-Tabla 62).

Ilustración 36. (A) Vista lateral interna y (B) vista lateral externa de una bolsa de un animal cancerizado tratado con S(GB-10+BPA)-BNCT 8 Gy, con mucositis grado 5, 13 días post irradiación; (C) 22 días post irradiación, vista lateral interna: se observa la cicatrización de la zona donde se perdió parte del tejido con PMD de la bolsa. La zona de bolsa remanente presenta mucositis grado 0; (D) 29 días post irradiación, vista lateral interna: cicatrización completa. La zona de bolsa remanente presenta mucositis grado 0.

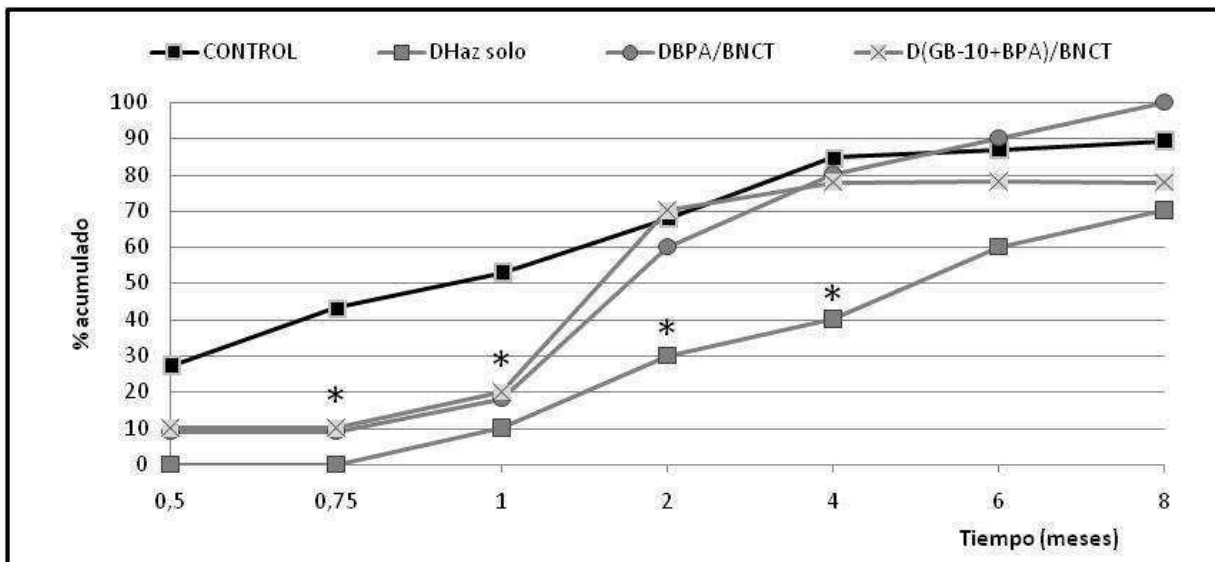


Cinética del desarrollo tumoral

Doble aplicación, 2 semanas de intervalo (4 Gy a tejido con PMD en cada irradiación): Para el *DHaz* solo, se observó una inhibición completa que persistió hasta 3 semanas post T0 (ANEXO 2-Tabla 63). *DBPA*-BNCT y *D(GB-10+BPA)*-BNCT indujeron una inhibición del 100% hasta 1 semana post T0.

La *doble* aplicación de *Haz* solo, *BPA*-BNCT y *(GB-10+BPA)*-BNCT indujeron una inhibición en el desarrollo tumoral en tejido con PMD comparado al grupo control (cancerizado, sham-irradiado) 1 mes post primera irradiación (T4). Esta inhibición resultó significativa solo para el grupo *DHaz* solo ($p=0,0160$) mientras que para los protocolos *BPA*-BNCT y *(GB-10+BPA)*-BNCT los valores de “p” fueron 0,0514 y 0,0913, respectivamente. A partir de los 2 meses, la tendencia inhibitoria de los grupos *DBPA*-BNCT y *D(GB-10+BPA)*-BNCT se perdió mientras que, para el grupo *DHaz* solo, la inhibición tumoral resultó significativa aún a los 2 y 4 meses post T0 ($p=0,0327$; $p= 0,0038$, respectivamente). Este efecto inhibitorio se perdió a los 6 y 8 meses. (Ilustración 37; ANEXO 2-Tabla 63)

Ilustración 37. Porcentaje (✓) acumulado de animales que exhibieron desarrollo tumoral en tejido con PMD para el grupo control y cada uno de los protocolos de tratamiento (*DBNCT*, 4 Gy, 2 semanas de intervalo, RA-3). Se grafican los valores correspondientes a algunos tiempos representativos. Las líneas llenas corresponden a una interpolación lineal. La tabla con todos los valores de porcentajes acumulados para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2-Tabla 63. Un asterisco indica significancia estadística versus el grupo control. Nivel de significancia $p\leq 0,05$.



En la Tabla 24, se presenta el tiempo post-T0 al cual 50% y 80% de los animales respectivamente exhibieron tumores nuevos para *DBNCT* y *DHaz* solo. Para el tratamiento *DBNCT*, ambos parámetros correspondientes a cada protocolo evidenciaron un efecto inhibitorio moderado del tratamiento en el desarrollo tumoral versus el grupo control (cancerizados, sham-irradiados). *T50* fue: **4 semanas** para el grupo control, **6 semanas** para

DBPA-BNCT y D(GB-10+BPA)-BNCT y **11 semanas** para el grupo DHaz solo. En cuanto al T80 correspondió a: **13 semanas** para el grupo control, **15 semanas** para el grupo DBPA-BNCT y **29 semanas** para el grupo DHaz solo. En el caso del grupo D(GB-10+BPA)-BNCT, **no se alcanzó** el valor de 80% de los animales con tumores nuevos en el período de seguimiento de 8 meses. En resumen, se observa un efecto inhibitorio a corto plazo del protocolo DBPA-BNCT. Para los grupos DHaz solo y D(GB-10+BPA)-BNCT, se alcanzó el valor de 50% de los animales con tumores nuevos a las **11 semanas** y **6 semanas**, respectivamente. T80 fue de **29 semanas** para el DHaz solo, pero **no se alcanzó en el período de seguimiento** para el protocolo D(GB-10+BPA)-BNCT. El hallazgo que el efecto inhibitorio de DHaz solo fuera mayor que el de DBPA-BNCT fue inesperado.

Tabla 24. T50 y T80: tiempo al cual, respectivamente, el 50% y 80% de los animales desarrollaron tumores nuevos post T0, para el protocolo DBNCT (4 Gy), 2 semanas de intervalo entre irradiaciones.

DBNCT (4 Gy, 2 sem) - RA-3	T50	T80
Control	4 semanas	13 semanas
DHaz solo	11 semanas	29 semanas
DBPA-BNCT	6 semanas	15 semanas
D(GB-10+BPA)-BNCT	6 semanas	no alcanza

Más allá que se observa un efecto inhibitorio moderado de los grupos DBPA-BNCT y D(GB-10+BPA)-BNCT respecto al grupo control, claramente se observa que el acortamiento del intervalo de 6 semanas (esta sección, ítem III) a 2 semanas no mejoró la eficacia terapéutica de los tratamientos de BNCT en términos de inhibición del desarrollo tumoral (Tabla 25). Solo podemos recalcar:

- Un mejoramiento del T80 para el caso del protocolo D(GB-10+BPA)-BNCT: D(GB-10+BPA)-BNCT 4 Gy, 6 semanas de intervalo fue de **18 semanas**, mientras que, para D(GB-10+BPA)-BNCT 4 Gy, 2 semanas T80 **no se alcanzó** en el período de seguimiento de 8 meses (Tabla 25).
- En cuanto al protocolo DHaz solo 4 Gy, 6 semanas versus 2 semanas de intervalo, se observa como el acortamiento del intervalo entre irradiaciones retrasó el T50 y T80, reflejando una mejora en el efecto terapéutico del DHaz solo.

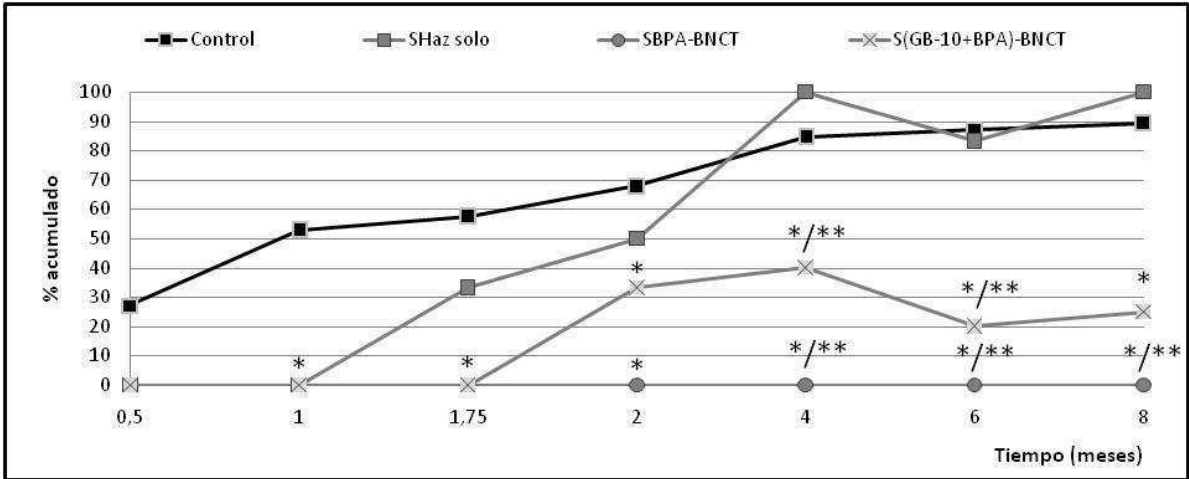
Tabla 25. Tabla comparativa que muestra *T50* y *T80* (tiempo al cual 50/ y 80/ de los animales desarrollaron tumores nuevos en tejido con PMD, respectivamente) para *DBNCT* (6 semanas de intervalo); *DBNCT* (2 semanas de intervalo) y el grupo control (cancerizado, sham-irradiado).

Grupo experimental	Protocolo	T50	T80
Control (cancerizado, sham-irradiados)		4 semanas	13 semanas
Doble aplicación 4 Gy cada irradi., 6 semanas de intervalo	<i>D</i> Haz solo	8 semanas	20 semanas
	<i>DBPA</i> -BNCT	8 semanas	no alcanza
	<i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT	15 semanas	18 semanas
Doble aplicación 4 Gy cada irradi., 2 semanas de intervalo	<i>D</i> Haz solo	11 semanas	29 semanas
	<i>DBPA</i> -BNCT	6 semanas	15 semanas
	<i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT	6 semanas	no alcanza

Única aplicación (8 Gy): En cuanto al protocolo *SBNCT*, para los grupos *SBPA*-BNCT y *S*(GB-10+BPA)-BNCT, los animales sufrieron una mucositis grado 5, con pérdida significativa de tejido con PMD. Luego, el análisis de desarrollo tumoral se realizó en la porción remanente de bolsa, expuesta a menores niveles de dosis. Para conocer qué dosis recibió esta porción remanente, se utilizó la herramienta computacional desarrollada por Farías et al. (2011), explicada en la sección Materiales y Métodos, ítem IV. Los resultados de esta simulación se detallarán más abajo.

Los tres grupos indujeron una inhibición temprana del 100/ , que persistió hasta los 8 meses para el grupo *SBPA*-BNCT (ANEXO 2-Tabla 64), siendo significativa esta diferencia versus el grupo control a los 2, 4, 6 y 8 meses ($p=0,0048$; $p=0,0002$; $p=0,0001$, respectivamente). Al mes la diferencia no alcanzó significancia estadística, aunque resultó cercano al límite de significancia establecido ($p=0,0557$). La diferencia del *SBPA*-BNCT versus el grupo *SHaz* solo resultó significativa para los tiempos 4 meses ($p=0,0022$), 6 y 8 meses ($p=0,0476$). En cuanto al grupo *S*(GB-10+BPA)-BNCT, ejerció una inhibición del 100/ durante 5 semanas. El porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos fue significativamente menor que el grupo control al mes ($p=0,0264$), 2 meses ($p=0,0201$), 4 meses ($p=0,0041$), 6 y 8 meses de seguimiento ($p=0,0003$). Respecto al grupo *SHaz* solo, resultó significativamente menor a los 4 meses ($p=0,0152$) y 6 meses ($p=0,0476$) post-tratamiento (Ilustración 38; ANEXO 2-Tabla 64). Respecto al grupo *SHaz* solo, ejerció una inhibición del 100/ durante 4 semanas (1 mes), lo cual resultó, en este tiempo, significativamente menor que el control ($p=0,0264$). A los 2, 4, 6 y 8 meses, el porcentaje acumulado aumentó, alcanzando valores que no mostraron diferencias significativas respecto del control (cancerizados, sham-irradiados) (Ilustración 38; ANEXO 2-Tabla 64).

Ilustración 38. Porcentaje acumulado de animales (✓) que exhibieron desarrollo tumoral en tejido con PMD para el grupo control y cada uno de los protocolos de tratamiento (SBNCT, 8 Gy, RA-3). Se grafican los valores correspondientes a algunos tiempos representativos. Las líneas llenas corresponden a una interpolación lineal. La tabla con los porcentajes acumulados para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2-Tabla 64. Un asterisco indica significancia estadística versus el grupo control. Dos asteriscos indican significancia estadística versus el grupo SHaz solo. Nivel de significancia $p \leq 0,05$.



Al analizar los valores de $T50$ y $T80$ del protocolo SBNCT (Tabla 26), estos parámetros reflejan claramente lo descrito en el párrafo anterior. Los grupos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT, **no alcanzaron** $T50$ (ni $T80$) dentro del período de 8 meses de seguimiento. En cambio, el grupo SHaz solo, alcanzó $T50$ a los **dos meses** (versus el grupo control que lo alcanzó al **mes** post $T0$), y rápidamente a la semana siguiente (**T9**) alcanzó $T80$.

Tabla 26. $T50$ y $T80$: tiempo al cual, respectivamente, el 50/ y 80/ de los animales desarrollaron tumores nuevos post $T0$, para el protocolo SBNCT (8 Gy). (*) Para el caso de los protocolos SBNCT, los datos corresponden a la porción remanente de la bolsa, después de la pérdida de tejido debido a la excesiva radiotoxicidad.

SBNCT (8 Gy) - RA-3	$T50$	$T80$
Control	4 meses	13 meses
SHaz solo	8 semanas	9 semanas
SBPA-BNCT ^(*)	no alcanza	no alcanza
S(GB-10+BPA)-BNCT ^(*)	no alcanza	no alcanza

Análisis computacional

Como se indicó más arriba, los grupos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT (8 Gy dosis total absorbida a tejido con PMD), sufrieron una mucositis grado 5, con pérdida significativa de tejido con PMD. Luego, el análisis de desarrollo tumoral fue evaluado en la porción remanente de bolsa, expuesta a menores niveles de dosis. Para conocer qué dosis recibió

esta porción remanente, se utilizó la herramienta computacional desarrollada por Farías et al. (2011), explicada en la sección Materiales y Métodos, ítem IV.

Se evaluó un ejemplo representativo de cada uno de los protocolos SBNCT (8 Gy) (Tabla 27, Tabla 28, Tabla 29, respectivamente). Calculamos el porcentaje del volumen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volumen (Vx) de bolsa irradiada y los parámetros de dosis media, máxima y mínima. En este caso, a modo de ejemplo, se presentan además los histogramas dosis-volumen (Ilustración 39, Ilustración 40 y Ilustración 41, respectivamente). Estos histogramas presentan la dosis absorbida acumulada de cada componente de dosis y de la dosis total absorbida en función del volumen de interés. A su vez, muestran las inhomogeneidades en la distribución de dosis en la bolsa.

Tabla 27. SBPA-BNCT: Porcentaje del volumen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volumen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima correspondiente al ejemplo del protocolo SBPA-BNCT, calculados retrospectivamente con el “Hamster Tool”.

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volumen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	86,7/	81,3/	69,1/	53,1/	23,2/	0,5/	0,0/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volumen (Vx) de bolsa irradiada	8,6 Gy	8,0 Gy	7,2 Gy	5,7 Gy	3,4 Gy

Dosis total (Gy)	Dosis boro (Gy)	Dosis no boro (Gy)
Mínima	Mínima	Mínima
3±1	1,9±0,7	0,4±0,1
Media	Media	Media
7±3	5±2	1,5±0,4
Máxima	Máxima	Máxima
9±4	7±3	1,8±0,5

Tabla 28. SHaz solo: Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima correspondiente al ejemplo del protocolo SHaz solo, calculados retrospectivamente con el “Hamster Tool”.

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/
Volúmen de bolsa irradiada		5/	25/	50/	75/	95/	
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada		1,9 Gy	1,8 Gy	1,6 Gy	1,4 Gy	0,9 Gy	

Dosis total (Gy)	Dosis boro (Gy)	Dosis no boro (Gy)
Mínima	Mínima	Mínima
0,6±0,2	0±0	0,6±0,2
Media	Media	Media
1,6±0,4	0±0	1,6±0,4
Máxima	Máxima	Máxima
2,1±0,6	0±0	2,1±0,6

Tabla 29. S(GB-10+BPA)-BNCT: Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima correspondiente al ejemplo del protocolo S(GB-10+BPA)-BNCT, calculados retrospectivamente con el “Hamster Tool”.

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	92,3/	89,0/	80,1/	71,7/	52,7/	21,1/	0,5/
Volúmen de bolsa irradiada		5/	25/	50/	75/	95/	
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada		9,7 Gy	9,0 Gy	8,2 Gy	6,8 Gy	3,6 Gy	

Dosis total (Gy)	Dosis boro (Gy)	Dosis no boro (Gy)
Mínima	Mínima	Mínima
3±1	2,3±0,1	0,24±0,07
Media	Media	Media
8±3	7±2	0,9±0,2
Máxima	Máxima	Máxima
10±4	9±3	1,2±0,3

Ilustración 39. Histograma dosis-volumen de bolsa irradiada correspondiente al ejemplo del protocolo SBPA-BNCT.

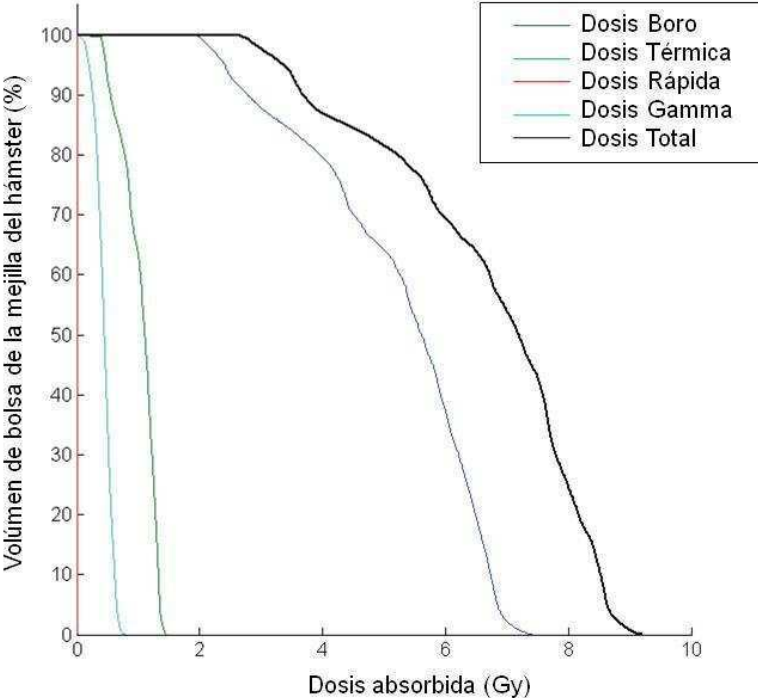


Ilustración 40. Histograma dosis-volumen de bolsa irradiada correspondiente al ejemplo del protocolo SHaz solo.

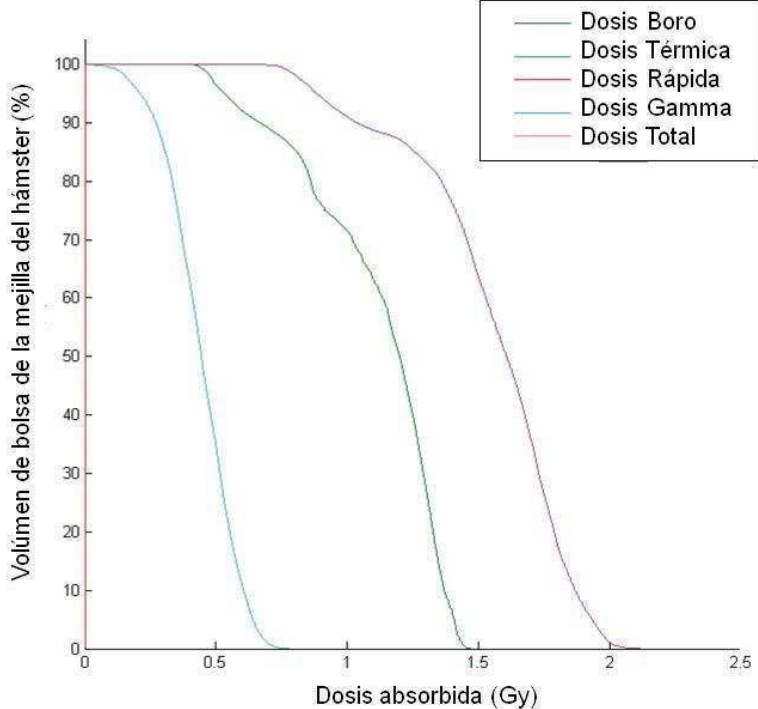
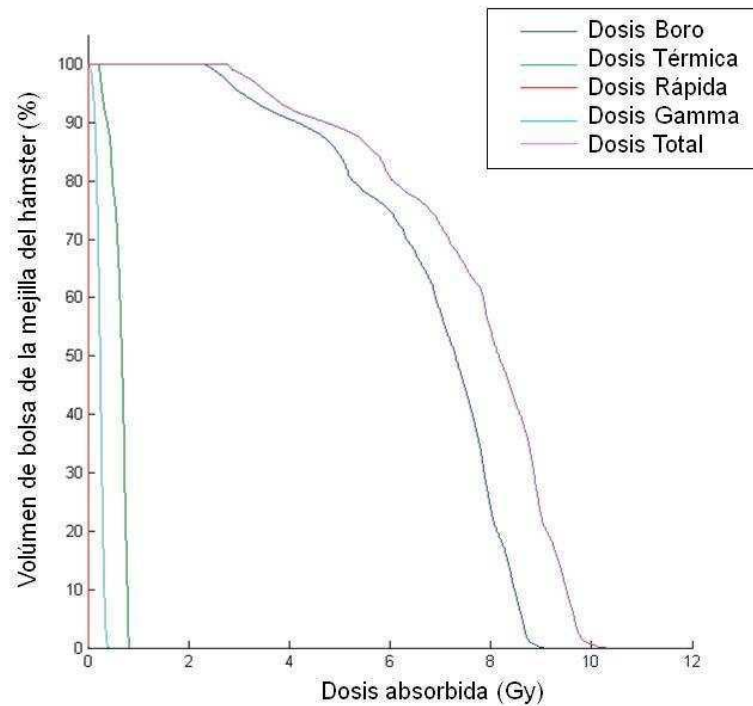


Ilustración 41. Histograma dosis-volumen de bolsa irradiada correspondiente al ejemplo del protocolo S(GB-10+BPA)-BNCT.



Para estos experimentos, la dosis a entregar se prescribió al punto medio de la bolsa. La simulación nos permite calcular, retrospectivamente, la dosis media, máxima y mínima que recibió toda la bolsa y de esta forma evaluar la inhomogeneidad de dosis. Los valores resultaron 7 ± 3 Gy dosis media para SBPA-BNCT y 8 ± 3 Gy para S(GB-10+BPA)-BNCT (Tabla 27 y Tabla 29). En cuanto a la inhomogeneidad de dosis en toda la bolsa, calculamos la diferencia relativa entre las dosis máxima y mínima, obteniendo una alta inhomogeneidad de aproximadamente el 70%.

Dado que nuestro objetivo se centró en conocer qué dosis mínima, media y máxima recibió la zona anterior de la bolsa (necrosada post irradiación) para los protocolos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT, y qué dosis (mínima, media y máxima) recibió la zona media-posterior de la bolsa de la mejilla del hamster (no necrosada post irradiación, donde evaluamos el efecto inhibitorio de la terapia), calculamos estos parámetros con la herramienta de simulación para cada protocolo evaluado (Tabla 30 y Tabla 31).

Tabla 30. Análisis por regiones para SBPA-BNCT: Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima en las regiones: **(A)** Anterior; **(B)** Media-posterior.

(A) Región anterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió XGy	100/	100/	100/	100/	57,6/	1,4/	0,01/
Volúmen de bolsa irradiada		5/	25/	50/	75/	95/	
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada		8,9 Gy	8,5 Gy	8,2 Gy	7,7 Gy	7,5 Gy	

Dosis total (Gy) (Región anterior)	Dosis boro (Gy) (Región anterior)	Dosis no boro (Gy) (Región anterior)
Mínima	Mínima	Mínima
7±3	5,7±0,1	1,3±0,4
Media	Media	Media
8,2±3,6	6,9±1,6	1,7±0,4
Máxima	Máxima	Máxima
9±4	7±3	1,8±0,5

(B) Región media-posterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió XGy	76,9/	68,1/	48,4/	22,1/	0,6/	0,0/	0,0/
Volúmen de bolsa irradiada		5/	25/	50/	75/	95/	
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada		7,7 Gy	7,0 Gy	5,9 Gy	4,3 Gy	3,0 Gy	

Dosis total (Gy) (Región media-post)	Dosis boro (Gy) (Región media-post)	Dosis no boro (Gy) (Región media-post)
Mínima	Mínima	Mínima
3±1	1,9±0,7	0,4±0,1
Media	Media	Media
6±3	4±2	1,3±0,3
Máxima	Máxima	Máxima
8±4	6±3	1,8±0,5

Tabla 31. Análisis por regiones para S(GB-10+BPA)-BNCT: Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima en las regiones: **(A)** Anterior; **(B)** Media-posterior.

(A) Región anterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	100/	100/	100/	100/	99,4/	52,3/	1,3/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada	9,8 Gy	9,5 Gy	9,1 Gy	8,9 Gy	8,5 Gy

Dosis total (Gy) (Región anterior)	Dosis boro (Gy) (Región anterior)	Dosis no boro (Gy) (Región anterior)
Mínima	Mínima	Mínima
8±3	7±2	0,7±0,1
Media	Media	Media
9±3	8±2	1,0±0,3
Máxima	Máxima	Máxima
10±4	9±3	1,2±0,3

(B) Región media-posterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	86,6/	81,0/	66,2/	52,3/	21,1/	0,0/	0,0/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada	8,5 Gy	8,0 Gy	7,2 Gy	5,7 Gy	3,3 Gy

Dosis total (Gy) (Región media-post)	Dosis boro (Gy) (Región media-post)	Dosis no boro (Gy) (Región media-post)
Mínima	Mínima	Mínima
3±1	2,3±0,6	0,24±0,07
Media	Media	Media
7±3	6±2	0,8±0,2
Máxima	Máxima	Máxima
9±3	8±2	1,0±0,3

Comenzando con el protocolo SBPA-BNCT, podemos observar que la zona anterior de la bolsa recibió una dosis media de 8 ± 4 Gy (un 57,6% de la zona anterior recibió una dosis igual o mayor a 8 Gy), con una máxima de 9 ± 4 Gy. Estas dosis provocaron una mucositis severa en la bolsa la mejilla del hamster (mucositis grado 5). En cambio, la región media-posterior exhibió efectos radiotóxicos leves, siendo la dosis media 6 ± 3 Gy con una máxima de 8 ± 4 Gy. Aunque esta región exhibió un máximo mayor a 8, el porcentaje de bolsa expuesta a esta dosis resultó menor al 1% (0,6%) (Tabla 30).

En cuanto al protocolo S(GB-10+BPA)-BNCT, la zona anterior de la bolsa recibió una dosis media de 9 ± 3 Gy (un 99,4% de la zona anterior recibió una dosis igual o mayor a 8 Gy), con una máxima de 10 ± 4 Gy. Estas dosis causaron mucositis severa (grado 5). En cambio, la región media-posterior exhibió efectos radiotóxicos leves, siendo la dosis media 7 ± 3 Gy con una máxima de 9 ± 3 Gy. En este caso, el porcentaje de bolsa que pudo haber recibido una dosis mayor o igual a 8 Gy resultó 21,1%. Aún así, esta porción de bolsa toleró la dosis mayor o igual a 8 Gy recibida (Tabla 31). La Ilustración 36 muestra como la porción anterior de la bolsa presenta los peores efectos radiotóxicos versus la zona media-posterior.

Conclusión parcial

El acortamiento del intervalo entre irradiaciones de 4 Gy de 6 semanas a 2 semanas no empeoró la mucositis. Sin embargo, no mejoró el efecto inhibitorio de las componentes de alto LET de la terapia. Aumentar la dosis al doble (8 Gy) para intentar mejorar este efecto inhibitorio resultó en una mucositis grado 5, severa, como efecto radiotóxico de la terapia. Es decir, el fraccionamiento de dosis disminuiría los efectos radiotóxicos en tejido con PMD, pero el intervalo entre irradiaciones debería ser cuidadosamente estudiado para no reducir el efecto terapéutico.

Dados los efectos radiotóxicos severos que resultaron de la irradiación con 8 Gy prescritos al punto medio de la bolsa, en tejido con PMD y normal, no se pudo realizar una segunda irradiación. Al analizar la inhibición tumoral en el tejido con PMD remanente (porción media-posterior de la bolsa), se observó una significativa inhibición en el desarrollo de tumores nuevos. Dada la necesidad de conocer qué dosis media habría recibido este sector de bolsa para utilizarla en nuevos experimentos, se realizó una simulación de dosis en la bolsa, obteniendo una dosis media en la porción media-posterior de la bolsa de aproximadamente 6 Gy.

V. Estudios de biodistribución y BNCT “piloto” *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *única* aplicación de BNCT, dosis total absorbida de 6 Gy a tejido con PMD.

Breve resumen

El estudio descrito en el ítem anterior nos permitió estimar que la región media-posterior de la bolsa, que no exhibió mucositis severa, recibió una dosis media de 6 Gy. El siguiente objetivo consistió en explorar el potencial de esta nueva dosis absorbida de 6 Gy, prescrita al punto medio de la bolsa, en términos de radiotoxicidad e inhibición tumoral. Ya que la mucositis en tejido con PMD es el efecto limitante de dosis, esta prueba piloto se realizó con el protocolo BPA-BNCT, por ser el protocolo que mayor radiotoxicidad genera en tejido con PMD y normal.

Estudios de biodistribución

En la Tabla 32 se muestran los valores de concentración absoluta de boro para el protocolo BPA, para sangre, tejido con PMD y normal. Nuevamente, para este protocolo, se realizaron nuevos estudios complementarios de biodistribución. Admitiendo las variaciones del contenido de boro en tejido, los tres valores reportados de BPA en tejido con PMD (esta sección, ítems II, IV y V: 19,7±9,4 ppm; 16,0±5,6 ppm; 12,5±2,6 ppm, respectivamente) fueron consistentes. Sin embargo decidimos utilizar el nuevo valor correspondiente a BPA en tejido con PMD para el cálculo de dosis: 12,5±2,6 ppm.

Tabla 32. Concentración absoluta de boro (media±desvío estándar) (ppm) en tejido con PMD, tejido normal y sangre empleados para los cálculos de dosis para cada protocolo. Las relaciones *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* resultan de la división de las medias de cada tejido reportadas en la tabla. “n” indica número de muestras.

Tejido/Protocolo	BPA 15,5 mg ¹⁰ B/kg
Tejido con PMD	12,5±2,6 (n=7)
Tejido normal	13,4±2,8 (n=7)
Sangre	8,0±2,1 (n=7)
Tejido con PMD/Tejido normal	0,9/1,0
Tejido con PMD/Sangre	1,6/1,0

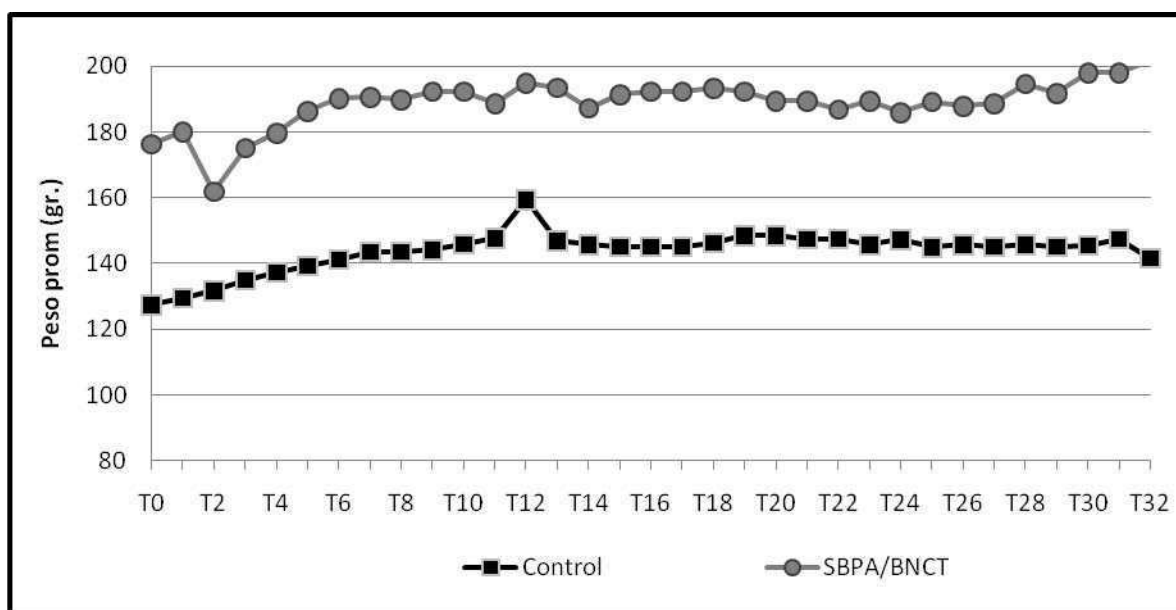
El valor de captación absoluta de boro en el tejido con PMD se encontró por debajo de los valores aproximados que se consideran clásicamente útiles para control tumoral en el modelo clásico de carcinogénesis (aproximadamente 20 ppm). La relación de contenido de

boro entre el *tejido con PMD/tejido normal* reveló nuevamente que no existe una acumulación preferencial de boro en tejido con PMD (**0,9/1**). Sin embargo, la relación *tejido con PMD/sangre* muestra una acumulación selectiva del boro por el tejido con PMD (**1,6/1,0**). (Tabla 32)

Estado general de los animales

Los animales cancerizados, tratados con SBPA-BNCT, exhibieron una tendencia similar a la del grupo control (animales cancerizados, sham-irradiados) (Ilustración 42; ANEXO 2-Tabla 65 y Tabla 66). Al final del período de seguimiento el promedio de aumento de peso aproximado para todos los grupos osciló entre 9 y 13%. Las pequeñas fluctuaciones en peso corporal podrían deberse asimismo a la necesidad de anestesiar el animal periódicamente para la evaluación macroscópica de la bolsa de la mejilla.

Ilustración 42. Peso promedio (gr) para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y grupo SBPA-BNCT, *única* aplicación, con 6 Gy dosis absorbida a tejido con PMD. En el gráfico no se incluyen los desvíos estándar para facilitar la visualización. La tabla con las medias y desvíos estándar para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2-Tabla 65.



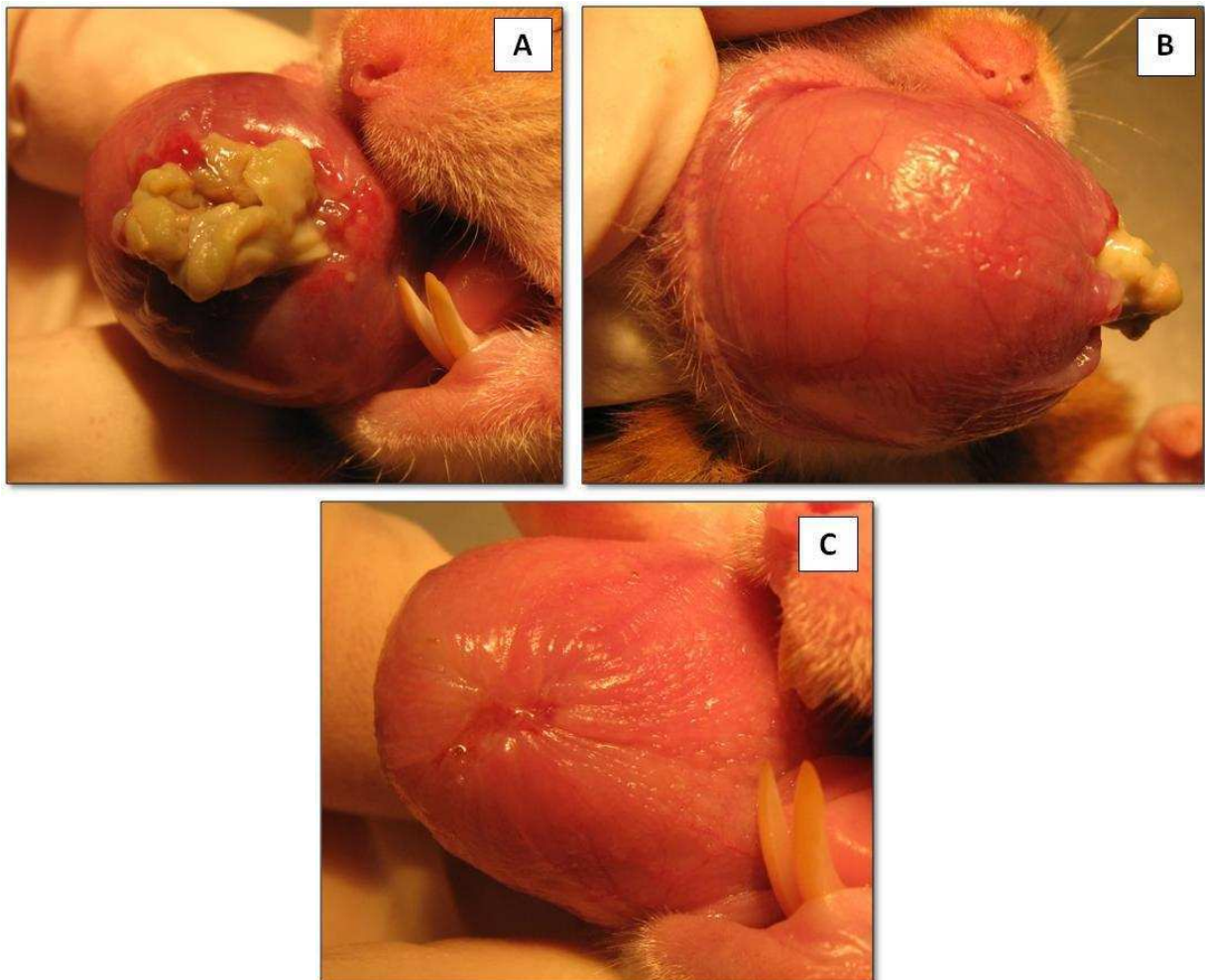
Los animales tratados no exhibieron signos clínicos de radiotoxicidad (síndrome gastrointestinal, diarrea, alteraciones neurológicas tales como falta de coordinación, alteraciones en el comportamiento, alopecia, etc.) a lo largo de todo el período de seguimiento (8 meses).

Análisis de radiotoxicidad

Todos los animales irradiados presentaban, al momento de irradiación, mucositis grado 0. La aplicación de SBPA-BNCT, a una dosis de 6 Gy prescrita al punto medio de la

bolsa, causó una mucositis severa (grado 5) en el 100% de los animales con pérdida ostensible de tejido con PMD (Ilustración 43A y B, ANEXO 2-Tabla 67). Por ello, no pudimos realizar una segunda irradiación. El pico de mucositis (100% de animales con grado 5) se observó aproximadamente a los 14 días post irradiación (ANEXO 2-Tabla 67). La resolución de la mucositis fue evaluada en la porción remanente de bolsa, expuesta a menores niveles de dosis (ver más abajo “Análisis Computacional”). La mucositis en el tejido remanente resolvió totalmente 3 semanas luego de la irradiación (Ilustración 43C; ANEXO 2-Tabla 67).

Ilustración 43. (A) Vista lateral interna y (B) vista lateral externa de una bolsa de un animal cancerizado tratado con SBPA-BNCT 6 Gy, con mucositis grado 5, 14 días post irradiación. (C) Vista lateral interna: Cicatrización de la zona donde se perdió parte de tejido con PMD. Resto de la bolsa, mucositis grado 0.



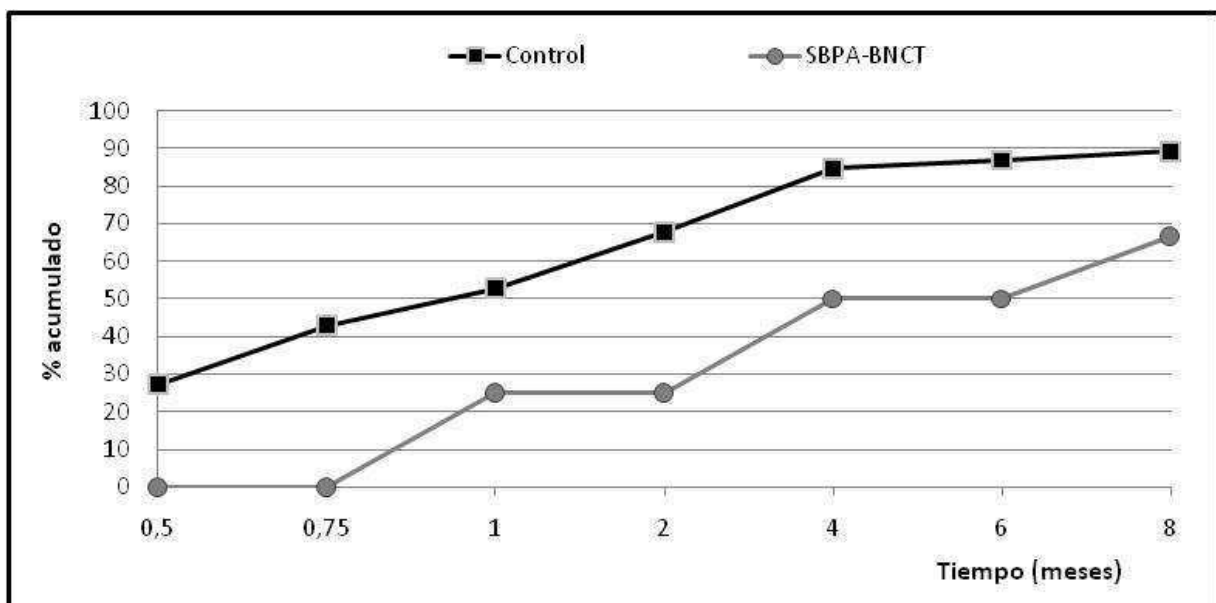
Cinética del desarrollo tumoral

Tal como se describe más arriba, los animales sufrieron pérdida de tejido con PMD debido a la severa radiotoxicidad generada por el protocolo ensayado (SBPA-BNCT, 6 Gy). Luego, el efecto terapéutico fue evaluado en la porción remanente de bolsa, expuesta a menores niveles de dosis. Para conocer qué dosis recibió esta porción remanente, se utilizó

nuevamente la herramienta computacional desarrollada por Farías et al. (2011), explicada en la sección Materiales y Métodos, ítem IV. Los resultados de esta simulación se detallan más abajo.

En la Ilustración 44 y ANEXO 2-Tabla 68 se muestra el *porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos* en la porción remanente de tejido con PMD post irradiación. Hasta las 3 semanas post irradiación, este protocolo ejerció una inhibición del 100%. A partir de ese tiempo hasta los 8 meses post irradiación, el porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos demostró una clara tendencia de inhibición del desarrollo tumoral, pero no alcanzó significancia estadística. Esto podría deberse al pequeño tamaño muestral del grupo SBPA-BNCT en esta prueba piloto.

Ilustración 44. Porcentaje (%) acumulado de animales que exhibieron desarrollo tumoral en tejido con PMD para el grupo control y el protocolo SBPA-BNCT, 6 Gy, RA-3. Se grafican los valores correspondientes a algunos tiempos representativos. Las líneas llenas corresponden a una interpolación lineal. La tabla con porcentajes acumulados para cada tiempo se incluye en el ANEXO 2-Tabla 68.



Al analizar los valores de *T50* y *T80* (Tabla 33), el grupo SBPA-BNCT alcanzó el 50% de los animales con tumores nuevos a las **9 semanas** post irradiación versus el grupo control, **4 semanas**. Respecto al *T80*, fue de **13 semanas** para el grupo control, versus SBPA-BNCT que **no alcanzó** este porcentaje en el período de seguimiento de 8 meses.

Tabla 33. T50 y T80: tiempo al cual, respectivamente, el 50/ y 80/ de los animales desarrollaron tumores nuevos post T0. (*) Para el caso del protocolo SBPA-BNCT, los datos corresponden a la porción remanente de la bolsa, después de pérdida de tejido, debido a la excesiva radiotoxicidad.

SBNCT (6 Gy) - RA-3	T50	T80
Control	4 semanas	13 semanas
SBPA-BNCT(*)	9 semanas	no alcanza

Análisis computacional

Como se indicó más arriba, este grupo de animales expuestos al protocolo SBPA-BNCT, a una dosis de 6 Gy prescrita en el punto medio de la bolsa, sufrieron una mucositis grado 5, con pérdida significativa de tejido con PMD. Luego, el análisis de desarrollo tumoral fue realizado en la porción remanente de bolsa, expuesta a menores niveles de dosis. Para conocer qué dosis recibió esta porción remanente, se utilizó la herramienta computacional desarrollada por Farías et al. (2011), explicada en la sección Materiales y Métodos, ítem IV.

Se evaluó un animal como ejemplo y calculamos el porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y los parámetros de dosis media, máxima y mínima en toda la bolsa del animal (Tabla 34). La dosis media en toda la bolsa resultó 6 ± 2 Gy, con un máximo de 8 ± 3 Gy. Nuevamente, una alta inhomogeneidad de dosis, esta vez del 67/ , se observó en la simulación.

Tabla 34. Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima correspondiente al ejemplo del protocolo SBPA-BNCT (6 Gy) calculados retrospectivamente con el "Hamster tool".

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	89,1/	75,1/	45,4/	2,7/	0,0/	0,0/	0,0/
Volúmen de bolsa irradiada		5/	25/	50/	75/	95/	
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada		7,0 Gy	6,5 Gy	6,0 Gy	5,1 Gy	3,0 Gy	

Dosis total (Gy)	Dosis boro (Gy)	Dosis no boro (Gy)
Mínima	Mínima	Mínima
2,5±0,9	1,7±0,4	0,6±0,2
Media	Media	Media
6±2	4±1	1,5±0,4
Máxima	Máxima	Máxima
8±3	5±1	2,0±0,6

Dado que nuestro objetivo se centró en conocer qué dosis mínima, media y máxima recibió la zona anterior de la bolsa (necrosada post irradiación) y qué dosis (mínima, media y máxima) la zona media-posterior de la bolsa de la mejilla del hámster (no necrosada post irradiación, donde evaluamos el efecto inhibitorio de la terapia), calculamos estos parámetros con la herramienta de simulación (Tabla 35).

Tabla 35. Análisis por regiones para SBPA-BNCT: Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima en las regiones: **(A)** Anterior; **(B)** Media-posterior.

(A) Región anterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	100/	100/	96,6/	7,9/	0,01/	0,0/	0,0/
Volúmen de bolsa irradiada		5/	25/	50/	75/	95/	
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada		7,1 Gy	6,9 Gy	6,6 Gy	6,4 Gy	6,1 Gy	

Dosis total (Gy) (Región anterior)	Dosis boro (Gy) (Región anterior)	Dosis no boro (Gy) (Región anterior)
Mínima	Mínima	Mínima
6±2	4±1	1,2±0,1
Media	Media	Media
7±2	5±1	1,7±0,4
Máxima	Máxima	Máxima
8±3	5±1	2,0±0,6

(B) Región media-posterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	82,2/	60,4/	16,2/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada	6,3 Gy	5,9 Gy	5,4 Gy	4,4 Gy	2,8 Gy

Dosis total (Gy) (Región media-post)	Dosis boro (Gy) (Región media-post)	Dosis no boro (Gy) (Región media-post)
Mínima	Mínima	Mínima
2,4±0,9	1,7±0,4	0,6±0,2
Media	Media	Media
5±2	3,7±0,9	1,4±0,4
Máxima	Máxima	Máxima
7±2	5±1	1,9±0,4

La zona anterior de la bolsa recibió una dosis media de 7 ± 2 Gy (donde un 96,60% de la zona anterior recibió una dosis igual o mayor a 6 Gy), con una máxima de 8 ± 3 Gy. Estas dosis resultaron en una mucositis severa (grado 5) para la bolsa de la mejilla del hámster cancerizada. En cambio, la región media-posterior exhibió efectos radiotóxicos leves, siendo la dosis media 5 ± 2 Gy con una máxima de 7 ± 2 Gy. En este caso, el porcentaje de bolsa que pudo haber recibido una dosis mayor o igual a 6 Gy fue de 16,2%.

La Ilustración 43 muestra como la porción anterior de la bolsa es la que presenta los efectos radiotóxicos severos, versus la zona media-posterior, que exhibió una mucositis leve.

Conclusión parcial

Dados los efectos radiotóxicos severos del protocolo SBPA-BNCT (6 Gy), no pudimos realizar una segunda irradiación. Al analizar la inhibición tumoral en la porción de bolsa remanente, se observó una tendencia importante a la inhibición del desarrollo de tumores nuevos en tejido con PMD. Dada la necesidad de conocer qué dosis habría recibido esta porción de bolsa de la mejilla del hámster, para luego evaluar su efecto terapéutico prescribiéndola como dosis media en toda la bolsa en nuevos experimentos, se realizó una simulación de dosis en esta porción, obteniendo una dosis media de aproximadamente 5 Gy.

VI. Estudios de biodistribución y BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT con un intervalo de 4 semanas entre irradiaciones, 5 Gy dosis absorbida a tejido con PMD en cada irradiación.

Breve resumen

Dados los resultados de la prueba piloto descrita en el ítem V de esta sección, decidimos probar la nueva dosis aportada por la simulación computacional, 5 Gy, que recibió la porción remanente de tejido con PMD post irradiación con SBPA-BNCT (6 Gy). Se decidió evaluar los protocolos cuya eficacia terapéutica fue demostrada en los ítems II, III, IV y V, es decir, BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT, prescribiendo una dosis media absorbida de 5 Gy a tejido con PMD, utilizando el "Hamster Tool". Si los efectos radiotóxicos lo permitieran, se realizaría una segunda irradiación ampliando el intervalo entre irradiaciones de 2 a 4 semanas, dados los resultados detallados en el ítem IV de esta misma sección.

Estudios de biodistribución

En la Tabla 36 se muestran los valores de concentración absoluta de boro para los protocolos BPA y (GB-10+BPA), en sangre, tejido con PMD y normal. Para el protocolo BPA, se utilizaron los valores previamente reportados en el ítem V de esta misma sección. Para el protocolo (GB-10+BPA), se realizaron nuevos estudios de biodistribución con la intención de reconfirmar los valores utilizados en los ítems II, III y IV. Más allá de las admitidas variaciones del contenido de boro en tejido, el nuevo valor en tejido con PMD resultó consistente y decidimos utilizarlo para los cálculos de dosis de este nuevo protocolo. El valor en ppm correspondiente a tejido con PMD se encontró dentro del rango descrito de utilidad terapéutica (aproximadamente 20 ppm) para el control tumoral en el modelo de cancerización clásico.

En cuanto a las relaciones contenido de boro entre el *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* para el protocolo (GB-10+BPA), ninguna reveló una acumulación preferencial (**0,8/1** y **1,0/1,0**, respectivamente). (Tabla 36)

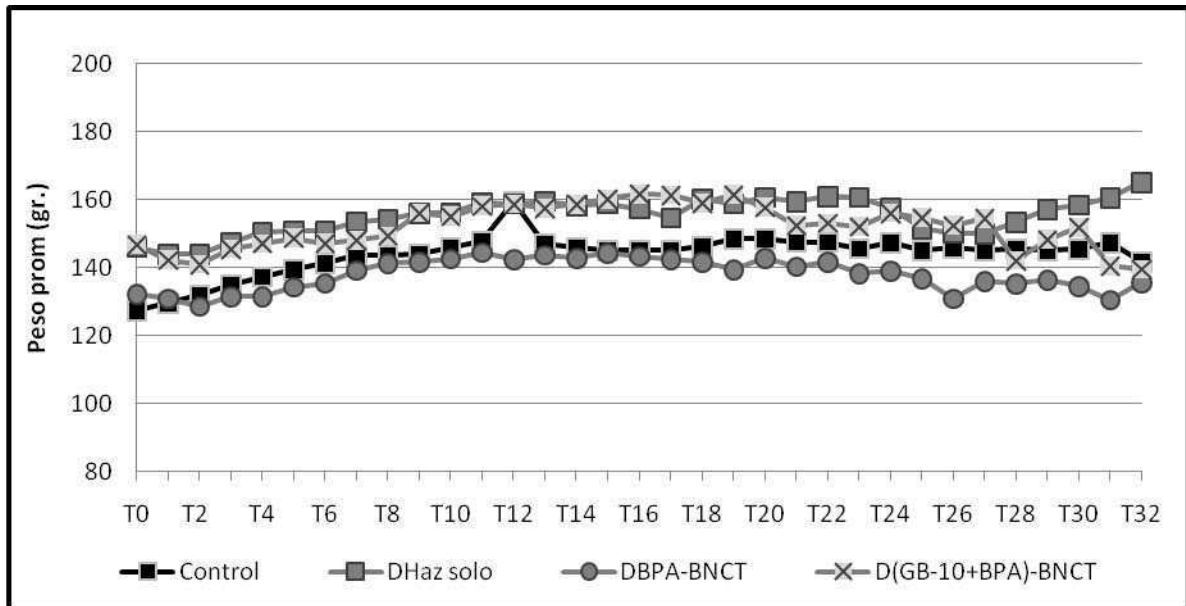
Tabla 36. Concentración absoluta de boro (media±desvío estándar) (ppm) en tejido con PMD, tejido normal y sangre empleados para los cálculos de dosis para cada protocolo. Las relaciones *tejido con PMD/tejido normal* y *tejido con PMD/sangre* resultan de la división de las medias de cada tejido reportadas en la tabla. “n” indica número de muestras.

Tejido/Protocolo	BPA	GB-10+BPA
	15,5 mg ¹⁰ B/kg	GB-10: 34,5 mg ¹⁰ B/kg + BPA: 31 mg ¹⁰ B/kg
Tejido con PMD	12,5±2,6 (n=7)	36±11 (n=9)
Tejido normal	13,4±2,8 (n=7)	43,2±9,6 (n=8)
Sangre	8,0±2,1 (n=7)	36±22 (n=3)
Tejido con PMD/tejido normal	0,9/1,0	0,8/1,0
Tejido con PMD/sangre	1,6/1,0	1,0/1,0

Estado general de los animales

En cuanto al patrón de aumento de peso corporal, los animales cancerizados, tratados con los protocolos de *DBNCT* y *DHaz* solo, exhibieron una tendencia similar a la del grupo control (animales cancerizados, sham-irradiados) (Ilustración 45; ANEXO 2-Tabla 69 y Tabla 70). Al final del período de seguimiento el promedio de aumento de peso aproximado para todos los grupos osciló entre 1 y 13%. Las pequeñas fluctuaciones en peso corporal podrían deberse a la necesidad de anestesiarse al animal periódicamente para la evaluación macroscópica de la bolsa de la mejilla.

Ilustración 45. Peso promedio (gr) para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos de tratamiento empleando una *doble* aplicación de BNCT con un intervalo de 4 semanas, 5 Gy a tejido con PMD en cada irradiación: *D*Haz solo; *DBPA*-BNCT; *D*(GB-10+BPA)-BNCT. En el gráfico no se incluyen los desvíos estándar para facilitar la visualización. La tabla con las medias y desvíos estándar para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2-Tabla 69.



En cuanto al grupo normal tratado con *DBPA*-BNCT (ANEXO 2-Tabla 71), no se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de ganancia de peso hasta T8 (tiempo al cual se observó la resolución completa de la mucositis en animales cancerizados tratados), respecto al grupo normal sin irradiar.

Los animales tratados, cancerizados y normales, no exhibieron signos clínicos de radiotoxicidad (síndrome gastrointestinal, diarrea, alteraciones neurológicas tales como falta de coordinación, alteraciones en el comportamiento, alopecia, etc.) a lo largo de todo el período de seguimiento (8 meses).

Análisis de radiotoxicidad

Todos los animales irradiados presentaban, al momento de la primera irradiación, mucositis grado 0. El grupo *D*Haz solo, exhibió un máximo de mucositis grado 1 post ambas irradiaciones (ANEXO 2-Tabla 72). Para los protocolos *DBPA*-BNCT y *D*(GB-10+BPA)-BNCT, el pico de mucositis se observó a las dos semanas luego de la primera irradiación. Se observó mucositis grado 5 en un 67% de los animales para el protocolo *DBPA*-BNCT mientras que, para el protocolo *D*(GB-10+BPA)-BNCT, solamente se observó mucositis grado 5 en un 33% de los animales (ANEXO 2-Tabla 72). Aunque ambos protocolos indujeron mucositis grado 5, con pérdida moderada de tejido con PMD, las porciones remanentes de las bolsas fueron suficientemente largas como para poder evertirlas y realizar una segunda irradiación. La

mucositis observada luego de la segunda irradiación no se vio exacerbada por la primera aplicación. (ANEXO 2-Tabla 72)

La resolución de la mucositis fue evaluada en la porción remanente de bolsa, expuesta a menores niveles de dosis (ver más abajo “Análisis Computacional”). Para el momento de la segunda irradiación, para ambos protocolos de DBNCT, solo un 33% de los animales presentaba mucositis grado 1. La resolución completa de la mucositis en la porción remanente de la bolsa que fue re-irradiada fue a las 2 semanas post segunda irradiación para el grupo DBPA-BNCT y 4 semanas post segunda irradiación para el protocolo D(GB-10+BPA)-BNCT. (ANEXO 2-Tabla 72)

En cuanto al efecto radiotóxico del protocolo DBPA-BNCT en tejido normal, post segunda irradiación, un animal exhibió mucositis grado 2. El resto de los animales exhibieron como máximo mucositis grado 1. (ANEXO 2-Tabla 73)

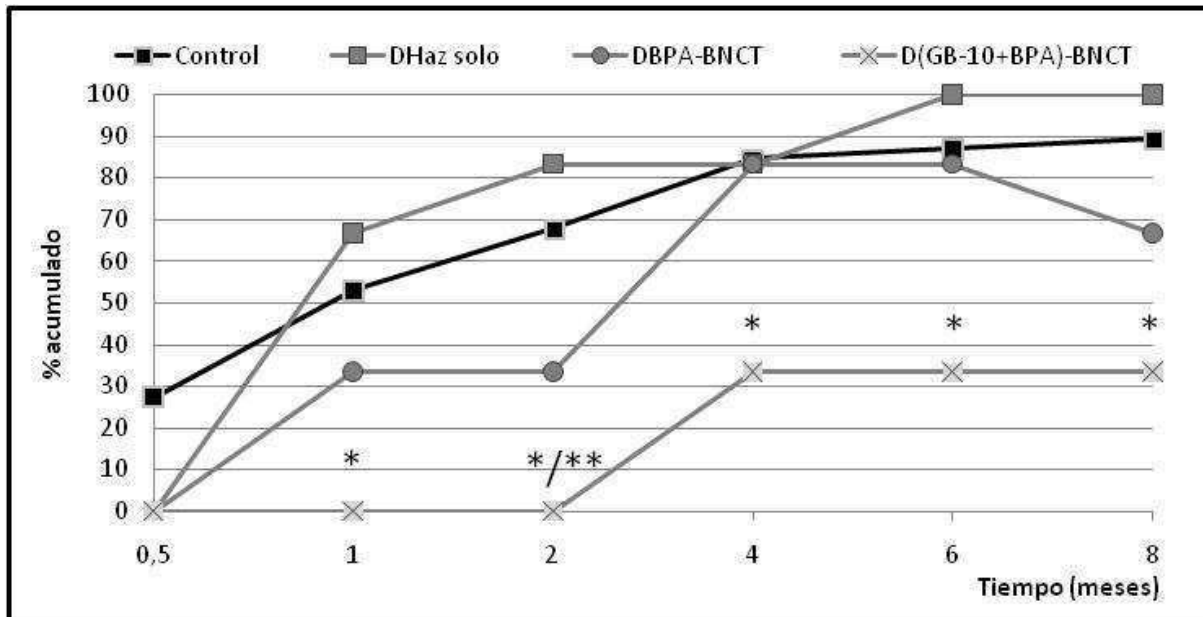
Cinética del desarrollo tumoral

El análisis de desarrollo tumoral fue evaluado, en el caso de aquellos animales que hubieran sufrido mucositis grado 5, en la porción remanente de bolsa, expuesta a menores niveles de dosis.

En la Ilustración 46 y ANEXO 2-Tabla 74 se presenta el *porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos* para cada uno de los protocolos ensayados. Hasta las dos semanas post 1ª irradiación, todos los protocolos indujeron una inhibición del 100%. El protocolo DHaz solo perdió su efecto inhibitorio antes del mes post primera irradiación (3 semanas). En cuanto al protocolo DBPA-BNCT, se demostró una tendencia a la inhibición tumoral, aunque no significativa, hasta los dos meses post primera irradiación. Para los 8 meses, se observó que el porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos fue más bajo que el grupo control y DHaz solo, aunque no alcanzó significancia estadística. En cuanto al protocolo D(GB-10+BPA)-BNCT persistió con una inhibición del 100% hasta los dos meses post primera irradiación, resultando significativo versus el grupo control para todos los tiempos post T0, 1 mes ($p=0,0264$), 2 meses ($p=0,0018$), 4 meses ($p=0,0103$), 6 y 8 meses ($p=0,0035$). A los 8 meses, el porcentaje acumulado de animales con tumores nuevos para el grupo D(GB-10+BPA)-BNCT fue de 33,3% versus 89,3% en el grupo control.

Al analizar la significancia estadística de los grupos DBNCT frente al DHaz solo, solo el porcentaje acumulado del grupo D(GB-10+BPA)-BNCT, a los 2 meses, mostró significancia estadística ($p=0,0152$). Al mes y a los 6 y 8 meses post 1ª irradiación, los porcentajes acumulados resultaron no significativos aunque con “p” cercano al límite de significancia establecido ($p=0,0606$). (Ilustración 46; ANEXO 2-Tabla 74)

Ilustración 46. Porcentaje (✓) acumulado de animales que exhibieron desarrollo tumoral en tejido con PMD para el grupo control y cada uno de los protocolos de tratamiento (DBNCT, 5 Gy cada irradiación, 4 semanas de intervalo, RA-3). Se grafican los valores correspondientes a algunos tiempos representativos. Las líneas llenas corresponden a una interpolación lineal. La tabla con porcentajes acumulados para cada tiempo, para cada protocolo, se incluye en el ANEXO 2-Tabla 74. Un asterisco indica significancia estadística versus el grupo control. Dos asteriscos indican significancia estadística versus el grupo DHaz solo. Nivel de significancia $p \leq 0,05$.



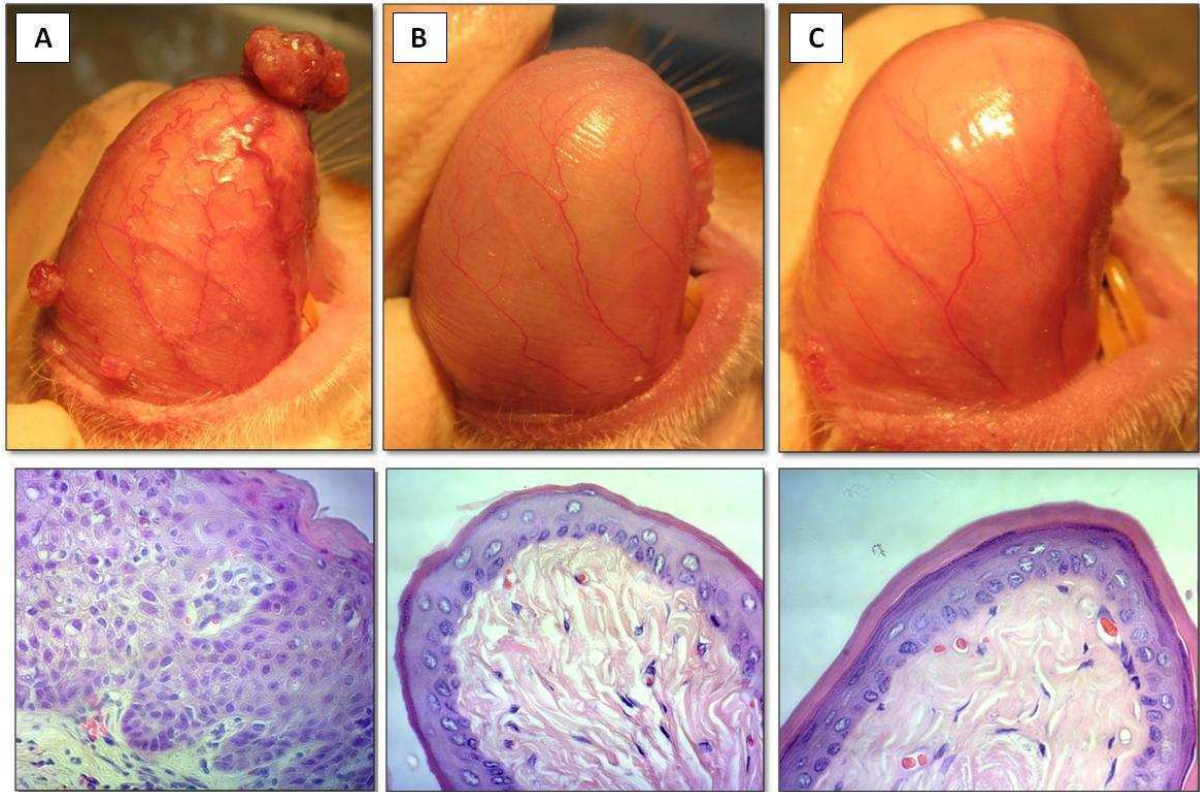
Al analizar los valores de $T50$ y $T80$ (Tabla 37), el $T50$ para el protocolo DBPA-BNCT evidenció el efecto inhibitorio versus el grupo control y DHaz solo (**10 semanas** versus **4 y 3 semanas**, respectivamente). En cambio, el $T80$ para el grupo DBPA-BNCT fue similar al del grupo control (**13 semanas** para ambos grupos). $T80$ para el grupo DHaz solo resultó **7 semanas**, siendo menor al observado para el grupo control y DBPA-BNCT. En cuanto al grupo D(GB-10+BPA)-BNCT, este **no alcanzó** el $T50$, y por ende el $T80$, en todo el período de seguimiento (8 meses).

Tabla 37. *T50* y *T80*: tiempo al cual, respectivamente, el 50/ y 80/ de los animales desarrollaron tumores nuevos post T0. (*) Para los protocolos *DBPA-BNCT* y *D(GB-10+BPA)-BNCT*, los datos corresponden a la porción remanente de la bolsa en aquellos casos en los que hubo pérdida de tejido debido a radiotoxicidad severa.

<i>DBNCT</i> (5 Gy, 4 sem) - RA-3	<i>T50</i>	<i>T80</i>
Control	4 semanas	13 semanas
<i>D</i>Haz solo	3 semanas	7 semanas
<i>DBPA-BNCT</i>^(*)	10 semanas	13 semanas
<i>D(GB-10+BPA)-BNCT</i>^(*)	no alcanza	no alcanza

Por último, a los 8 meses post-tratamiento, las bolsas cancerizadas y tratadas con *DBPA-BNCT* o *D(GB-10+BPA)-BNCT* que no desarrollaron tumores tenían la apariencia macroscópica de una bolsa normal (no cancerizada) (Ilustración 47). En cuanto a las características histológicas, también resultaron más parecidas a un epitelio normal dado la presencia mayoritaria de epitelio NUMF. Por el contrario, como ya se explicó en el ítem I de esta sección, en un epitelio cancerizado no tratado existe un aumento significativo de lesiones hiperplásicas y displásicas. Esta última lesión se encuentra representada en la imagen de microscopía de la Ilustración 47A.

Ilustración 47. (A) Bolsa cancerizada, 8 meses post sham-irradiación (tomada de Ilustración 25); **(B)** Bolsa cancerizada tratada con DBPA-BNCT 8 meses post-irradiación; **(C)** Bolsa normal (no cancerizada, no irradiada). Debajo de cada foto, en cada caso, se muestra la correspondiente imagen de microscopía (H&E, magnificación final: 200X).



Análisis computacional

Para estos experimentos, se utilizó la herramienta “Hamster tool” para calcular el tiempo de irradiación para entregar una dosis media en toda la bolsa de 5 Gy y, retrospectivamente, evaluar la dosis que recibieron las diferentes regiones de la bolsa post primera irradiación. En este caso se prescribió la dosis media en toda la bolsa, a diferencia de los casos anteriores en los cuales se prescribió la dosis al punto medio de la bolsa. Esta nueva forma de prescribir fue posible gracias al “Hamster tool” y permitiría realizar consideraciones dosimétricas en distintas zonas de la bolsa previo a la irradiación.

En cuanto al animal del protocolo DBPA-BNCT, los valores fueron 5 ± 2 Gy dosis media, 6 ± 2 Gy dosis máxima y $2,0 \pm 0,7$ Gy dosis mínima, con una inhomogeneidad de dosis del 65% (Tabla 38). En relación al animal seleccionado del protocolo D(GB-10+BPA)-BNCT (Tabla 39), la dosis media fue de 5 ± 2 Gy, la máxima de 7 ± 3 Gy y la mínima de $1,8 \pm 0,8$ Gy. La inhomogeneidad de dosis resultante fue 73%. Se reportan también los valores correspondientes al DHaz solo (Tabla 40).

Tabla 38. DBPA-BNCT: Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima correspondiente al ejemplo del protocolo DBPA-BNCT calculados con el "Hamster tool".

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	75,7/	34,1/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada	5,6 Gy	5,2 Gy	4,8 Gy	4,1 Gy	2,5 Gy

Dosis total (Gy)	Dosis boro (Gy)	Dosis no boro (Gy)
Mínima	Mínima	Mínima
2,0±0,5	1,3±0,3	0,5±0,2
Media	Media	Media
5±2	3,4±0,8	1,2±0,3
Máxima	Máxima	Máxima
6±2	4±1	1,5±0,4

Tabla 39. D(GB-10+BPA)-BNCT: Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima correspondiente al ejemplo del protocolo D(GB-10+BPA)-BNCT calculados con el "Hamster tool".

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	79,3/	60,4/	17,3/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada	6,4 Gy	5,9 Gy	5,4 Gy	4,3 Gy	2,4 Gy

Dosis total (Gy)	Dosis boro (Gy)	Dosis no boro (Gy)
Mínima	Mínima	Mínima
1,8±0,8	1,6±0,1	0,16±0,05
Media	Media	Media
5±2	5±2	0,6±0,1
Máxima	Máxima	Máxima
7±3	6±2	0,7±0,2

Tabla 40. DHaz solo: Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima correspondiente al ejemplo del protocolo DHaz solo calculados con el "Hamster tool".

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada	1,4 Gy	1,3 Gy	1,2 Gy	1,1 Gy	0,7 Gy

Dosis total (Gy)	Dosis boro (Gy)	Dosis no boro (Gy)
Mínima	Mínima	Mínima
0,3±0,1	0±0	0,3±0,1
Media	Media	Media
1,2±0,3	0±0	1,2±0,3
Máxima	Máxima	Máxima
1,6±0,4	0±0	1,6±0,4

En cuanto al análisis retrospectivo, se tomó como ejemplo un animal con grado 5 del protocolo DBPA-BNCT. La zona anterior de la bolsa recibió una dosis media de 5 ± 2 Gy (un 91,9/ de la zona anterior recibió una dosis igual o mayor a 5 Gy), con una máxima de 6 ± 2 Gy. Estos valores corresponden a un animal que presentó una mucositis grado 5, aunque solamente 67/ de los animales de este grupo sufrieron radiotoxicidad severa. Además, las bolsas pudieron ser expuestas a una segunda irradiación, indicando que la pérdida de tejido fue menor a los experimentos descritos anteriormente (esta sección ítems IV y V). En cuanto a la región media-posterior, esta exhibió efectos radiotóxicos leves, siendo la dosis media (para este ejemplo) 4 ± 2 Gy, con una máxima de 5 ± 2 Gy (un 61,9/ de la región estuvo expuesta a dosis iguales o mayores a 4 Gy). (Tabla 41)

En cuanto al animal analizado del protocolo D(GB-10+BPA)-BNCT que exhibió grado 5, la zona anterior de la bolsa recibió una dosis media de 6 ± 3 Gy (un 73,1/ de la zona anterior recibió una dosis igual o mayor a 6 Gy), con una máxima de 7 ± 3 Gy. Estos valores corresponden a un animal que presentó una mucositis grado 5 pero cabe recalcar que solo un 33/ de los animales de este grupo sufrieron radiotoxicidad severa. Además, las bolsas pudieron ser expuestas a una segunda irradiación, indicando que la pérdida de tejido fue menor a los experimentos descritos anteriormente (esta sección ítems IV y V). En cuanto a la región media-posterior, esta exhibió efectos radiotóxicos leves, siendo la dosis media 5 ± 2 Gy, con una máxima de 6 ± 3 Gy. En este caso, el porcentaje de bolsa que pudo haber sufrido una dosis mayor o igual a 5 Gy resultó ser 58,2/ . (Tabla 42)

Por último, se analizó también retrospectivamente a un animal del protocolo D(GB-10+BPA)-BNCT que exhibió grado 2 (Tabla 43). La zona anterior de la bolsa recibió una dosis media de 6 ± 2 Gy (un 9,6% de la zona anterior recibió una dosis igual o mayor a 6 Gy), con una máxima de 7 ± 3 Gy. En cuanto a la región media-posterior, la dosis media fue de 4 ± 2 Gy con una máxima de 6 ± 3 Gy. En este caso, el porcentaje de bolsa que pudo haber sufrido una dosis mayor o igual a 5 Gy fue de 21,9%.

Tabla 41. Análisis por regiones para DBPA-BNCT (grado 5): Porcentaje del volumen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volumen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima en las regiones: **(A)** Anterior; **(B)** Media-posterior.

(A) Región anterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volumen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	100%	91,9%	0,01%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Volúmen de bolsa irradiada	5%	25%	50%	75%	95%		
Dosis mínima recibida por un volumen (Vx) de bolsa irradiada	5,7 Gy	5,5 Gy	5,3 Gy	5,2 Gy	5,0 Gy		

Dosis total (Gy) (Región anterior)	Dosis boro (Gy) (Región anterior)	Dosis no boro (Gy) (Región anterior)
Mínima	Mínima	Mínima
5 ± 2	$3,6\pm 0,8$	$1,0\pm 0,1$
Media	Media	Media
5 ± 2	$4,0\pm 0,9$	$1,4\pm 0,3$
Máxima	Máxima	Máxima
6 ± 2	4 ± 1	$1,6\pm 0,4$

(B) Región media-posterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volumen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	61,9%	4,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Volúmen de bolsa irradiada	5%	25%	50%	75%	95%		
Dosis mínima recibida por un volumen (Vx) de bolsa irradiada	5,0 Gy	4,8 Gy	4,4 Gy	3,7 Gy	2,4 Gy		

Dosis total (Gy) (Región media-post)	Dosis boro (Gy) (Región media-post)	Dosis no boro (Gy) (Región media-post)
Mínima	Mínima	Mínima
2,1±0,8	1,4±0,1	0,5±0,2
Media	Media	Media
4±2	3,0±0,7	1,1±0,3
Máxima	Máxima	Máxima
5±2	3,9±0,9	1,6±0,4

Tabla 42. Análisis por regiones para *D*(GB-10+BPA)-BNCT (grado 5): Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima en las regiones: **(A)** Anterior; **(B)** Media-posterior.

(A) Región anterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	100/	100/	73,1/	0,01/	0,0/	0,0/	0,0/
Volúmen de bolsa irradiada		5/	25/	50/	75/	95/	
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada		6,7 Gy	6,5 Gy	6,2 Gy	6,0 Gy	5,8 Gy	

Dosis total (Gy) (Región anterior)	Dosis boro (Gy) (Región anterior)	Dosis no boro (Gy) (Región anterior)
Mínima	Mínima	Mínima
5±2	4,9±0,1	0,4±0,1
Media	Media	Media
6±3	6±2	0,7±0,2
Máxima	Máxima	Máxima
7±3	6±2	0,8±0,2

(B) Región media-posterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	84,3/	58,2/	0,7/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada	5,9 Gy	5,6 Gy	5,3 Gy	4,6 Gy	3,7 Gy

Dosis total (Gy) (Región media-post)	Dosis boro (Gy) (Región media-post)	Dosis no boro (Gy) (Región media-post)
Mínima	Mínima	Mínima
3±1	2,4±0,1	0,27±0,08
Media	Media	Media
5±2	5±2	0,6±0,1
Máxima	Máxima	Máxima
6±3	6±2	0,7±0,2

Tabla 43. Análisis por regiones para D(GB-10+BPA)-BNCT (grado 2): Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que recibió al menos X Gy, dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada y valores de dosis media, máxima y mínima en las regiones: **(A)** Anterior; **(B)** Media-posterior.

(A) Región anterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	100/	100/	9,6/	0,01/	0,0/	0,0/	0,0/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada	6,1 Gy	5,9 Gy	5,7 Gy	5,5 Gy	5,4 Gy

Dosis total (Gy) (Región anterior)	Dosis boro (Gy) (Región anterior)	Dosis no boro (Gy) (Región anterior)
Mínima	Mínima	Mínima
5±2	4,6±0,1	0,5±0,1
Media	Media	Media
6±2	5±2	0,6±0,2
Máxima	Máxima	Máxima
7±3	6±2	0,6±0,2

(B) Región media-posterior

Dosis	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	8 Gy	9 Gy	10 Gy
Porcentaje del volúmen de bolsa irradiada que al menos recibió X Gy	58,4/	21,9/	0,01/	0,0/	0,0/	0,0/	0,0/

Volúmen de bolsa irradiada	5/	25/	50/	75/	95/
Dosis mínima recibida por un volúmen (Vx) de bolsa irradiada	5,5 Gy	5,0 Gy	4,3 Gy	3,7 Gy	2,6 Gy

Dosis total (Gy) (Región media-post)	Dosis boro (Gy) (Región media-post)	Dosis no boro (Gy) (Región media-post)
Mínima	Mínima	Mínima
2±1	2,0±0,1	0,25±0,07
Media	Media	Media
4±2	4±1	0,5±0,1
Máxima	Máxima	Máxima
6±3	5±2	0,5±0,2

Conclusión parcial

Se observó que el nuevo protocolo *DBNCT*, 5 Gy cada irradiación, 4 semanas de intervalo permitió una segunda irradiación e indujo una significativa inhibición del desarrollo tumoral en tejido con PMD. En particular, el protocolo *D(GB-10+BPA)-BNCT* indujo una inhibición del 100% en el desarrollo de tumores nuevos hasta los 2 meses post primera irradiación, no alcanzó el T50 ni T80 en todo el período de seguimiento de 8 meses, y permaneció con un 33% de animales con tumores nuevos versus 89% para el control hasta el último tiempo de seguimiento (8 meses). En el caso del protocolo *DBPA-BNCT*, 67% de los animales exhibió mucositis severa mientras que en el caso del protocolo *D(GB-10+BPA)-BNCT* solamente el 33% de los animales exhibió mucositis severa.

DISCUSIÓN

Breve recapitulación del trabajo realizado

Las dificultades de la remoción quirúrgica completa en los casos avanzados de carcinomas de células escamosas de mucosa bucal y la complejidad del manejo terapéutico del campo cancerizado aumentan la probabilidad de recidivas y/o el desarrollo de segundos tumores primarios, reduciendo el tiempo de supervivencia del paciente (por ejemplo, Kankaanranta et al., 2007). Asimismo, la falta de selectividad de daño de la quimioterapia y la radioterapia como terapias antineoplásicas, hace que resulte interesante evaluar la efectividad terapéutica del BNCT sobre la cancerización de campo. Por otra parte, dado que la radiotoxicidad en el tejido con cancerización de campo puede limitar la dosis que se puede administrar tanto a nivel clínico (ej. Kankaanranta et al., 2012) como a nivel experimental (ej. Kreimann et al., 2001b), resulta de gran importancia estudiar los niveles de toxicidad en el tejido cancerizado asociados a un determinado efecto terapéutico. En ese sentido, resulta esencial contar con un modelo adecuado de tumor y tejido con cancerización de campo.

Tal como se explicó anteriormente en la Introducción, la bolsa de la mejilla del hámster es uno de los modelos de cáncer bucal más aceptados mundialmente (Chen y Lin, 2010). Es un modelo de carcinogénesis química que recapitula el proceso que ocurre en la mucosa bucal humana (Vairaktaris et al., 2008), generando tumores rodeados por tejido con lesiones potencialmente malignas (PMD). Asimismo, el modelo resulta de utilidad para el estudio de la mucositis en tejido con PMD (Bowen et al., 2011), efecto radiotóxico que limita la dosis que se puede administrar a tumor. Nuestro grupo de trabajo propuso este modelo para estudios de control tumoral y potencial radiotoxicidad con BNCT (Kreimann et al., 2001a). Demostramos el éxito terapéutico de una *única* aplicación de BNCT mediado por BPA (borofenilalanina), GB-10 ($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) o (GB-10+BPA) en el tratamiento de tumores de la bolsa de la mejilla del hámster, sin radiotoxicidad en el tejido normal expuesto (Kreimann et al., 2001b; Trivillin et al., 2004, 2006; Pozzi et al., 2009). Estos estudios se realizaron en el modelo clásico de carcinogénesis (topicación con DMBA en aceite mineral, al 0,5% , 2 a 3 veces por semana, durante 12 semanas).

A pesar de los avances logrados en cuanto a la optimización de los protocolos de BNCT para el tratamiento de tumores generados en este modelo, nuestro desafío pendiente era lograr algún grado de inhibición del desarrollo tumoral a partir de tejido con cancerización de campo a *largo* plazo. Tal como explicamos más arriba, el tejido con lesiones potencialmente malignas (tejido con PMD) puede originar recidivas y/o segundos tumores primarios que son causa frecuente del fracaso terapéutico (Braakhuis et al., 2003; Kankaanranta et al., 2007). Asimismo, la mucositis radioinducida en el tejido cancerizado o tejido con PMD es potencialmente limitante de la dosis que se puede administrar al tumor (ej. Trivillin et al., 2006). Luego, nuestro laboratorio se propuso el desafío de controlar mediante BNCT el tejido con PMD resultante del protocolo clásico de carcinogénesis, en términos de inhibición del desarrollo tumoral. A pesar que los resultados fueron alentadores

a *corto* plazo (se observó un retraso de 1 semana en el desarrollo tumoral en los tratados con BNCT versus control) (Heber et al., 2007), resultaba evidente que el protocolo clásico de carcinogénesis era sumamente agresivo, no representando adecuadamente el fenómeno de cancerización de campo que se observa en la mucosa bucal humana y no permitiendo el seguimiento de los animales a *largo* plazo. Si bien el protocolo clásico de cancerización resultaba adecuado para estudiar el efecto de BNCT sobre los tumores, no resultaba adecuado para estudiar el potencial efecto inhibitorio de BNCT sobre el desarrollo de recidivas y/o segundos tumores primarios a partir de tejido con PMD, a *largo* plazo.

Luego, el objetivo general del presente trabajo fue *evaluar a largo plazo (8 meses) el potencial inhibitorio de distintos protocolos de BNCT sobre el desarrollo de recidivas y/o segundos tumores primarios a partir de un tejido con PMD y la potencial radiotoxicidad asociada. Para ello fue necesario desarrollar un protocolo de carcinogénesis que imite lo más ajustadamente posible el riesgo de transformación maligna de la mucosa bucal humana con cancerización de campo y permita un seguimiento de los animales a largo plazo (8 meses). Asimismo, se buscó analizar las variables radiobiológicas que pudieran condicionar la respuesta, sabiendo que el conocimiento de estas variables serviría para optimizar la técnica para el tratamiento integral del cáncer bucal.*

Comenzamos investigando diferentes protocolos de carcinogénesis, con el objetivo de encontrar aquel que permitiera el estudio del tejido con PMD a *largo* plazo (8 meses), que desarrollara tumores en la gran mayoría de los animales (90%) a *largo* plazo y que simulara más cercanamente lo que sucede en la boca humana durante el proceso de carcinogénesis. Encontramos que el protocolo de topicación con DMBA en aceite mineral (0,5%), 2 veces por semana, durante 6 semanas, permite un seguimiento a *largo* plazo, asegurando un desarrollo tumoral en el 93% de los animales a los 8 meses y presenta las mismas categorías histológicas observadas en el tejido con cancerización clásica (12 semanas de topicación), con una disminución de la síntesis de ADN asociado a la menor agresividad del protocolo.

El siguiente objetivo entonces fue realizar, en este modelo de tejido con PMD desarrollado para seguimiento a *largo* plazo, estudios de biodistribución utilizando aquellos compuestos borados [GB-10, BPA, (GB-10+BPA)] y protocolos de administración que resultaron efectivos cuando se los usó en BNCT para controlar los tumores desarrollados por el protocolo clásico de cancerización (Kreimann et al, 2001; Trivillin et al, 2004, 2006; Pozzi et al, 2009). Una vez que se corroboró que las concentraciones de boro alcanzadas con estos protocolos de compuestos borados en este modelo de tejido con PMD tenían potencial terapéutico, se realizaron estudios de inhibición del desarrollo tumoral y radiotoxicidad de una *única* aplicación de BNCT *in vivo* (4 Gy dosis total absorbida a tejido con PMD), en el reactor RA-6. A pesar que no existió una acumulación preferencial de boro en tejido con PMD versus el tejido normal, se observó claramente un efecto terapéutico promisorio con efectos radiotóxicos leves-moderados en tejido con PMD. En particular, este efecto se mantuvo hasta los 8 meses para los protocolos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT versus los grupos control (animales cancerizados, sham-irradiados), SHaz solo y SGB-10-BNCT. Los

grupos SHaz solo y SGB-10-BNCT solamente ejercieron un efecto inhibitorio transiente, temprano.

Con el propósito de mejorar la eficacia terapéutica de aquellos protocolos SBNCT (4 Gy, RA-6) que demostraron inhibir el desarrollo de recidivas y/o segundos tumores primarios a *largo* plazo [SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT], se realizó una *doble* aplicación de estos mismos protocolos de BNCT desfasada en 6 semanas, en el reactor RA-3. La *doble* aplicación de BNCT desfasada en el tiempo se propuso para mejorar el “targeting” de distintas poblaciones potencialmente malignas que podrían ser refractarias o parcialmente refractarias al tratamiento en el momento de la aplicación de BNCT, dando origen al desarrollo y crecimiento tumoral. Además, la aplicación *doble* de estos protocolos de BNCT sería potencialmente útil para el tratamiento de tumores, en particular los de gran tamaño, pero podría estar contraindicada debido a la potencial radiotoxicidad generada por esta *doble* aplicación en los tejidos limitantes de dosis expuestos, como el tejido con PMD. La *doble* aplicación de los protocolos BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT (DBNCT, 4 Gy cada irradiación, 6 semanas de intervalo, reactor RA-3) no excedió la radiotolerancia del tejido con PMD (tejido limitante de dosis) o de los tejidos normales; la mucositis en tejido con PMD post segunda irradiación no se vio exacerbada por la primera irradiación; redujo la síntesis de ADN en tejido con PMD a los 8 meses post tratamiento; e inhibió parcialmente el desarrollo de tumores nuevos en tejido con PMD.

Aunque el protocolo DBNCT (4 Gy cada irradiación, 6 semanas de intervalo, RA-3) inhibió parcialmente el desarrollo tumoral, sin costo adicional en términos de radiotoxicidad en tejido normal y tejidos dosis limitantes, intentamos mejorar estos resultados y contribuir al conocimiento de la radiobiología de BNCT en tejido con PMD probando nuevos protocolos, aumentando la dosis entregada en cada irradiación y/o variando el intervalo entre irradiaciones. Estos estudios se realizaron también en el reactor RA-3.

El acortamiento de 6 semanas a 2 semanas entre irradiaciones con dosis absorbida de 4 Gy a tejido con PMD en cada irradiación no empeoró la mucositis, sin embargo, no mejoró el efecto inhibitorio de las componentes de alto LET de la terapia. El aumentar la dosis al doble (8 Gy) para intentar mejorar este efecto inhibitorio, resultó en una mucositis severa, con pérdida de tejido. Es decir, el fraccionamiento de dosis disminuiría los efectos radiotóxicos en tejido con PMD, pero la reducción del intervalo entre irradiaciones podría empeorar el efecto terapéutico.

En cuanto al protocolo SBNCT (8 Gy), dados los efectos radiotóxicos severos en tejido con PMD y normal, no pudimos realizar una segunda irradiación. Sin embargo, continuamos analizando la inhibición tumoral en el tejido de bolsa remanente, observando una significativa inhibición en el desarrollo de recidivas y/o segundos tumores primarios a *largo* plazo. Los grupos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT, no alcanzaron el 50% de animales con tumores nuevos dentro del período de 8 meses de seguimiento, a diferencia del grupo SHaz solo, que alcanzó el 50% de animales con tumores nuevos a los dos meses. Además, SBPA-BNCT, ejerció un efecto inhibitorio del 100% que persistió hasta los 8 meses. Luego, observando que el tejido remanente de bolsa exhibió efectos radiotóxicos leves y presentó

una significativa inhibición en el desarrollo de recidivas y/o segundos tumores primarios, se realizó una simulación de dosis en la bolsa remanente utilizando el “Hamster Tool” (Farías et al., 2011). Esta herramienta nos permitió conocer qué dosis media podría haber recibido esta porción remanente de bolsa (porción media-posterior). Esta dosis media resultó ser de aproximadamente 6 Gy.

Sobre la base de los resultados anteriores, nos planteamos el objetivo de explorar el potencial inhibitorio y la radiotoxicidad de esta dosis media absorbida de 6 Gy a tejido con PMD, prescribiéndola al punto medio de la bolsa. Esta prueba piloto mostró efectos radiotóxicos severos para el protocolo ensayado, SBPA-BNCT, no pudiéndose realizar una segunda irradiación. Sin embargo, evaluamos la inhibición tumoral y radiotoxicidad en la porción de bolsa remanente. Observamos una tendencia importante a la inhibición del desarrollo de nuevos tumores en tejido con PMD, a *largo* plazo, con efectos radiotóxicos leves. Para conocer qué dosis media podría haber recibido esta porción remanente (media-posterior) realizamos una nueva simulación de dosis con el “Hamster Tool”, obteniendo una dosis media de aproximadamente 5 Gy.

Por último entonces, decidimos evaluar los protocolos BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT, prescribiendo una dosis media absorbida en toda la bolsa de 5 Gy, prescripción realizada utilizando el “Hamster Tool” y, si los efectos radiotóxicos lo permitieran, realizar una segunda irradiación ampliando el intervalo entre irradiaciones de 2 a 4 semanas, dado que demostramos que el intervalo de 2 semanas entre irradiaciones empeoraba la eficacia terapéutica de las componentes de alto LET de BNCT. A pesar que con estos protocolos algunos animales presentaron radiotoxicidad severa, el tejido remanente fue suficiente para evertir la bolsa y realizar una segunda irradiación a las 4 semanas post primera irradiación. Además, en particular, para el protocolo *D*(GB-10+BPA)-BNCT, el pequeño porcentaje de animales que sufrieron mucositis grado 5 fue menor que para el protocolo *DBPA*-BNCT. En cuanto al desarrollo tumoral, ambos protocolos inhibieron parcialmente el desarrollo de nuevos tumores en tejido con PMD. Para el protocolo *D*(GB-10+BPA)-BNCT, esta inhibición resultó del 100% durante 2 meses post primera irradiación y resultó significativa durante todo el resto del período de seguimiento, inclusive hasta los 8 meses post-tratamiento.

Discusión de los resultados

Modelo de tejido con PMD

Tal como se planteó anteriormente, se evaluaron diferentes protocolos de carcinogénesis, que variaban en cantidad de topicaciones con el carcinógeno DMBA. Demostramos una clara correlación entre el declinamiento del animal, desarrollo y tamaño tumoral, en función de la cantidad de topicaciones (a mayor cantidad de topicaciones, mayor agresividad del protocolo de cancerización). Los protocolos agresivos (como el protocolo de 12 semanas de topicación, es decir, 24 o 36 topicaciones en total) limitan los períodos de seguimiento a 1 mes (*corto* plazo), probablemente debido a los desórdenes hepáticos causados por el carcinógeno (Letchoumy et al., 2006), desórdenes digestivos

causados por el aceite mineral (Eveson 1981), así como también los desórdenes alimentarios que provoca la cantidad y tamaño de los tumores en la bolsa de la mejilla del animal. En cuanto al desarrollo tumoral, se encontraría relacionado con la duración a la exposición al DMBA (Kingsbury et al., 1997). Los protocolos de mayor agresividad llevan a un rápido desarrollo tumoral, con múltiples tumores por bolsa y de gran tamaño.

Los únicos dos protocolos que permitieron un seguimiento a *largo* plazo (8 meses) fueron el protocolo de 4 semanas de topicación (8 topicaciones en total) y de 6 semanas (12 topicaciones en total). Sin embargo, el protocolo de 4 semanas no garantizó el desarrollo tumoral en la mayoría de los animales a lo largo de los 8 meses. En cambio, el protocolo de 6 semanas garantizó el desarrollo en el 93% de los animales en el período de seguimiento, un hallazgo que puede ser interpretado como prueba de inducción de tejido con PMD, el prerrequisito.

Varios estudios apoyan la utilización del protocolo de 6 semanas como modelo de tejido con lesiones potencialmente malignas. Morris y Reiskin (1966), investigaron la respuesta de la mucosa de la mejilla del hámster a diferentes protocolos de carcinogénesis variando el tiempo de exposición al carcinógeno, para determinar cuál era la duración crítica necesaria para la inducción tumoral. Plantearon que la aplicación de DMBA 3 veces por semana durante 4 semanas (12 topicaciones en total) resultó en tumores en todos los animales cancerizados, a diferencia de la topicación durante menos de tres semanas que falla en la producción tumoral. Inclusive Salley, en el año 1957, ya había descrito parches blancos que asemejaban a las lesiones potencialmente malignas bucales humanas, como la leucoplasia, luego de 8 ó 9 aplicaciones del carcinógeno (Salley 1957). A su vez, Feng y Wang (2006) propusieron un modelo de precancer en la bolsa de la mejilla del hámster basado en la aplicación tópica de 0,5% de DMBA en acetona 3 veces por semana por 5 semanas, resultando en 15 aplicaciones. En ese estudio, analizaban efectos quimiopreventivos con un período de seguimiento de 3,5 meses. Analizando los cambios genéticos generados durante la cancerización, se reportó tetraploidía o cuasi-tetraploidía para la segunda semana de tratamiento con DMBA (Lin et al., 1994). También Raimondi et al. (2005) demostraron cambios de ploidía en un campo cancerizado, aun antes de la manifestación microscópica de algún cambio morfológico en este modelo de cáncer bucal en hámster. Kingsbury et al. (1996) también reportaron que la exposición a DMBA en acetona por 6 semanas resulta en lesiones premalignas que si no son tratadas, evolucionan a lesiones malignas luego de un período de 30 semanas. En cuanto a la angiogenesis, ya a las 5 semanas, las células se tornan marcadamente angiogénicas (Lingen et al., 1997). Análisis histológicos de lesiones no invasivas, premalignas, incluyendo displasias y carcinomas *in situ* revelaron el “disparo” temprano de la angiogénesis, contribuyendo a la fase microscópica premaligna de la progresión neoplásica (Hananan y Weinberg 2011). Folkman et al. reportaron que el “switch” angiogénico (cambio de una fase avascular a una vascular), ocurre en los estados tempranos de la carcinogénesis aún en islotes hiperplásicos del páncreas, previo a la formación del tumor (Raica et al., 2009). Por último, estudios de vascularización realizados en lesiones normales, benignas, premalignas y malignas en el epitelio de la mejilla humana

también revelaron que la angiogenesis ocurre en lesiones premalignas y malignas (Jin et al., 1995).

En cuanto a los experimentos de síntesis de ADN, medida indirecta de la proliferación celular (en tumor y tejido con PMD) y ensayos de proliferación celular (en tumor), indicaron mayor actividad para el protocolo de carcinogénesis más agresivo -12 semanas- que para el protocolo evaluado menos agresivo -6 semanas-. Este resultado se encuentra en relación con la observación que los protocolos de mayor agresividad llevan a un rápido desarrollo tumoral, con múltiples tumores.

También analizamos la existencia de remisiones espontáneas, fenómeno raro pero establecido en esta enfermedad (Baker y Kramer, 2007). Observamos que disminuyen las regresiones cuanto mayor es el número de topicaciones. Este fenómeno de regresión podría ser explicado bajo las teorías SMT (Somatic Mutation Theory) y TOFT (Tissue Organization Field Theory), actualmente aceptadas y a la vez discutidas (Soto y Sonnenschein, 2011). La teoría SMT plantea que el cáncer se origina a partir de una mutación en una célula somática, seguida de sucesivas mutaciones. En cuanto a la teoría TOFT, plantea que el cáncer comienza a partir de defectos en la comunicación celular, generalmente, entre el parénquima (el tejido funcional donde comienzan la mayoría de los tumores), y el estroma (el tejido conectivo circundante) (Baker y Kramer 2007). Este defecto en la comunicación celular alteraría la expresión de genes que se encuentran inactivos normalmente, y que probablemente presentan mutaciones no reparadas dada su inactividad (las células no gastarían energía reparando ADN inactivo, con lo cual, este ADN inactivo acumularía mutaciones) (Baker y Kramer 2007). El microambiente engloba las interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular y el lecho vascular o nutricional, junto con el reclutamiento de células del sistema inmune así como la presencia de fibroblastos asociados a tumor (CAF). Los CAFs también pueden adquirir cambios genómicos o epigenómicos de la misma forma que las células epiteliales, afectando las células epiteliales vecinas y generando un microambiente anormal (Ge et al., 2010). Luego, el microambiente de estas lesiones focales resulta de gran importancia, dado que aparenta ser suficiente para llevar a la progresión tumoral (Laconi et al., 2008). Luego, podríamos explicar las regresiones en los protocolos menos agresivos considerando que un bajo número de topicaciones con DMBA presentará baja probabilidad de que ocurran mutaciones, tanto a nivel del epitelio como en las células del estroma (principalmente los CAFs), no permitiendo la progresión del tumor, ya sea por la probable extinción de aquellas pocas células que presentaban la mutación asociada al desarrollo tumoral (según la teoría SMT) y/o a la reconstitución de las comunicaciones intercelulares normales (según la teoría TOFT) (Baker y Kramer 2007) y/o la falla en la constitución del microambiente tumoral (Laconi et al., 2008).

El modelo de precancer bucal debía permitir el seguimiento de los animales a *largo* plazo, garantizar un desarrollo tumoral en aproximadamente el 90% de los animales y

simular, lo más posible, la cinética de aparición de segundos tumores primarios en la boca humana. En cuanto a esto último, la tendencia de aparición de tumores en el grupo control (cancerizados, sham-irradiados) muestra un aumento en función del tiempo hasta aproximadamente los 4 meses, que luego se desacelera y permanece constante. Una tendencia similar se reportó en pacientes seguidos durante 10 años. El riesgo de segundos tumores bucales/faríngeos aumentó significativamente a lo largo del período de seguimiento, pero tiende a disminuir con el tiempo (Chen et al., 2011).

La importancia de esta parte del trabajo no radicó en evaluar el amplio rango de marcadores que caracterizan al precancer y cáncer durante el proceso de carcinogénesis o los potenciales mecanismos involucrados en el proceso de transformación maligna. En relación a estos temas, se han realizado estudios altamente contributivos en diferentes estados del protocolo clásico de carcinogénesis de DMBA, que implica la aplicación de DMBA 3 veces por semana durante 12-16 semanas (por ejemplo: Hsue et al., 2008; Vairaktaris et al., 2008; Nagini et al., 2009). Sin embargo, faltaba información acerca del desarrollo tumoral y factibilidad de seguimiento a diferentes tiempos luego de completar los diferentes protocolos de carcinogénesis en la bolsa de la mejilla del hámster. El análisis comparativo de estos 5 protocolos de carcinogénesis para el mayor período de seguimiento reproducible mostró que 12 aplicaciones de DMBA en aceite mineral (protocolo de 6 semanas) son suficientes para garantizar la inducción reproducible de tejido con PMD que preserva el animal y la bolsa lo suficiente, tal que permite un seguimiento a *largo* plazo de 8 meses. Si los seguimientos intermedios fueran suficientes (3 meses) para un experimento dado, los protocolos de 7 y 8 semanas de topicación (14 y 16 topicaciones en total) podrían ser adecuados para evaluar tejidos con PMD más agresivos.

Estudios de biodistribución

Una vez desarrollado el modelo de precancer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster para estudios de *largo* plazo, continuamos estudiando la incorporación de los compuestos borados BPA, GB-10 y la combinación de ambos (GB-10+BPA). Para todas las biodistribuciones realizadas a lo largo de este trabajo, no se demostró una acumulación preferencial de boro en tejido con PMD versus tejido normal. Para el protocolo del compuesto borado GB-10, este resultado es consistente con su característica de compuesto difusivo (Heber et al., 2004; Garabalino et al., 2011). En cambio, para los protocolos BPA y (GB-10+BPA), este resultado no fue el esperado.

Como ya fue explicado en la Introducción, 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. 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). Luego, suponíamos que un tejido con cancerización de campo debería presentar una acumulación preferencial de boro frente a un tejido no cancerizado (normal).

Sin embargo, los resultados no reflejaron esta selectividad. A pesar de ello, se observó un significativo efecto terapéutico selectivo en términos de inhibición tumoral a *mediano* y *largo* plazo sin radiotoxicidad en tejido normal. En base a estos resultados, sugerimos la existencia de una acumulación preferencial de boro en focos con mayor probabilidad de transformación maligna dentro del tejido cancerizado, que no resulta detectable por los métodos convencionales de medición de boro (ICP-OES e ICP-MS) que brindan información solamente sobre el contenido global de boro en el tejido. Luego, en este contexto, los experimentos radiobiológicos serían una forma confiable de determinar el potencial terapéutico de los compuestos borados y protocolos de administración, además de plantearse la necesidad de utilizar otros métodos existentes de evaluación de la concentración y microdistribución del boro en el tejido con PMD (Wittig et al., 2008b; Altieri et al., 2008; Portu et al., 2011). Asimismo, otra variable que podría contribuir a un efecto diferencial de BNCT sobre tejido cancerizado versus tejido normal (a igual concentración media de boro) es la diferencia de radiosensibilidad entre estos dos tejidos. Esta diferencia de radiosensibilidad se traduciría en valores diferentes de CBE (Hopewell et al., 2011) para un determinado compuesto borado en ambos tejidos y podría redundar en efectos diferenciales tales como la severidad de la mucositis.

Estudios radiobiológicos

Comparación entre protocolos: GB-10-BNCT, BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT

En cuanto al efecto terapéutico y selectivo de los diferentes protocolos de BNCT mencionados en la tesis [GB-10-BNCT; BPA-BNCT; (GB-10+BPA)-BNCT], comenzaremos analizando el protocolo que involucró el compuesto borado GB-10: SGB-10-BNCT (4 Gy, RA-6), evaluado en el ítem II de la sección Resultados.

Como se explicó en la Introducción, el GB-10 es un compuesto borado difusivo (Laramore et al., 2001), no selectivo en cuanto a incorporación en células tumorales (Trivillin et al., 2006). Sin embargo, Trivillin et al. (2006) demostraron que los animales cancerizados con el protocolo clásico de cancerización (2 veces por semana, 12 semanas) tratados con BNCT mediado por GB-10, presentan una respuesta tumoral significativa y selectiva, sin daño a los tejidos circundantes. El análisis histológico de los tumores mostró, en el estroma de estos tumores, la presencia de hemorragia causada por la ruptura de las paredes de los vasos sanguíneos, congestión y edema. Este efecto no se observó en tejido con PMD que rodea al tumor ni en tejido normal. Luego, el daño a las células tumorales se debería, por lo menos parcialmente, a la isquemia producida debido al daño inducido por BNCT mediado por GB-10 en las células endoteliales. Los vasos sanguíneos aberrantes del tumor resultarían más radiosensibles que los del tejido con PMD y normal, debido a su estructura y función alteradas. Los vasos tumorales son tortuosos, se encuentran dilatados y sus paredes exhiben fenestraciones, discontinuidad del endotelio así como también discontinuidad o ausencia de la membrana basal (Carmeliet y Jain, 2000). Este fenómeno brindaría la posibilidad que un

compuesto borado que no se incorpora selectivamente a tumor, ejerza un efecto selectivo cuando se emplea como portador de boro en BNCT. Asimismo, los valores altos de GB-10 en sangre favorecerían este efecto (Trivillin et al., 2006).

En cuanto a los resultados expuestos en esta tesis, se observó que este protocolo presentó un efecto inhibitorio transiente a *mediano* plazo. Esta falta de acción terapéutica a *largo* plazo, podría deberse a que los vasos sanguíneos presentes en el tejido con PMD se encontrarían relativamente conservados a nivel estructural y funcional, a comparación de los vasos sanguíneos en tumor (Trivillin et al., 2006). Esta diferencia reduciría el valor de CBE (efectividad biológica del compuesto) del GB-10 en el tejido con PMD, comparado con el CBE del GB-10 en tejido tumoral.

En cuanto a los protocolos SBPA-BNCT y S(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy, reactor RA-6), el efecto inhibitorio en el desarrollo de tumores nuevos se mantuvo hasta los 8 meses. Este resultado apoyó la utilización de estos dos protocolos, BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT, a lo largo de la tesis. Como dijimos anteriormente, no verificamos una acumulación preferencial de boro en tejido con PMD. Sin embargo, creemos que la acumulación preferencial de boro podría estar en aquellos focos celulares con potencialidad maligna, donde las células acumularían mayor cantidad de BPA que las células circundantes con menor potencialidad maligna (Detta y Cruickshank, 2009). En cuanto al compuesto GB-10 en el protocolo (GB-10+BPA)-BNCT, podría estar ejerciendo dos efectos: gracias a su capacidad difusiva, podría distribuirse de forma homogénea en diferentes subpoblaciones celulares, favoreciendo así el “targeting” homogéneo necesario para el efecto terapéutico (Heber et al., 2006). Asimismo, estaría afectando el proceso de angiogénesis temprano (Hanahan y Weinberg, 2011), afectando el desarrollo del microambiente tumoral. El “targeting” al microambiente de estas lesiones focales resulta de gran importancia, dado que aparenta ser suficiente para llevar a la progresión tumoral (Laconi et al., 2008). La angiogenesis precede la formación tumoral durante la carcinogénesis química, sugiriendo que la progresión tumoral depende del “switch” angiogénico (Raica et al., 2009). La combinación de la administración de diferentes compuestos borados con diferentes propiedades y mecanismos de incorporación complementaria podrían aumentar la eficacia terapéutica del BNCT (Ono et al., 1999; Trivillin et al., 2006; Heber et al., 2007).

Doble BNCT

A lo largo de la tesis, se persiguió el objetivo de mejorar el efecto inhibitorio de los protocolos BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT ya que no fue posible inhibir por completo el desarrollo de nuevos tumores a partir de tejido con PMD, indicando que algunos focos con potencialidad de transformación maligna “escaparon” de la terapia.

El cáncer de células escamosas de cabeza y cuello se describe, histológicamente, como altamente heterogéneo (Albers et al., 2012). Consiste de células cancerosas que pueden ser clasificadas y agrupadas en poblaciones con características de célula madre y tipos celulares más diferenciados. Esta heterogeneidad puede explicarse mediante la

exposición constante de la mucosa bucal a mutagenos, como por ejemplo aquellos que son producto del tabaco y/o del alcohol, resultando en cambios genéticos múltiples de diferentes grados en todo el tracto aero-digestivo. Cuando un área alcanza un cambio que no es reversible, se desarrolla un campo pre-neoplásico (Albers et al., 2012). El modelo de cáncer derivado de células madres postula la heterogeneidad de la tumorigenicidad en el volumen tumoral, donde solo ciertos fenotipos celulares son iniciadores tumorales, mientras que la mayoría de las células tumorales no son iniciadoras. Esto se debería a que la tasa de renovación en el epitelio bucal humano está estimada en aproximadamente 14-24 días. Por lo tanto, la mayoría de las células no sobreviven el tiempo suficiente como para acumular las alteraciones genéticas requeridas para la formación de un carcinoma bucal escamoso (meses a años). En cambio, las células madres somáticas residentes por *largo* plazo en el epitelio bucal, son las únicas susceptibles de acumular los cambios múltiples oncogénicos y ser capaces de originar carcinomas de células escamosas bucales (Chen y Lin 2010).

La cancerización de campo realizada mediante la topicación con DMBA recrea la exposición de la mucosa bucal humana a mutagenos, por ejemplo, producto del tabaco. Chen y Lin (2010) reportan el uso del modelo de la bolsa de la mejilla del hámster como potencial modelo de estudio de tumores originados por células madres presentes en el epitelio de la mucosa bucal.

Las células madres cancerosas generalmente se dividen lentamente o no se dividen, por lo tanto resultan resistentes a la quimioterapia y a la radioterapia (Albers et al., 2012). Consistente con esta observación, Ono et al. (1996) sugieren que el BPA no se acumularía en células tumorales que se encontraran en estado de quiescencia al momento de la terapia, dada su baja actividad metabólica, escapando entonces al tratamiento, y causando las recidivas post-terapia. A su vez, los fibroblastos presentes en el estroma, luego del tratamiento radiante, podrían inducir la transformación de las células epiteliales (Ge et al., 2010).

En base a todas estas observaciones, el fraccionamiento del BNCT desfasado en el tiempo podría permitir el “re-targeting” y destruir aquellas poblaciones con fenotipos tumorales que podrían haber sido refractarias o parcialmente refractarias al tratamiento en el momento de la primera aplicación de BNCT, y que darían origen al desarrollo y crecimiento tumoral (Ono et al., 1996).

DBNCT (4 Gy cada irradiación, 6 semanas de intervalo) versus DBNCT (4 Gy cada irradiación; 2 semanas de intervalo)

Nuestra primera experiencia con DBNCT (4 Gy cada irradiación, 6 semanas de intervalo, reactor RA-3) no demostró una ventaja significativa versus el SBNCT (4 Gy, reactor RA-6). Supusimos entonces que quizás el intervalo entre irradiaciones era demasiado grande, permitiendo la reparación del daño causado por las componentes de bajo LET de BNCT, y algo de reparación de daño de las componentes de alto LET, dando lugar a la repoblación de células tumorales y células madres cancerosas que pudieron haber sido refractarias al tratamiento. Luego, decidimos achicar el intervalo entre irradiaciones. Se

pensó en no acortar el intervalo a menos de 2 semanas para permitir la resolución de la mucositis originada por la primera aplicación de BNCT antes de realizar la segunda aplicación. El efecto inhibitorio no fue el esperado dado que, al acortar el intervalo de 6 semanas a 2 semanas, mejoró el efecto del protocolo *DHaz* solo respecto de los protocolos *DBNCT*. Para tratar de entender este efecto “contrario a la intuición” analizaremos a continuación las posibles variables involucradas.

La dosis entregada a los tejidos durante el BNCT consiste en los productos de la reacción $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ sumada a una concomitante e inevitable radiación inespecífica (rayos gamma, protones “recoil” resultantes de la interacción de neutrones rápidos con hidrógeno y protones de alto LET resultantes de la captura de neutrones térmicos en nitrógeno). La dosis inespecífica de fondo está relacionada directamente con la duración de la exposición en el reactor y es independiente de la concentración de boro en los tejidos (Barth et al., 2005). El protocolo *Haz* solo es el grupo control del efecto que ejerce esta radiación inespecífica sobre los tejidos tratados con BNCT y, para su evaluación, utilizamos la mayor fluencia de neutrones térmicos (o mayor tiempo de exposición) entregada en los protocolos de BNCT (esta corresponde al protocolo BPA-BNCT).

Como efecto radiotóxico asociado al BNCT, evaluamos la presencia de mucositis post-BNCT en el tejido con PMD tratado. Para ello, desarrollamos una escala macroscópica de 5 grados, adaptada de las escalas de Sonis et al. (2000) y López Castaño et al. (2005). En relación a ello, en el experimento *DBNCT* (4 Gy, 2 semanas de intervalo, reactor RA-3), los protocolos BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT, presentaron principalmente mucositis leve grado 2, debido a la presencia de erosiones y ulceraciones microscópicas, eritema y edema. En cambio, en el grupo *DHaz* solo, solo un 10% de los animales presentaron mucositis grado 1, caracterizado por la presencia de eritema y/o edema. La gran diferencia entre ambos grados radica en la presencia de erosiones y múltiples úlceras microscópicas que, a su vez, estarían asociadas a la respuesta inflamatoria en el tejido conectivo subepitelial.

Este efecto radiotóxico diferencial entre protocolos podría deberse a la componente boro de la dosis presente en los protocolos BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT. Como explicamos previamente en la Introducción, la componente boro es una componente de alto LET, que produce daños generalmente irreparables por la célula. Cuando la replicación del ADN se encuentra impedida, la reproducción y funciones normales de las células se encuentran inhibidas llevando a la muerte celular (Shih et al., 2003). Una vez que la proliferación y el reemplazo del epitelio se encuentran interrumpidos, las manifestaciones clínicas de la mucositis se presentan como eritema, ulceración o “parches” de pseudomembrana o pseudomembrana confluyente en el tejido irradiado (Shih et al., 2003). Esto podría explicar entonces la presencia de úlceras microscópicas correspondientes a los protocolos BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT versus el *Haz* solo.

En cuanto a las úlceras, estas han sido objeto de estudio en relación al desarrollo tumoral. La úlcera traumática crónica en la cavidad bucal es una lesión relativamente frecuente debido a traumatismos moderados, como por ejemplo, dientes fracturados o prótesis mal adaptadas (Pérez et al., 2005). La inflamación crónica ha emergido como una de

las características del cáncer que impacta en cualquiera de los estadios de la tumorigénesis (Multhoff y Radons, 2012). Se conoce que la inflamación podría llevar a la activación de lesiones premalignas (Pérez et al., 2005; Lewis y Pollard, 2006; Grivennikov et al., 2010). La asociación entre una inflamación persistente, como es el caso de este tipo de úlceras, y la carcinogénesis ha sido postulada para diferentes condiciones clínicas, como la colitis ulcerativa crónica (Biasco et al., 1990) así como también en condiciones experimentales, como el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster (Pérez et al., 2005). La cicatrización y la carcinogénesis presentan características biológicas en común, como la inducción de la neovascularización, inflamación, proliferación celular y síntesis de matriz extracelular. Sin embargo, la principal diferencia radica en la proliferación celular. En las heridas, las células proliferan para cicatrizar y dejan de hacerlo al finalizar la cicatrización a diferencia de lo que ocurre en los tumores malignos donde la proliferación se encuentra desregulada (Pérez et al., 2005).

Las terapias contra el cáncer, como ya mencionamos en la Introducción, pueden también desencadenar una respuesta inflamatoria causando trauma, necrosis y daño en el tejido, que podrían estimular la re-emergencia del tumor y la resistencia a la terapia (Grivennikov et al., 2010). Actualmente algunos investigadores incorporaron el concepto de “células cancerosas ocultas”, que consiste en células epiteliales con alteraciones a nivel ADN o ARN que no se detectan microscópicamente. Estas células, en el estado de cicatrización de una herida pueden ser estimuladas, llevando a las recidivas (Ge et al., 2010). En cuanto a la inflamación pro-tumoral, el microambiente inflamatorio podría aumentar las tasas de mutación, conjuntamente con el aumento en la proliferación de las células mutadas (Grivennikov et al., 2010). Las células inflamatorias actúan en concierto con las células tumorales, estromales y endoteliales para generar el microambiente tumoral (Raica et al., 2009). Se postula que las células inflamatorias estimularían la acumulación de ROS (especies reactivas del oxígeno) en las células epiteliales vecinas vía citoquinas como TNF- α (Grivennikov et al., 2010). El rol crítico del TNF- α en enfermedades inflamatorias crónicas se encuentra bien establecido, por ejemplo en la mucositis bucal post terapia (Sonis 2007; ver Sección Introducción, Ilustración 15) y su efecto como promotor tumoral (Lin y Karin, 2007) y angiogénico (Menakuru et al., 2008) ha sido demostrado.

Luego, en base a lo anteriormente explicado, suponemos que la aplicación doble de los protocolos de BNCT, con un intervalo (2 semanas) que no permite la resolución completa de la mucositis, que induce úlceras microscópicas y una infiltración inflamatoria crónica, podría promover el desarrollo tumoral en los protocolos BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT versus el protocolo DHaz solo.

“Single” BNCT

SBNCT 8 Gy

En base a los resultados anteriormente mencionados, para mejorar el efecto inhibitorio de la componente boro de los protocolos BPA-BNCT y (GB-10+BPA)-BNCT, decidimos aumentar la dosis y ampliar el intervalo entre irradiaciones. Aumentando la dosis

aumentaríamos el efecto terapéutico. En cuanto a la ampliación del intervalo, debería ser mayor a 2 semanas para evitar el posible efecto pro-tumoral de la inflamación crónica, pero a su vez menor a 6 semanas dado que suponemos que este intervalo resulta lo suficientemente amplio como para permitir la reparación del daño causado por las componentes de bajo y alto LET del BNCT, dando lugar a la repoblación tumoral.

La mucositis inducida por los protocolos SBNCT 4 Gy (reactor RA-6), DBNCT 4 Gy 6 y 2 semanas de intervalo (reactor RA-3) resultó leve-moderada (grado 1 y grado 2, con un animal con grado 3). Luego, decidimos entregar el doble de dosis a tejido con PMD (8 Gy). Esta irradiación resultó en una mucositis severa (grado 5), con un pico entre los 14 y 21 días, con pérdida ostensible de tejido. Este efecto no permitió una segunda irradiación. Un efecto parecido se observó en estudios en el modelo de mucositis inducida por radiación de bajo LET, en donde una única dosis de 40 Gy, provoca una mucositis ulcerativa en la bolsa de la mejilla del hámster. La mucositis clínicamente detectable, ocurrió generalmente en el día 6, con un pico de mucositis en los días 14-15 (Bowen et al., 2011). Si bien los valores de dosis de bajo LET no son comparables con los valores de dosis en BNCT (incluye componentes de dosis de alto LET), el valor de dosis de 40 Gy fracción única estaría por encima del valor de dosis de 8 Gy (dosis absorbida) corregida con los correspondientes valores estimados de RBE y CBE (Kreimann et al., 2001b).

Este resultado resaltaría la importancia del fraccionamiento del BNCT, tanto para el “re-targeting” de aquellas células refractarias a la primera irradiación como para evitar los posibles efectos radiotóxicos severos en tejido con PMD.

A pesar de este efecto radiotóxico considerable, la porción remanente de bolsa que recibió menor dosis (evaluado mediante la herramienta “Hamster Tool”) presentó una importante y significativa inhibición tumoral, frente al control y el protocolo SHaz solo, con una mucositis leve. Creemos que, en base a lo ya explicado anteriormente, estos resultados se deben al aumento de la dosis a 8 Gy prescrita a tejido con PMD.

D(GB-10+BPA)-BNCT, 5 Gy cada irradiación, 4 semanas de intervalo

El protocolo con mayor efectividad terapéutica, con niveles de radiotoxicidad leves en la mayoría de los animales cancerizados y normales tratados, corresponde a *D(GB-10+BPA)-BNCT* 5 Gy cada irradiación, con 4 semanas de intervalo entre irradiaciones.

Este mayor efecto terapéutico podría estar dado por una combinación de factores, ya descriptos anteriormente a lo largo de la discusión. La combinación de los compuestos borados BPA y GB-10 podría combinar el efecto de “targeting” celular de BPA-BNCT en las células metabólicamente activas y el “targeting” vascular de GB-10-BNCT (Trivillin et al., 2006). La combinación de compuestos con distintos mecanismos de incorporación favorecería el “targeting” homogéneo (Heber et al., 2006; Trivillin et al., 2006) de la zona a tratar, reduciendo la incidencia de áreas refractarias a la terapia. Se sumaría a estos efectos la acción del GB-10, que se distribuye de forma homogénea en diferentes subpoblaciones celulares y ejercería un efecto sobre el desarrollo del microambiente tumoral. A su vez, las

concentraciones de BPA en este protocolo de combinación de compuestos son menores versus la del protocolo BPA-BNCT, llevando a un menor desarrollo de mucositis. En cuanto a la dosis, una dosis total de 10 Gy versus 8 Gy, administradas de forma fraccionada (5 Gy cada irradiación versus 4 Gy cada irradiación), demostró mejor efecto inhibitorio aunque mayor mucositis. Sin embargo, cuando comparamos con SBNCT 8 Gy y 6 Gy, la mucositis fue menor, y fue posible realizar una segunda irradiación. Es decir, podemos entregar mayores dosis totales (es decir DBNCT 10 Gy versus SBNCT 8 Gy o 6 Gy) con menores efectos radiotóxicos cuando se entrega esta dosis en dos aplicaciones. En cuanto a los efectos pro-tumorales de una doble irradiación, suponemos que en este caso el aumento de la dosis entregada pudo favorecer el efecto inhibitorio de la terapia así como también la ampliación del intervalo entre irradiaciones, que permitiría que el proceso inflamatorio parcialmente disminuya antes de entregar la segunda dosis.

Tal como se describió en la Introducción, previamente Trivillin et al. (2006) demostraron que una única aplicación del protocolo (GB-10+BPA)-BNCT ejerció una respuesta tumoral del 93% (medida en función de las remisiones parciales y completas de los tumores evaluados), en el modelo clásico de cancerización, que solo permite un seguimiento de tumores y tejido con PMD a *corto* plazo (1 mes). La dosis absorbida administrada a tumor resultó 9 ± 3 Gy; a tejido con PMD: 5 ± 2 Gy; a tejido normal: 5 ± 2 Gy. En esta tesis demostramos que, este mismo protocolo (GB-10+BPA)-BNCT aplicado dos veces, con un intervalo de 4 semanas, aplicando 5 Gy en cada irradiación, inhibe significativamente el desarrollo a *largo* plazo de recidivas y/o segundos tumores primarios en el modelo de precancer bucal para seguimiento a largo plazo que recrea más cercanamente lo que sucede en la mucosa bucal humana. Luego, estos estudios podrían suponer una posible aplicación clínica de este protocolo, dado que indujo un significativo control tumoral y a su vez, inhibió el desarrollo de recidivas y/o segundos tumores primarios a partir del tejido con PMD, sin daño al tejido normal y sin exceder la radiotolerancia del tejido con PMD.

Doble BNCT y mucositis

Como ya fue explicado en la Introducción, en un escenario clínico, la mucositis bucal limita la dosis que puede ser administrada con BNCT para los tumores de cabeza y cuello (Kankaanranta et al., 2007, 2012). Las complicaciones asociadas como dolor, infección, cambios en el gusto e imposibilidad de alimentación, limitarían la terapia. Estos mismos efectos describimos en esta tesis para el modelo de precancer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster. La dosis y su forma de administración limitan la terapia. La pérdida de tejido debido a una mucositis severa no permite una segunda irradiación y altera la recuperación del peso de aquellos animales expuestos a la terapia.

Dada la relevancia clínica del análisis de radiotoxicidad, realizamos una serie de experimentos preliminares que plantean el uso de la Imagenología Dinámica Infrarroja (DIRI) como método complementario de estudio de radiotoxicidad. Esta técnica resulta de gran utilidad dada su característica “no invasiva”, un aspecto sumamente importante en relación a las complicaciones asociadas a la mucositis, como el dolor en el área afectada.

A su vez, nos interesaba verificar histológicamente la mucositis analizada macroscópicamente. Los estudios histológicos preliminares descritos en esta tesis demostraron el correlato *macroscópico-microscópico* para los grados observados (grados 0, 1, 2, 3 y 5). Medeiros et al. (2011) publicaron descripciones macroscópicas e histológicas similares en la bolsa de la mejilla de hámsters tratados con 5-fluorouracilo.

Una observación interesante respecto a la aplicación doble del BNCT fue que la mucositis post segunda irradiación, en los protocolos de DBNCT, no se vio exacerbada por la primera irradiación. Este efecto podría parcialmente deberse a la reparación del daño subletal inducido mayormente por la componente de dosis de bajo LET del BNCT (Hopewell et al., 2011). A su vez, como ya fue explicado, los tejidos con células basales con alta proliferación son más sensibles a desarrollar mucositis al ser expuestos a una terapia radiante. Heber et al. (2007) demostraron la reducción en la síntesis de ADN luego de una primer irradiación con BNCT, en el protocolo clásico de cancerización en la bolsa de la mejilla del hámster (Heber et al., 2007). Luego, en base a lo anteriormente expuesto, esta reducción en la síntesis de ADN (medición indirecta de la proliferación celular) podría hacer que el tejido con PMD expuesto a una primera aplicación de BNCT, sea menos o igualmente sensible a desarrollar mucositis en una segunda irradiación. Además, el intervalo entre las aplicaciones de BNCT podría permitir que el proceso inflamatorio parcialmente disminuya antes de entregar la segunda dosis, evitando la exacerbación de la mucositis.

En este marco, en estudios futuros se ampliarán los estudios de la aplicación de DIRI en relación a la mucositis así como también se ensayarán compuestos antiinflamatorios que intenten prevenir o reducir a un mínimo la respuesta inflamatoria. El objetivo sería poder aumentar la dosis total absorbida, para mejorar la inhibición tumoral sin efectos radiotóxicos severos y a su vez, minimizar los posibles efectos pro-tumorales de la inflamación crónica.

Análisis computacional de dosis

Dada la necesidad de conocer qué dosis media habría recibido la bolsa irradiada en los protocolos SBNCT 8 Gy y 6 Gy, qué dosis podría haber provocado la pérdida de tejido y, en las porciones remanentes, qué dosis indujo una significativa inhibición tumoral, se planteó la necesidad de utilizar la herramienta computacional "Hamster Tool" (Farías et al., 2011). A su vez, esta herramienta también fue utilizada para calcular qué tiempo de irradiación debería recibir una bolsa a la cual se quiere prescribir una determinada dosis media en toda la bolsa (protocolo DBNCT, 5 Gy cada irradiación, 4 semanas de intervalo entre irradiaciones).

Esta herramienta nos permitió conocer las diferentes dosis recibidas en los sectores de bolsa de interés y la inhomogeneidad de dosis que existe a lo largo de la bolsa pegada sobre el trampolín. Esta herramienta todavía no resulta suficiente para correlacionar volumen de bolsa que presentó determinada dosis y la respuesta biológica en términos de inhibición tumoral y mucositis. Esto se debe a la alta inhomogeneidad de dosis absorbida en el volumen (reportado en los resultados, aproximadamente un 65-70%) y el número acotado

de casos analizados hasta el momento. Sin embargo, los resultados muestran tendencias de dosis versus inhibición tumoral y mucositis que seguramente podrán ser corroboradas con un mayor número de casos, en experimentos futuros.

CONCLUSIÓN GENERAL

Estos estudios proveen, por primera vez, evidencia experimental que BNCT induce un marcado efecto inhibitorio a largo plazo en el desarrollo tumoral en tejido con PMD. Este hallazgo tiene gran relevancia clínica en cuanto a que demuestra la posibilidad de prevenir mediante BNCT las recidivas y segundos tumores primarios que pueden contribuir al fracaso terapéutico en el cáncer de cabeza y cuello. Se observó que los niveles de dosis, el fraccionamiento de dosis, el intervalo entre irradiaciones y la elección de los compuestos borados son esenciales en la ventaja terapéutica del BNCT. Reportamos que el protocolo D(GB-10+BPA)-BNCT a 10 Gy dosis total absorbida (4 semanas de intervalo) presentó la mayor ventaja terapéutica, asociada a una mucositis leve en la mayoría de los casos.

El presente estudio determinó condiciones de tratamiento que podrían contribuir a optimizar el BNCT como tratamiento integral del cáncer bucal, teniendo en cuenta el precancer. Se podría considerar su evaluación cautelosa en un escenario clínico. Además, se plantea la necesidad de probar compuestos antiinflamatorios que inhiban o reduzcan la mucositis inducida por estos protocolos, para alcanzar mejores efectos terapéuticos.

ANEXO 1 - IMAGENOLOGÍA DINÁMICA INFRARROJA

Estudios complementarios para evaluar radiotoxicidad

Breve resumen

Dada la importancia clínica de estudiar y evaluar la mucositis, efecto radiotóxico post BNCT que condiciona la calidad de vida del animal y la aplicabilidad de la terapia, se evaluó la potencial utilización de la técnica de Imagenología Dinámica Infrarroja [Dynamic Infrared Imaging (DIRI)], también llamada Termografía Infrarroja Dinámica, como método complementario al seguimiento macroscópico de la mucositis en los animales tratados.

Introducción

William Herschel fue el primero en descubrir en el 1800 la componente infrarroja de la radiación solar, mediante la medición del aumento de la temperatura de la zona adyacente al extremo rojo del espectro descompuesto por un prisma, en la región donde no se observaba iluminación alguna (Diakides y Bronzino, 2008).

Hoy día se sabe que todos los objetos del universo con temperaturas por encima del cero absoluto emiten radiación en la región del infrarrojo como función de su temperatura. Cuando un objeto se calienta, la radiación infrarroja resulta más intensa y su distribución espectral se modifica. El ojo humano no puede ver los rayos infrarrojos, sin embargo éstos pueden ser detectados utilizando, por ejemplo, una cámara infrarroja. Desde los años 60 y asociada al desarrollo de tecnología en detectores infrarrojos, la tele-termografía (o medición de temperatura a distancia, sin contacto) utiliza la emisión de radiación infrarroja para medir y mapear la temperatura de los objetos (Diakides y Bronzino, 2008).

En medicina, y a partir de la medición de la radiación infrarroja emitida por la piel, se puede extraer información acerca de la circulación de la sangre, del mal funcionamiento de las glándulas sudoríparas, y de procesos tales como la inflamación o cicatrización. Originalmente, se la utilizó para la detección del cáncer de mama (año 1960). Posteriormente se reportó su utilidad clínica en otras enfermedades neuro-músculo-esqueléticas, vasculares, oncológicas y reumatológicas (Diakides y Bronzino, 2008).

En la actualidad, la imagenología infrarroja se utiliza como método complementario en oncología (cáncer de mama, piel, etc.), desórdenes vasculares (diabetes, trombosis, etc.), en el estudio del dolor, cirugía, viabilidad tisular, monitoreo de drogas o terapias y desórdenes respiratorios. La importancia de esta técnica surge de su potencial de diagnóstico no invasivo *in vivo*, sin la necesidad de tomar y analizar muestras. Otra ventaja de la termografía radica en que la información puede obtenerse en tiempo real y, además de no involucrar radiación ionizante, es segura y puede ser utilizada cuantas veces sea necesaria sin poner en riesgo al paciente (Diakides y Bronzino, 2008).

La termografía médica infrarroja se basa en la derivación del patrón espacio-temporal de temperatura asociado a la radiancia infrarroja emitida por el tejido en estudio. La distribución de temperatura no solo depende de parámetros físicos, sino también de la

fisiología asociada a los procesos homeostáticos, metabólicos y a la estructura y dinámica vascular, tisular y nerviosa. Es afectada por factores internos y externos y, en el caso de la piel, su evolución espacio-temporal es la manifestación del sistema termorregulador humano en el intento de preservar la temperatura corporal, controlando las tasas de producción y pérdida de calor (Santa Cruz et al., 2009). La termografía infrarroja provee un mapa térmico de la superficie de la piel, midiendo el calor radiante emitido. Regiones de vascularización anormales se detectan como puntos “calientes” en los casos de procesos de alto metabolismo o como puntos “fríos” en regiones donde la vascularización se encuentra afectada o existe necrosis. Las propiedades térmicas de los tejidos difieren significativamente dependiendo de la vascularización, estructura, composición y contenido de agua, entre otros (Diakides y Bronzino, 2008).

Algunos métodos de diagnóstico por termografía se basan en el uso de “tests de provocación”, donde se evalúa la respuesta térmica de la piel en función del tiempo, luego de la inmersión en agua fría o caliente, o la exposición a algún otro estímulo (corrientes de aire frío) que altere el flujo de la sangre en la piel. Bajo estas condiciones, las anomalías en el flujo de sangre debido a alguno de los desórdenes ya mencionados se hacen aún más notorias e incluso procesos asociados a la humedad superficial se ponen de manifiesto (Diakides y Bronzino, 2008).

Antes de aplicar la técnica, como norma general, el cuerpo del paciente debe encontrarse en equilibrio térmico (equilibrio normostático) con el ambiente que lo rodea, un ambiente controlado a una temperatura de aproximadamente 22°C. Para evaluar la temperatura superficial, las longitudes de onda (dependientes de la temperatura) de la superficie en evaluación deben encontrarse en el rango de detección de la cámara infrarroja. Además, la cámara debe ser calibrada con una fuente de referencia de temperatura conocida para estandarizar los datos clínicos y obtener lecturas radiométricas (Diakides y Bronzino, 2008).

La emisividad de la superficie a observar, por ejemplo en el caso de la piel, es un parámetro fundamental para convertir la radiancia infrarroja colectada en temperatura. Es una medida de cuan bien emite la superficie de un cuerpo, comparada con la correspondiente emisión de un cuerpo negro. Un cuerpo negro se define como un objeto con una emisividad de 1,0 (emisor perfecto). El conocimiento de la emisividad es importante cuando se evalúa la temperatura de la piel con un detector infrarrojo, ya que la reflexión de la radiación ambiente por la superficie altera la conversión a la temperatura deseada y su contribución depende de la temperatura de la radiación ambiente y del coeficiente de reflectividad de la superficie. Hardy demostró que la piel humana se comporta casi como un cuerpo negro perfecto, con una emisividad entre 0,95 y 0,98, aunque cabe recalcar que esta emisividad no se encuentra uniformemente distribuida. La modificación de la reflectividad por la aplicación de sustancias sobre la piel puede modificar la temperatura derivada de la radiación recibida. Si existen fuentes de calor a altas temperaturas (lámparas incandescentes), y si bien la reflectividad de la piel normal es baja (0,02–0,05), dichas fuentes de calor pueden contribuir con una cantidad de radiación reflejada que si no es

correctamente evaluada invalida el dato de temperatura registrado. Por esta razón la sala debe ser diseñada de manera de no poseer fuentes de calor (tubos de calefacción cercanos al paciente, por ejemplo) ni iluminación incandescente (Diakides y Bronzino, 2008).

Actualmente, la imagenología infrarroja es un complemento de primera línea a la examinación clínica y los métodos actuales de imágenes, a nivel mundial. La utilización de esta técnica para detectar, por ejemplo, un tumor de mama, se basa en el principio de que la actividad metabólica, vascular y los procesos inflamatorios en el tejido que rodea al tumor, son usualmente mayores que en el tejido normal. Este proceso resulta en variaciones regionales que usualmente son detectadas por imagenología infrarroja (Diakides y Bronzino, 2008). Una imagen típica infrarroja de un tumor de mama revela un aumento de la temperatura de la piel en 1-2°C en la periferia del tumor y lesiones de alta tasa de crecimiento e identifica un pronóstico poco favorable cuando los estudios termográficos son utilizados en conjunto con examinaciones físicas y radiológicas convencionales (Song et al., 2007). La arquitectura del tumor y los procesos angiogénicos involucrados determinan una situación diferente a la del tejido normal. La inflamación, la tasa metabólica, la hipertensión intersticial, la morfología anormal de los vasos y la falta de respuesta a señales homeostáticas son algunas de las diferencias que hacen que los tumores se comporten de manera diferente al tejido normal en términos de producción de calor y disipación. (Santa Cruz et al., 2009)

La aplicación de la termografía infrarroja a otros tumores, como el melanoma maligno, fue descrito por el grupo italiano de Di Carlo en el año 1995. Emplearon un parche frío sobre el área afectada (un estímulo frío) para aumentar el contraste térmico entre la piel normal y el tumor estudiado (Di Carlo, 1995).

El grupo argentino del Dr. Santa Cruz, en el año 2009, publicó resultados preliminares que nuevamente apoyarían a la técnica como posible herramienta no invasiva y sensible para estudiar la toxicidad en piel y control tumoral del BNCT en tratamientos de melanoma. En contraste con la radioterapia convencional, las dosis en BNCT, tanto en el caso de melanomas malignos como en otras patologías, se caracteriza por poseer un alto grado de no uniformidad en la piel expuesta al tratamiento. Uno de los objetivos del trabajo consistió en investigar mediante DIRI la correlación entre la extensión espacial de la reacción aguda en piel y la distribución de dosis, para mejorar la determinación de las dosis de tolerancia y optimizar el tratamiento. Trabajaron con 2 pacientes que presentaban melanoma maligno en sus extremidades, que fueron tratados en la facilidad de BNCT del reactor RA-6 (Centro Atómico Bariloche). Los pacientes fueron seguidos mediante inspección clínica, tomografía computada y ecografía con doppler. Los estudios fueron realizados antes del BNCT, semanalmente durante el primer mes post BNCT y luego mensualmente (Santa Cruz et al., 2009).

Previo al estudio con DIRI, el paciente se mantuvo en reposo durante un período de aclimatación de 15-20 minutos para que la región en estudio alcanzara un estado fisiológico estable aproximado de equilibrio térmico. Esto se realizó exponiendo el área a las condiciones ambientales. Luego de ese período, se llevó a cabo un estudio basal de 30

segundos para determinar la distribución inicial de temperatura. Luego se aplicó un estímulo frío (test de provocación) y se adquirió un video de 3 minutos o más. Este test de provocación induce un reflejo autónomo de vasoconstricción en las estructuras normales, aumentando entonces el contraste térmico debido a las diferencias entre las diferentes regiones de la piel. El eritema debido a la irradiación y los nódulos de melanoma presentaban una alta velocidad de recuperación de temperatura, a diferencia de la piel normal, no irradiada. Dado que resulta importante comparar la distribución de temperaturas basal versus post estímulo, la región a estudiar se inmovilizó y las características anatómicas (contorno, cicatrices, etc.) fueron utilizadas para co-registrar la imagen infrarroja con imágenes de fotografía visible. Se evaluó de esta forma la respuesta de la piel y de la temperatura del tumor a la terapia (Santa Cruz et al., 2009).

Además de la detección de nódulos superficiales, se observaron inhomogeneidades térmicas que fueron coincidentes con la localización de nódulos no palpables, que eran observables con tomografía computada y por eco-doppler. Entre la tercera y la sexta semana post-BNCT se observaron regiones difusas de alta tasa de recuperación de temperatura luego del estímulo frío, lo que concuerda con la manifestación clínica del eritema producto de la irradiación. La localización de la reacción eritematosa visible y las regiones infrarrojas resultaron consistentes con los cálculos dosimétricos 3D realizados (Santa Cruz et al., 2009). Estos resultados entonces no solo apoyan a la técnica DIRI como método complementario en la identificación de nódulos tumorales sino también en la detección de efectos radiotóxicos producto de la terapia BNCT.

Objetivo

El objetivo de este estudio consistió en evaluar las características termográficas de bolsas normales, no irradiadas, con mucositis grado 0, y bolsas cancerizadas expuestas a BNCT con mucositis grado 0, 1 y 2, para hallar una posible correlación entre las imágenes obtenidas por DIRI y los grados de mucositis mencionados.

Materiales y Métodos

La bolsa tratada se evirtió bajo anestesia, utilizando una pipeta de plástico (para evitar la influencia de la temperatura de la mano) (Ilustración 48) y, luego de un período de aclimatación de la bolsa expuesta al ambiente, se inició la adquisición. El video de radiancia infrarroja de la escena se observó y adquirió mediante una cámara infrarroja Raytheon PalmIR 250 (L3 Comm. Systems) durante 3 minutos (Ilustración 48). El estudio se divide en tres etapas:

- 1º) Basal (15 segundos);
- 2º) Provocación térmica (1 minuto);
- 3º) Recuperación (105 segundos).

La provocación térmica consiste en la aplicación de una corriente de aire a temperatura ambiente (con un secador de pelo), durante el cual se ejerce un efecto de enfriamiento moderado sobre el tejido (perturbación o provocación térmica). El objetivo de

dicha perturbación es observar los cambios producidos en la distribución de temperatura de la bolsa y la recuperación de la misma luego de la aplicación de dicho estrés (test de provocación).

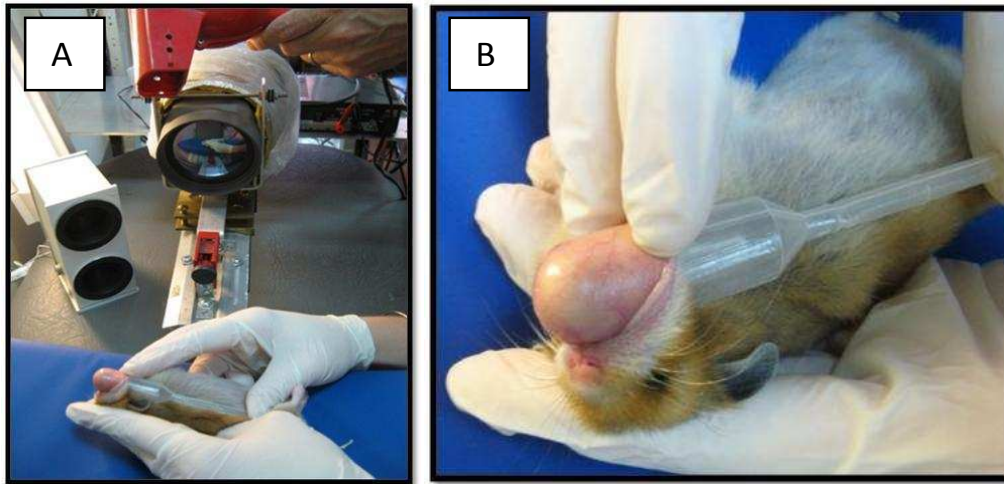
Para las conversiones de radiancia-temperatura se asumió una emisividad de 0,95. Este valor de emisividad es el que corresponde a los instrumentos de calibración utilizados y es típico de superficies tales como piel viva o papel.

La cámara Raytheon PalmIR 250 utilizada (modificada para realizar estudios biológicos y médicos) presenta una resolución efectiva en temperatura de 0,3°C y una resolución espacial máxima de aproximadamente 0,2 mm. Provee una señal de video norma NTSC (National Television System Committee) analógica útil para realizar estudios dependientes del tiempo. Esto permite la observación continua durante todo el procedimiento pudiéndose así monitorear la temperatura antes, durante y luego de la aplicación de la corriente de aire tal como se describió anteriormente. La señal de video es capturada por una tarjeta de adquisición y digitalizada, proveyendo un video de 29,97 marcos (o imágenes) por segundo, cada uno de 320 x 240 píxeles en 256 valores de gris (imágenes de 8 bits). Por lo tanto, para la conversión de niveles de gris en temperatura, es necesario contar además con adquisiciones de superficies a temperaturas conocidas y de emisividad similar a la de la superficie de interés.

Para la calibración en temperatura, se utilizó un cuerpo negro de doble cavidad. Una de las cavidades es eléctricamente calentada a temperaturas de aproximadamente 40°C y la otra cavidad se encuentra en equilibrio con la temperatura ambiente. El cuerpo negro fue calibrado con una exactitud de $\pm 1^\circ\text{C}$ contra una fuente de referencia (Fluke-Hart Scientific 4180/4181 Infrared Calibrator) con un termómetro de spot (Minolta IR-510). Además de estos dos puntos de calibración, se suelen agregar mediciones de superficies de alta emisividad a distintas temperaturas para añadir valores a la curva de calibración (por ejemplo la palma de la mano a temperaturas de aproximadamente 32°C o papel embebido en alcohol, a la temperatura de equilibrio de superficie húmeda, aproximadamente 15°C (procedimiento similar a la medición de humedad ambiente por psicrometría).

Durante el procedimiento, se mantuvieron controlados los parámetros de temperatura y humedad ambiente para poder asegurar las mismas condiciones experimentales para todos los estudios. Asimismo, se evitó la cercanía de la escena observada a fuentes de calor importantes para minimizar la cantidad de radiación infrarroja reflejada por el tejido, buscando que las lecturas provengan únicamente de la radiación infrarroja emitida.

Ilustración 48. (A) Disposición de la cámara infrarroja y secador frente al animal, con su bolsa evertida. También se muestra el cuerpo negro utilizado en la calibración; **(B)** Bolsa del hámster analizada por DIRI evertida con pipeta de plástico.



Se detallan los grupos experimentales evaluados:

Animales cancerizados, irradiados, con mucositis grado 0 | n=12

Animales cancerizados, irradiados, con mucositis grado 1 | n= 4

Animales cancerizados, irradiados, con mucositis grado 2 | n= 5

Animales normales, sin irradiar (mucositis grado 0) | n= 3

Los animales cancerizados evaluados se trataron con el protocolo *doble* BNCT 4 Gy a tejido con PMD en cada irradiación, 2 semanas de intervalo entre irradiaciones (ítem IV de las secciones Materiales y Métodos y Resultados).

Para la evaluación del grado de mucositis por imágenes infrarrojas, seleccionamos varios animales por grado de mucositis (0, 1, 2), sin importar el protocolo de DBNCT (4 Gy, 2 semanas) al que fueron expuestos. A su vez, también evaluamos el patrón infrarrojo de una mucositis grado 0 en un grupo de animales normales, sin irradiar.

Se estudiaron, como figuras de mérito, la *temperatura media* y la *heterogeneidad superficial de la temperatura de la bolsa*, en función del tiempo del experimento. La heterogeneidad de la temperatura, expresada como la desviación estándar relativa de la misma, fue calculada a partir de la determinación de la distribución de temperaturas de la región seleccionada de la bolsa, por animal, utilizando un programa de análisis de imágenes (ImageJ 1.43b, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Para ello se selecciona en el video una región de la bolsa de aproximadamente 1 cm², evitando los bordes de la misma correspondientes a zonas de la bolsa donde las lecturas no son radiométricas (es decir, ya sea por efectos de borde conocidos de la cámara utilizada o porque la normal a la

superficie no apunta en la dirección de observación). La medida de la heterogeneidad de temperatura, expresada como la desviación estándar relativa de temperatura en la superficie por animal, es calculada como el cociente de la desviación estándar (DS) y la temperatura media de la región. Esta evaluación se realiza sobre una imagen promedio de 30 marcos de video, correspondientes a una integración de tiempo de 1 segundo. Una vez calculada por animal, se elabora una media de esta medida por grupo experimental, en función del tiempo de evaluación. Las regiones de evaluación seleccionadas se estudian en intervalos de aproximadamente 3 segundos en donde los movimientos involuntarios causados por la persona que sostiene e inmoviliza al animal son mínimos. Se seleccionó un intervalo para la etapa basal, 3 intervalos durante el test de provocación y un intervalo para la etapa de recuperación.

Resultados

Se observó que, globalmente, la bolsa de la mejilla del hámster presenta temperaturas menores a la corporal y, en algunos casos, presenta temperaturas aún menores a la temperatura ambiente. Este último hallazgo solo puede explicarse por la evaporación superficial del agua, ya que no existe otro mecanismo biológico por el cual pueda disminuirse la temperatura de un tejido a valores menores que los ambientales (para nuestros estudios corresponde a valores por debajo de los 22-24°C).

En cuanto a la *heterogeneidad superficial de la temperatura*, la Ilustración 49 muestra la evolución de la desviación estándar relativa de los valores de temperatura (promedio de los valores de los animales correspondientes a cada grupo) en regiones seleccionadas de la bolsa versus tiempo. Las bolsas con mucositis grado 0 (animales normales no irradiados o cancerizados irradiados pero sin signos de radiotoxicidad) mostraron una distribución de temperatura muy homogénea (Ilustración 50A). Por el contrario, animales que desarrollaron toxicidad grado 1 y grado 2 (animales cancerizados irradiados) presentaron una distribución de temperatura heterogénea (Ilustración 50B y C, respectivamente). Durante el intervalo en el cual se aplica el test de provocación térmica, la diferencia de los valores promedio de desvío estándar entre los diferentes grados de mucositis se encuentra exacerbada, esto es: mayores grados de mucositis, mayor valor promedio de desvío estándar relativo (Ilustración 49).

Ilustración 49. Evolución del grado de heterogeneidad de la temperatura en función del tiempo (medido como la desviación estándar relativa de los valores de temperatura en la bolsa) para casos representativos de los diferentes grados de mucositis.

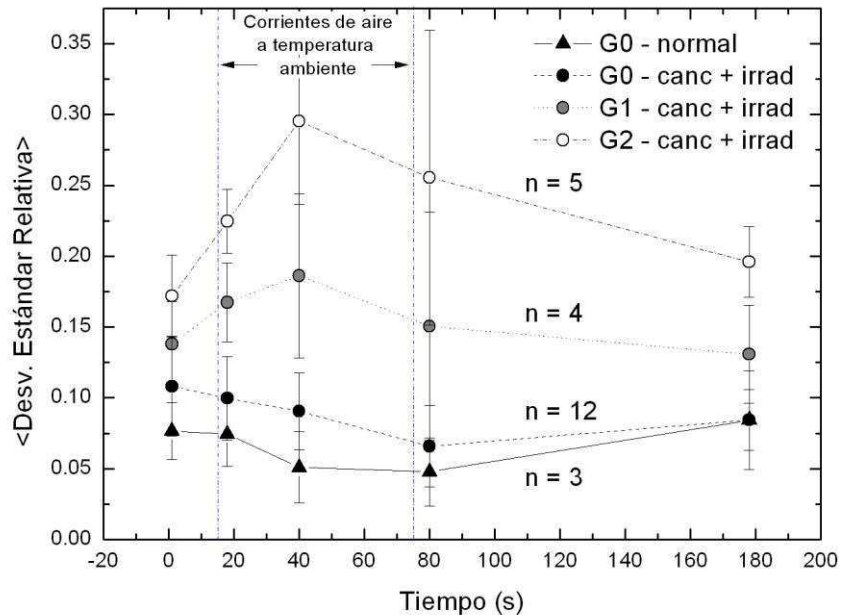
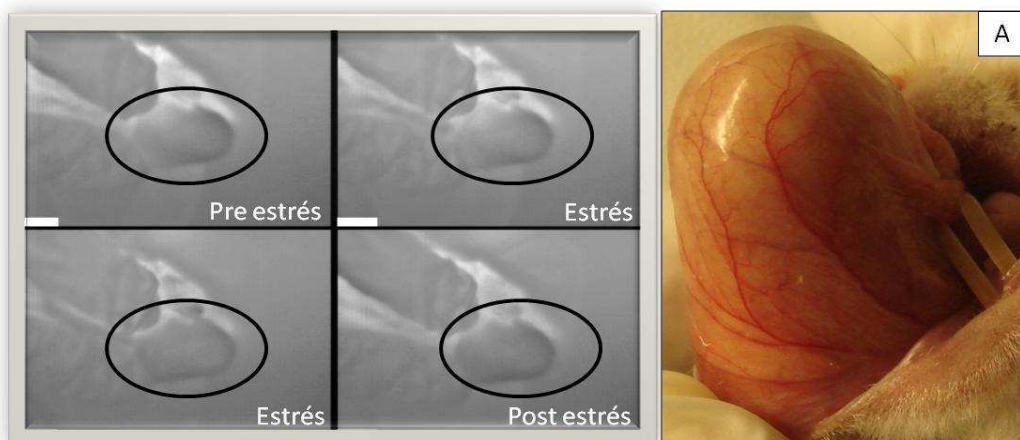
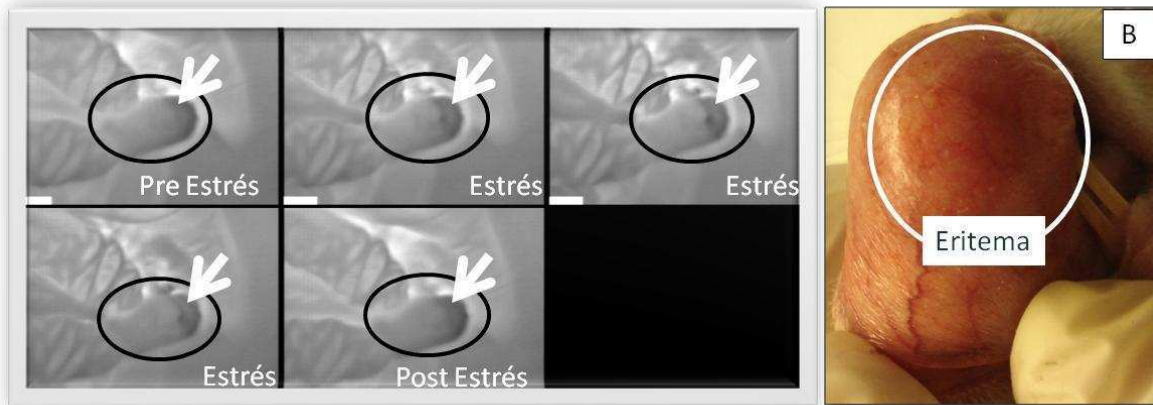


Ilustración 50. Ejemplos representativos de imágenes obtenidas por video de radiancia infrarroja, a diferentes tiempos (pre estrés, durante estrés y post estrés) para los diferentes grados de mucositis evaluados. Se observa que el aumento en la heterogeneidad de temperaturas (evaluada en niveles de grises) correlaciona con el aumento del grado de mucositis: **(A)** grado 0; **(B)** grado 1; **(C)** grado 2. La bolsa evaluada se marca con un círculo. En los paneles **(B)** y **(C)** las flechas en las imágenes infrarrojas indican la lesión resaltada en la foto.





Conclusión

La Imagenología Dinámica Infrarroja [Dynamic Infrared Imaging (DIRI)], en el contexto de la investigación biológica y médica, resulta una valiosa técnica no invasiva para la evaluación de las distribuciones de temperatura en tejidos superficiales vivos. Con esta técnica logramos describir cómo varía la distribución de temperaturas en función del grado de mucositis que presenta la bolsa de la mejilla del hamster. Se observó como las erosiones que caracterizan la mucositis grado 2 (lesiones posibles de presentar exudación de agua) expuestas al test de provocación, presentan un aumento de la evaporación de la exudación. Esto disminuye la temperatura en la lesión, aumentando la heterogeneidad de temperaturas en la región de la bolsa analizada, contrariamente a lo observado en las mucositis grados 0 y 1. La diferencia en la heterogeneidad de temperaturas entre los grados 0 y 1 se explicaría en base a la presencia de edema y eritema que caracterizan al grado 1, las cuales presentan menor temperatura que un tejido con grado 0, aunque mayor temperatura que las erosiones.

Podemos concluir entonces que DIRI resulta útil para clasificar el grado de las reacciones radiotóxicas que se encuentran asociadas al BNCT, resultando un método complementario muy útil a la examinación de radiotoxicidad a nivel macroscópico. Esta técnica podría ser utilizada como herramienta no invasiva, complementaria a otros procedimientos de diagnóstico y pronóstico.

ANEXO 2 – RESULTADOS

Datos correspondientes a las tablas y figuras presentados en la sección Resultados

II. Estudios *de* BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo desarrollado empleando una *única* aplicación de BNCT, utilizando una dosis total absorbida de 4 Gy.

Promedio de peso corporal y promedio del porcentaje de cambio de peso, con sus desvíos estándar

Tabla 44. Peso corporal promedio (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: SHaz solo; SBPA-BNCT; S(GB-10+BPA)-BNCT; SGB-10-BNCT (4 Gy, RA-6). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 4 Gy - RA-6	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-prom (gr.)	127,4	129,6	131,8	135,0	137,3	139,4	141,3	143,6	143,6	144,2	146,0	147,7	159,4	146,9	145,8	145,2	145,2
Desvío estándar	18,0	19,4	19,2	21,3	22,0	22,4	23,0	23,8	24,5	25,5	25,2	26,8	29,0	26,9	26,5	26,0	28,3
SHaz solo-prom (gr.)	109,1	107,9	109,7	109,8	113,2	115,0	115,0	115,9	116,2	117,2	118,1	118,3	117,8	116,8	118,4	115,6	116,6
Desvío estándar	9,8	9,4	8,5	6,1	5,8	7,6	6,7	6,3	7,4	6,1	6,0	5,9	5,9	5,4	6,5	6,7	7,1
SBPA-BNCT-prom (gr.)	98,6	100,6	102,8	107,2	108,9	111,3	112,9	114,8	115,7	116,9	118,7	120,5	120,8	123,4	121,6	119,8	122,0
Desvío estándar	7,7	6,4	5,9	5,2	5,6	6,1	6,2	5,4	5,7	5,7	7,0	5,7	5,9	6,0	4,9	4,6	4,0
S(GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	128,1	129,3	133,6	137,9	136,7	139,5	142,9	144,4	144,5	147,3	148,0	149,6	149,1	146,9	150,9	148,2	149,5
Desvío estándar	12,1	11,1	12,8	13,0	11,8	12,7	13,6	14,0	15,0	14,4	13,0	15,1	14,8	17,5	16,2	15,8	15,0
SGB-10-BNCT-prom (gr.)	116,3	117,6	122,9	127,3	130,0	129,1	132,2	135,9	136,3	136,7	138,8	135,4	140,0	138,9	137,2	135,7	135,0
Desvío estándar	17,9	16,9	15,1	15,5	17,8	16,1	16,7	18,7	19,0	19,1	19,8	19,0	21,7	22,4	24,1	22,8	22,2

SBNCT 4 Gy - RA-6	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-prom (gr.)	145,1	146,3	148,5	148,4	147,5	147,6	145,7	147,3	145,0	145,8	145,2	145,7	145,2	145,5	147,4	141,7
Desvío estándar	28,6	29,1	28,0	27,5	27,7	28,7	29,1	25,8	24,4	25,1	25,2	28,1	28,0	27,5	27,8	25,6
SHaz solo-prom (gr.)	116,5	116,2	113,8	116,3	115,9	116,8	118,0	118,3	122,5	120,6	121,4	124,7	123,0	123,3	122,8	124,4
Desvío estándar	7,7	7,3	5,3	7,0	6,1	6,5	6,7	8,2	3,1	3,6	4,8	5,2	3,9	5,0	4,3	4,2
SBPA-BNCT-prom (gr.)	124,3	121,1	119,7	121,0	118,8	119,4	120,4	120,3	124,1	124,0	123,4	125,2	123,6	123,8	124,0	124,9
Desvío estándar	8,3	6,7	7,4	8,8	9,7	9,9	8,1	8,6	2,4	2,7	3,0	3,2	3,3	2,7	3,5	3,0
S(GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	149,8	151,7	151,7	149,5	147,1	146,1	147,6	146,9	144,6	144,2	154,0	154,1	151,3	151,6	151,9	152,8
Desvío estándar	15,7	20,6	22,4	19,3	20,1	17,9	18,9	18,0	19,2	27,6	19,9	20,7	19,2	20,0	19,4	19,9
SGB-10-BNCT-prom (gr.)	136,1	129,2	127,4	127,1	126,3	125,4	125,3	127,6	120,0	119,2	118,7	118,6	119,3	120,2	119,6	115,5
Desvío estándar	21,9	19,5	20,5	18,8	18,1	16,8	16,4	16,8	15,5	14,3	14,0	13,9	13,8	14,4	14,0	13,8

Tabla 45. Promedio del porcentaje de cambio de peso corporal (✓) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: SHaz solo, SBPA-BNCT; S(GB-10+BPA)-BNCT; SGB-10-BNCT (4 Gy, RA-6). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 4 Gy - RA-6	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-✓ prom	100	102	104	106	108	110	111	113	113	114	115	117	112	116	117	116	114
Desvío estándar	0	6	7	8	8	9	9	10	10	11	11	13	14	13	13	14	15
SHaz solo-✓ prom	100	98	100	100	103	103	103	104	104	105	106	106	106	105	108	106	107
Desvío estándar	0	2	4	6	6	5	5	6	5	6	6	6	8	8	4	3	3
SBPA-BNCT-✓ prom	100	103	105	110	111	114	115	117	118	120	121	123	124	126	125	123	126
Desvío estándar	0	4	4	5	6	6	6	6	7	7	7	8	8	9	11	11	15
S(GB-10+BPA)-BNCT-✓ prom	100	99	102	106	105	106	108	110	110	112	112	114	113	112	115	113	114
Desvío estándar	0	2	4	4	4	4	6	6	7	7	5	7	7	10	8	8	8
SGB-10-BNCT-✓ prom	100	101	106	110	112	115	118	122	122	123	125	121	126	125	121	120	119
Desvío estándar	0	3	6	8	9	12	14	16	17	19	20	18	24	23	24	22	21

SBNCT 4 Gy - RA-6	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-/ prom	114	115	116	116	115	115	113	114	112	113	113	113	112	112	114	114
Desvío estándar	17	15	14	13	14	14	16	14	14	14	14	15	15	14	12	11
SHaz solo-/ prom	107	107	105	107	107	108	109	109	109	107	108	110	109	109	109	110
Desvío estándar	3	4	5	4	5	4	6	3	4	4	3	3	4	2	3	3
SBPA-BNCT-/ prom	128	121	119	121	118	119	120	120	123	123	122	124	122	123	123	124
Desvío estándar	20	12	12	13	13	14	12	12	11	11	10	10	10	9	8	9
S(GB-10+BPA)-BNCT-/ prom	114	117	117	115	113	113	114	113	110	109	115	115	113	113	113	114
Desvío estándar	8	9	10	8	8	7	8	7	7	14	8	9	8	9	8	8
SGB-10-BNCT-/ prom	120	113	111	111	110	110	109	111	107	107	106	106	107	108	107	104
Desvío estándar	21	16	16	15	14	14	12	13	16	16	16	17	16	17	18	19

Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron nuevos tumores respecto a T0

Tabla 46. Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron nuevos tumores en tejido con PMD para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: SHaz solo; SBPA-BNCT; S(GB-10+BPA)-BNCT; SGB-10-BNCT; (4 Gy, RA-6). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 4 Gy - RA-6	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control	7	17	27	43	53	57	62	64	68	74	76	78	79	81	82	81	85
SHaz solo	0	0	0	0	0	33	33	33	33	33	33	50	50	50	60	60	60
SBPA-BNCT	0	0	0	13	13	14	14	14	29	29	43	43	43	43	43	43	43
S(GB-10+BPA)-BNCT	0	0	0	11	11	13	25	25	38	38	38	50	50	50	50	50	38
SGB-10-BNCT	0	11	11	11	11	11	22	22	22	44	56	67	56	56	75	100	88

SBNCT 4 Gy - RA-6	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control	84	85	85	85	88	87	87	87	87	88	88	89	90	89	89	89
SHaz solo	60	60	60	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
SBPA-BNCT	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43	43
S(GB-10+BPA)-BNCT	38	38	38	38	38	38	38	38	38	43	43	43	43	43	43	43
SGB-10-BNCT	88	100	100	100	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88

III. Estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo desarrollado empleando *doble* aplicación de BNCT desfasada en el tiempo, con un intervalo de 6 semanas entre irradiaciones, 4 Gy en cada irradiación.

Promedio de pesos y promedio del porcentaje de cambio de peso, con sus desvíos estándar

Tabla 47. Peso corporal promedio (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: DHaz solo, DBPA-BNCT; D(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy, 6 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

DBNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-prom (gr.)	127,4	129,6	131,8	135,0	137,3	139,4	141,3	143,6	143,6	144,2	146,0	147,7	159,4	146,9	145,8	145,2	145,2
Desvío estándar	18,0	19,4	19,2	21,3	22,0	22,4	23,0	23,8	24,5	25,5	25,2	26,8	29,0	26,9	26,5	26,0	28,3
DHaz solo-prom (gr.)	143,7	145,7	153,7	152,9	155,5	154,9	156,0	154,4	154,3	156,1	156,7	158,3	158,7	159,1	160,7	158,3	158,9
Desvío estándar	17,2	18,7	25,7	19,9	19,3	20,0	20,0	20,4	20,2	21,2	18,8	18,5	22,9	23,5	24,1	22,6	22,0
DBPA-BNCT-prom (gr.)	134,1	138,4	137,2	140,4	141,2	146,2	143,4	144,4	145,3	147,4	145,9	147,0	147,6	147,7	144,4	147,9	146,1
Desvío estándar	16,2	20,3	22,2	22,9	23,1	26,4	24,6	26,2	28,7	28,3	28,5	30,0	29,6	28,1	27,4	30,1	26,7
D(GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	121,3	122,4	124,9	127,3	130,8	134,1	132,9	130,8	134,2	136,2	134,3	139,8	139,1	136,5	138,8	139,4	139,9
Desvío estándar	7,4	8,7	11,7	12,5	14,9	12,7	11,5	9,8	14,5	14,9	16,1	15,4	12,6	15,3	15,4	14,2	14,9

DBNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-prom (gr.)	145,1	146,3	148,5	148,4	147,5	147,6	145,7	147,3	145,0	145,8	145,2	145,7	145,2	145,5	147,4	141,7
Desvío estándar	28,6	29,1	28,0	27,5	27,7	28,7	29,1	25,8	24,4	25,1	25,2	28,1	28,0	27,5	27,8	25,6
DHaz solo-prom (gr.)	158,9	156,3	157,8	161,4	161,1	156,4	155,4	154,3	156,2	157,1	156,9	157,8	158,6	156,8	159,0	160,6
Desvío estándar	26,2	21,4	20,5	26,2	24,5	18,9	18,6	19,0	20,8	19,7	20,4	21,4	21,2	22,4	27,0	30,3
DBPA-BNCT-prom (gr.)	137,0	136,4	135,0	138,1	139,6	139,6	136,3	143,8	142,8	143,6	139,8	140,4	139,5	140,2	139,8	138,4
Desvío estándar	17,2	19,0	17,9	16,4	16,4	17,0	17,7	15,1	15,9	16,1	14,4	13,0	17,1	16,1	18,0	16,1
D(GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	141,4	140,7	140,3	142,3	143,9	142,0	141,9	140,8	141,8	141,6	140,9	140,8	143,6	143,0	142,6	141,6
Desvío estándar	13,0	14,8	8,7	14,4	13,6	13,7	14,8	15,4	17,1	16,0	15,2	16,7	16,1	16,5	26,6	15,7

Tabla 48. Promedio del porcentaje de cambio de peso corporal (/) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: *D*Haz solo; *DBPA*-BNCT; *D*(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy, 6 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

<i>DBNCT</i> 4 Gy (6 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-/ prom	100	102	104	106	108	110	111	113	113	114	115	117	112	116	117	116	114
Desvío estándar	0	6	7	8	8	9	9	10	10	11	11	13	14	13	13	14	15
<i>D</i> Haz solo-/ prom	100	101	107	106	108	108	108	107	107	109	109	110	110	111	112	110	110
Desvío estándar	0	2	10	4	5	4	4	5	4	5	5	4	6	7	6	6	5
<i>DBPA</i> -BNCT-/ prom	100	103	102	104	105	108	106	107	108	109	108	109	109	109	107	109	108
Desvío estándar	0	4	4	6	5	7	6	7	9	8	9	9	8	8	8	9	7
<i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT-/ prom	100	101	103	105	108	110	110	108	111	112	111	115	115	112	114	115	115
Desvío estándar	0	4	6	8	9	7	6	5	8	8	12	8	6	8	9	7	7

<i>DBNCT</i> 4 Gy (6 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-/ prom	114	115	116	116	115	115	113	114	112	113	113	113	112	112	114	114
Desvío estándar	17	15	14	13	14	14	16	14	14	14	14	15	15	14	12	11
<i>D</i> Haz solo-/ prom	110	109	110	111	111	108	107	107	108	109	108	109	110	108	111	112
Desvío estándar	7	7	5	7	7	7	6	7	8	7	7	8	7	9	8	10
<i>DBPA</i> -BNCT-/ prom	106	105	104	105	106	106	104	110	109	110	107	107	108	108	108	107
Desvío estándar	6	9	7	7	8	9	10	5	5	6	5	3	4	3	5	3
<i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT-/ prom	116	115	115	117	118	116	116	115	116	116	115	115	118	117	116	116
Desvío estándar	7	8	4	8	8	7	8	9	10	9	8	10	9	10	14	12

Tabla 49. Peso corporal promedio (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo normal (no cancerizados) expuestos a los diferentes protocolos experimentales: *D*Haz solo; *DBPA*-BNCT; *D*(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy, 6 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

DBNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Normal <i>D</i> Haz solo-prom (gr.)	132,7	132,0	138,8	143,7	146,2	150,8	150,7	152,1	156,8	158,6	158,4	157,5	160,0	158,6	161,0	161,0	161,2
Desvío estándar	13,6	2,5	6,8	11,2	11,2	13,2	11,9	12,1	11,8	10,7	13,5	13,7	10,5	11,2	12,1	11,2	9,4
Normal <i>DBPA</i> -BNCT-prom (gr.)	129,9	129,2	139,6	144,6	136,2	147,7	148,8	149,5	153,6	155,1	157,6	153,7	154,6	153,2	154,7	155,6	153,2
Desvío estándar	18,3	11,3	16,2	18,3	8,4	15,9	18,2	22,0	21,4	17,8	17,3	18,4	18,2	11,2	14,9	17,8	17,5
Normal <i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	119,7	119,9	129,6	138,6	139,1	142,4	141,2	142,3	145,4	146,8	145,6	144,9	145,3	145,3	148,0	147,7	148,2
Desvío estándar	26,9	21,8	22,8	24,1	21,2	22,2	23,7	24,9	23,9	23,7	25,0	23,8	21,6	20,4	20,1	21,2	21,2

DBNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Normal <i>D</i> Haz solo-prom (gr.)	159,1	160,0	164,0	165,6	165,8	168,5	169,5	169,0	169,6	169,7	167,4	171,6	171,8	175,4	175,2	174,0
Desvío estándar	12,1	10,2	12,0	14,2	9,7	11,2	9,6	8,1	11,8	9,3	10,7	7,9	8,1	10,9	8,2	10,6
Normal <i>DBPA</i> -BNCT-prom (gr.)	153,0	152,3	157,8	145,4	146,2	148,1	148,1	150,9	150,1	148,5	149,8	149,9	155,0	154,9	154,3	153,2
Desvío estándar	18,8	22,3	24,7	5,7	11,6	8,6	9,3	12,5	9,3	12,9	7,8	10,1	12,1	6,5	9,5	7,1
Normal <i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	144,9	147,0	150,4	149,5	150,1	151,5	151,6	151,5	152,3	150,9	152,7	152,4	154,3	156,4	156,5	156,5
Desvío estándar	22,0	22,7	24,9	24,4	22,6	23,9	24,4	24,6	27,2	25,6	25,8	25,5	28,0	29,9	29,5	31,0

Radiotoxicidad

Tabla 50. Grados de mucositis por animal cancerizado, por protocolo, a tiempos representativos: A) DHaz solo; B) DBPA-BNCT; C) D(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy cada irradiación, 6 semanas de intervalo, RA-3). (-) Indica animal no disponible (sacrificio o muerte). G0: grado 0; G1: grado 1; G2: grado 2; G3: grado 3; G4: grado 4; G5: grado 5.

A)

DHaz solo 4 Gy (6 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem	5 sem	2º irrad 6 sem	24 hs	7 sem	8 sem	32 sem
H5	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H6	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H9	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H16	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H17	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H18	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H19	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H28	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H29	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H30	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
nº animales total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5

B)

DBPA-BNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem	5 sem	2º irrad 6 sem	24 hs	7 sem	8 sem	32 sem
H1	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0
H2	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	-
H3	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0	-
H8	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	-
H11	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0
H12	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0
H13	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H21	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0	-
H22	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G1	-
H25	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	-
nº animales total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	3

C)

D(GB-10+BPA)-BNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem	5 sem	2º irrad 6 sem	24 hs	7 sem	8 sem	32 sem
H4	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0	-
H7	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0
H10	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0
H14	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0
H15	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H20	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H23	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	-
H24	G0	G1	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G1	-
H26	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0
H27	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	-
H31	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0
H32	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0	-
H33	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0	G0
nº animales total	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	8

Tabla 51. Grados de mucositis por animal normal, por protocolo, a tiempos representativos: A) DHaz solo; B) DBPA-BNCT; C) D(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy cada irradiación, 6 semanas de intervalo, RA-3). G0: grado 0; G1: grado 1; G2: grado 2; G3: grado 3; G4: grado 4; G5: grado 5.

A)

Normal DHaz solo 4 Gy (6 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs	1 sem	2 sem	3 sem	2º irrad 6 sem	24 hs	7 sem	8 sem	32 sem
H3	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H6	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H8	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
nº animales total	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

B)

Normal DBPA-BNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs	1 sem	2 sem	3 sem	2º irrad 6 sem	24 hs	7 sem	8 sem	32 sem
H1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H4	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0
H9	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
nº animales total	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

C)

Normal D(GB-10+BPA)-BNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs	1 sem	2 sem	3 sem	2º irrad 6 sem	24 hs	7 sem	8 sem	32 sem
H2	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H5	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H7	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H10	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0
nº animales total	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos (tumores que se desarrollaron post-T0)

Tabla 52. Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos en tejido con PMD para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: DHaz solo; DBPA-BNCT; D(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy, 6 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

DBNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control	7	17	27	43	53	57	62	64	68	74	76	78	79	81	82	81	85
DHaz solo	0	0	0	10	20	30	30	40	50	50	50	50	60	60	60	60	70
DBPA-BNCT	0	0	0	20	20	20	30	40	50	50	60	60	60	60	60	60	60
D(GB-10+BPA)-BNCT	0	0	0	15	38	38	38	15	23	31	31	31	46	46	46	54	69

DBNCT 4 Gy (6 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
CONTROL	84	85	85	85	88	87	87	87	87	88	88	89	90	89	89	89
<i>D</i> Haz solo	70	70	78	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	100
<i>DBPA</i> -BNCT	60	60	60	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67
<i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT	75	83	83	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	75	82	82

IV. Estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una *doble* aplicación de BNCT con un intervalo de 2 semanas entre irradiaciones, 4 Gy en cada irradiación, versus una *única* aplicación de BNCT a la misma dosis total absorbida (8 Gy).

Promedio de pesos corporales y promedio de porcentaje de cambio de peso, con sus desvíos estándar

DBNCT, 4 Gy cada irradiación, 2 semanas de intervalo

Tabla 53. Peso corporal promedio (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: DHaz solo; DBPA-BNCT; D(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy, 2 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

DBNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-prom (gr.)	127,4	129,6	131,8	135,0	137,3	139,4	141,3	143,6	143,6	144,2	146,0	147,7	159,4	146,9	145,8	145,2	145,2
Desvío estándar	18,0	19,4	19,2	21,3	22,0	22,4	23,0	23,8	24,5	25,5	25,2	26,8	29,0	26,9	26,5	26,0	28,3
DHaz solo-prom (gr.)	160,0	158,5	161,0	160,3	159,3	160,4	162,1	164,7	165,7	166,8	181,4	161,4	168,7	169,7	164,0	172,0	170,2
Desvío estándar	32,9	33,1	35,2	37,4	39,5	38,4	37,3	36,8	35,9	36,8	37,8	32,7	36,5	38,0	40,7	40,5	38,0
DBPA-BNCT-prom (gr.)	144,0	144,3	137,6	142,2	143,1	144,4	144,6	149,1	150,2	151,5	155,4	153,4	153,5	153,8	150,4	154,0	154,9
Desvío estándar	12,0	12,3	13,7	10,2	11,4	13,8	12,2	13,0	12,7	11,8	12,7	12,8	13,1	13,9	12,9	14,3	15,8
D(GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	143,8	142,6	139,6	141,1	141,7	142,8	143,4	144,8	146,0	143,9	153,8	150,3	144,9	148,6	134,4	142,0	145,8
Desvío estándar	18,1	21,5	19,4	21,3	23,0	24,1	22,3	23,2	24,3	25,8	31,6	29,7	35,7	31,6	25,5	34,4	29,1

DBNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-promedio (gr.)	145,1	146,3	148,5	148,4	147,5	147,6	145,7	147,3	145,0	145,8	145,2	145,7	145,2	145,5	147,4	141,7
Desvío estándar	28,6	29,1	28,0	27,5	27,7	28,7	29,1	25,8	24,4	25,1	25,2	28,1	28,0	27,5	27,8	25,6
DHaz solo-promedio (gr.)	168,2	168,8	169,0	168,4	170,8	167,4	164,0	163,3	157,2	158,3	150,8	145,4	148,0	148,6	143,0	144,3
Desvío estándar	38,2	40,2	39,4	37,8	40,4	33,8	33,3	35,2	29,7	32,0	29,0	31,8	29,9	36,0	24,4	30,1
DBPA-BNCT-promedio (gr.)	154,4	154,2	154,6	154,1	154,9	154,7	152,4	150,7	150,6	149,0	146,3	146,6	147,1	145,6	140,9	140,1
Desvío estándar	16,0	15,9	15,2	15,0	16,7	16,8	16,3	17,2	18,7	19,2	18,3	17,2	16,7	15,0	11,0	11,5
D(GB-10+BPA)-BNCT-promedio (gr.)	142,6	146,1	153,3	152,3	153,8	154,3	155,9	154,9	155,4	153,8	151,2	153,6	154,5	151,3	139,4	140,1
Desvío estándar	31,5	30,4	27,8	26,8	29,2	28,2	31,8	33,0	32,1	33,8	34,4	34,8	33,5	35,5	26,0	27,4

Tabla 54. Promedio del porcentaje de cambio de peso corporal (/) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: *D*Haz solo; *DBPA*-BNCT; *D*(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy, 2 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

DBNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-/ prom (gr.)	100	102	104	106	108	110	111	113	113	114	115	117	112	116	117	116	114
Desvío estándar	0	6	7	8	8	9	9	10	10	11	11	13	14	13	13	14	15
<i>D</i> Haz solo-/ prom (gr.)	100	99	100	100	99	100	101	103	103	104	105	105	105	106	107	107	106
Desvío estándar	0	4	2	3	5	4	4	4	4	4	6	3	4	5	5	5	5
<i>DBPA</i> -BNCT-/ prom (gr.)	100	100	96	99	100	100	100	103	104	105	108	106	106	106	103	106	107
Desvío estándar	0	2	7	4	6	6	4	5	4	5	7	7	6	7	5	8	9
<i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT-/ prom (gr.)	100	99	97	98	98	99	100	100	101	99	101	103	100	101	96	97	100
Desvío estándar	0	4	5	4	5	6	12	5	6	7	11	7	15	12	14	18	11

DBNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-/ prom (gr.)	114	115	116	116	115	115	113	114	112	113	113	113	112	112	114	114
Desvío estándar	17	15	14	13	14	14	16	14	14	14	14	15	15	14	12	11
<i>D</i> Haz solo-/ prom (gr.)	105	105	105	105	106	105	103	103	102	102	98	95	96	101	93	98
Desvío estándar	5	6	6	6	6	6	7	10	8	8	10	15	14	5	10	6
<i>DBPA</i> -BNCT-/ prom (gr.)	107	106	107	106	107	107	105	104	104	103	101	101	102	100	97	96
Desvío estándar	10	9	8	8	9	9	9	9	9	10	10	9	9	8	7	7
<i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT-/ prom (gr.)	98	100	105	105	106	106	107	106	107	105	103	105	106	103	98	99
Desvío estándar	13	14	5	5	7	6	8	9	8	10	10	10	9	11	4	5

Tabla 55. Promedio del peso corporal (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo normal expuesto a DBPA-BNCT (4 Gy, 2 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

DBNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T14	T15	T16
Normal DBPA-BNCT - promedio (gr.)	146,5	145,3	147,2	144,6	148,3	153,4	152,8	160,2	159,0	158,9	157,0	152,2	158,6	159,2	161,9	161,5
Desvío estandar	29,2	29,9	28,8	27,2	29,6	29,5	26,6	29,4	27,7	26,8	25,0	32,8	27,2	23,7	22,6	17,4

DBNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24
Normal DBPA-BNCT - promedio (gr.)	157,7	157,6	159,0	155,3	160,7	162,2	161,1	161,0
Desvío estandar	16,3	18,6	16,2	13,9	16,7	15,7	18,2	19,0

SBNCT, 8 Gy

Tabla 56. Peso corporal promedio (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: SHaz solo; SBPA-BNCT; S(GB-10+BPA)-BNCT (8 Gy, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 8 Gy - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T15	T16
Control-prom (gr.)	127,4	129,6	131,8	135,0	137,3	139,4	141,3	143,6	143,6	144,2	146,0	147,7	159,4	154,2	145,2
Desvío estándar	18,0	19,4	19,2	21,3	22,0	22,4	23,0	23,8	24,5	25,5	25,2	26,8	29,1	26,0	28,3
DHaz solo-prom (gr.)	160,2	158,3	153,5	158,1	157,9	159,7	163,2	169,8	165,5	168,5	172,0	174,9	176,7	171,5	172,9
Desvío estándar	9,5	12,1	16,7	16,7	15,5	12,7	14,8	14,2	12,8	14,6	15,0	16,2	18,2	11,4	12,7
DBPA-BNCT-prom (gr.)	133,1	133,2	124,9	131,2	130,5	132,1	139,0	141,2	140,7	142,2	146,3	148,8	152,0	157,1	155,3
Desvío estándar	13,7	12,2	12,2	12,3	13,4	12,8	13,2	12,9	12,9	14,1	15,5	15,1	16,7	15,9	14,1
D(GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	158,9	161,8	167,1	168,1	171,3	166,2	179,8	184,5	181,8	181,7	182,6	181,9	182,2	178,6	179,2
Desvío estándar	9,3	8,3	9,4	7,7	8,8	8,1	10,7	10,5	10,7	9,6	8,7	8,5	9,6	8,9	9,1

SBNCT 8 Gy - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-prom (gr.)	145,1	146,3	148,5	148,4	147,5	147,6	145,7	147,3	145,0	145,8	145,2	145,7	145,2	145,5	147,4	141,7
Desvío estándar	28,6	29,1	28,0	27,5	27,8	28,7	29,1	25,8	24,4	25,1	25,2	28,1	28,0	27,5	27,8	25,6
DHaz solo-prom (gr.)	178,4	180,8	175,6	175,8	176,0	179,2	176,1	172,6	177,0	172,4	188,2	190,0	189,1	190,8	189,9	190,0
Desvío estándar	13,5	14,6	18,0	16,4	18,3	14,8	17,0	21,0	30,6	38,4	16,4	20,2	18,7	18,5	21,7	21,6
DBPA-BNCT-prom (gr.)	159,8	158,8	160,7	160,3	163,9	162,8	162,7	161,2	163,2	160,9	161,8	160,4	161,8	159,3	160,3	160,9
Desvío estándar	15,3	17,6	17,3	16,8	19,3	19,7	19,1	20,5	21,1	22,7	22,5	24,5	25,2	26,7	26,6	27,8
D(GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	183,3	180,7	179,4	171,5	182,3	185,3	179,0	171,7	174,3	174,5	173,6	172,2	175,5	174,5	170,7	181,1
Desvío estándar	9,3	7,7	8,7	7,8	11,5	15,1	9,3	7,4	6,3	4,7	5,3	8,0	8,8	9,4	16,6	8,9

Tabla 57. Promedio del porcentaje de cambio de peso corporal (✓) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: SHaz solo; SBPA-BNCT; S(GB-10+BPA)-BNCT (8 Gy, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 8 Gy - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T15	T16
Control-/ prom	100	102	104	106	108	110	111	113	113	114	115	117	112	116	114
Desvío estándar	0	6	7	8	8	9	9	10	10	11	11	13	14	14	15
SHaz solo-/ prom	100	99	96	99	99	100	102	106	103	105	108	109	112	109	110
Desvío estándar	0	7	8	9	7	6	8	8	7	9	10	11	10	7	8
SBPA-BNCT-/ prom	100	100	96	99	98	99	105	106	106	107	110	112	114	118	117
Desvío estándar	0	1	2	2	1	1	2	3	3	4	5	6	7	5	5
S(GB-10+BPA)-BNCT-/ prom	100	102	106	106	108	105	114	116	115	115	115	115	115	113	113
Desvío estándar	0	8	9	8	8	9	10	10	10	10	10	9	10	9	8

SBNCT 8 Gy - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-/ prom	114	115	116	116	115	115	113	114	112	113	113	113	112	112	114	114
Desvío estándar	17	15	14	13	14	14	16	14	14	14	14	15	15	14	12	11
SHaz solo-/ prom	113	115	111	112	112	114	112	110	113	110	121	122	121	122	122	122
Desvío estándar	8	9	12	11	12	9	12	15	21	26	8	11	10	9	11	10
SBPA-BNCT-/ prom	120	119	121	120	123	122	122	121	122	121	121	120	121	119	120	120
Desvío estándar	4	4	4	4	5	6	5	6	6	7	8	9	10	12	11	12
S(GB-10+BPA)-BNCT-/ prom	116	114	113	108	115	117	113	109	110	111	110	109	111	111	108	114
Desvío estándar	9	9	9	8	10	12	9	10	10	8	9	11	11	11	14	14

Tabla 58. Peso promedio (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo normal expuesto a DBPA-BNCT (8 Gy, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 8 Gy - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Normal SBPA-BNCT - prom (gr.)	182,5	176,8	180,5	177,6	182,1	184,6	181,5	187,2	186,7	186,8	185,3	187,0	188,0	179,0	174,4	177,9	173,5
Desvío estándar	33,0	31,4	30,8	27,9	28,8	28,2	27,5	27,5	27,4	27,9	26,3	26,6	25,5	23,3	20,2	22,1	19,8

SBNCT 8 Gy - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24
Normal SBPA-BNCT - prom (gr.)	176,7	172,8	170,1	168,0	168,7	163,8	166,2	163,2
Desvío estándar	31,5	19,5	22,0	17,1	17,5	17,8	14,1	16,8

Radiotoxicidad

Tabla 59. Grados de mucositis por animal cancerizado, por protocolo, a tiempos representativos: A) DHaz solo; B) DBPA-BNCT; C) D(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy, 2 semanas de intervalo, RA-3). (-) Indica animal no disponible (sacrificio o muerte). G0: grado 0; G1: grado 1; G2: grado 2; G3: grado 3; G4: grado 4; G5: grado 5.

A)

DHaz solo 4 Gy (2 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs (post 1º irrad)	1 sem	9-11 días	Pre y 2º irrad 2 sem	24hs (post 2º irrad)	3 sem	9-10 días	4 sem	5 sem	32 sem
H5	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H6	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H11	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H12	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	-
H13	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H18	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H19	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H29	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H30	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H31	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
nº animales total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7

B)

DBPA-BNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs (post 1º irrad)	1 sem	9-11 días	Pre y 2º irrad 2 sem	24hs (post 2º irrad)	3 sem	9-10 días	4 sem	5 sem	32 sem
H1	G0	G0	G2	G2	G1	G1	G1	G1	G0	G0	-
H2	G0	G0	G1	G2	G3	G3	G1	G1	G0	G0	G0
H3	G0	G0	G1	G1	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0
H7	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H8	G0	G0	G0	G1	G0	G1	G1	G1	G0	-	-
H9	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0
H20	G0	G0	G1	G2	G1	G1	G1	G1	G1	G0	G0
H21	G0	G1	G1	G2	G2	G2	G2	G2	G0	G0	G0
H22	G0	G0	G1	G1	G1	G1	G1	G2	G0	G0	G0
H23	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G2	G0	G0	G0
H24	G0	G0	G1	G2	G1	G1	G2	G2	G2	G0	G0
nº animales total	11	11	11	11	11	11	11	11	11	10	9

C)

D(GB-10+BPA)-BNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs (post 1º irrad)	1 sem	9-11 días	Pre y 2º irrad 2 sem	24hs (post 2º irrad)	3 sem	9-10 días	4sem	5 sem	32 sem
H4	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H10	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H14	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0	G0	-
H15	G0	G0	G1	G1	G0	G0	G1	G1	G0	G0	-
H16	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	-
H17	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	-
H25	G0	G0	G1	G1	G1	G1	G2	G2	G0	G0	G0
H26	G0	G0	G1	G2	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0
H27	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0
H28	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G1	G1	G0	G0	G0
nº animales total	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5

Tabla 60. Grados de mucositis por animal normal tratados con DBPA-BNCT (4 Gy, 2 semanas de intervalo, RA-3), a tiempos representativos. Los grados resaltados en gris corresponden a la porción de bolsa remanente.

Normal DBPA-BNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad	24hs	1 sem	10 días	2 sem	24hs	16 días	3 sem	4 sem	5 sem	6 sem	7 sem	8 sem	24 sem
	(sem 0)	(post 1º irrad)			(pre 2º irrad)	(post 2º irrad)								
H35	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H36	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H37	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0
H38	G0	G0	G0	G2	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H39	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H40	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
nº animales total	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tabla 61. Grados de mucositis por animal cancerizado, por protocolo, a tiempos representativos: SHaz solo; SBPA-BNCT; S(GB-10+BPA)-BNCT (8 Gy, RA-3). Los grados resaltados en gris corresponden a la porción de bolsa remanente. (-) Indica animal no disponible (sacrificio o muerte). G0: grado 0; G1: grado 1; G2: grado 2; G3: grado 3; G4: grado 4; G5: grado 5.

A)

SHaz solo 8 Gy - RA-3	Pre y 1º irrad	24hs	1 sem	9 días	2 sem	16 días	3 sem	4 sem	5 sem	32 sem
	(sem 0)									
H10	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H11	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H12	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H13	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H14	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H15	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
nº animales total	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3

B)

SBPA-BNCT 8 Gy - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs	1 sem	9 días	2 sem	16 días	3 sem	4 sem	5 sem	32 sem
H5	G0	G0	G1	G2	G5	G5	G2	G0	G0	G0
H6	G0	G0	G2	G2	G2	G5	G5	G0	G0	G0
H7	G0	G1	G2	G2	G2	G5	G5	G0	G0	G0
H8	G0	G1	G2	G3	G5	G5	G0	G0	G0	G0
H9	G0	G0	G2	G2	G5	G5	G5	G0	G0	G0
nº animales total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

C)

S(GB-10+BPA)-BNCT 8 Gy - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs	1 sem	9 días	2 sem	16 días	3 sem	4 sem	5 sem	32 sem
H16	G0	G1	G1	G2	G5	G5	G5	G0	G0	G0
H17	G0	G1	G2	G2	G5	G5	G0	G0	G0	G0
H18	G0	G1	G1	G2	G5	G5	G0	G0	G0	G0
H19	G0	G1	G2	G2	G5	G5	G5	G0	G0	-
H20	G0	G1	G2	G2	G5	G5	G2	G0	G0	G0
H21	G0	G1	G2	G3	G5	G5	G5	G0	G0	-
nº animales total	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4

Tabla 62. Grados de mucositis por animal normal tratados con SBPA-BNCT (8 Gy, RA-3), a tiempos representativos. Los grados resaltados en gris corresponden a la porción de bolsa remanente. (-) Indica animal no disponible (sacrificio o muerte). G0: grado 0; G1: grado 1; G2: grado 2; G3: grado 3; G4: grado 4; G5: grado 5.

Normal SBPA-BNCT 8 Gy - RA-3	Pre y 1º irrad (sem 0)	24hs (post irrad)	1 sem	10 días	2 sem	16 días	3 sem	24 días	4 sem	5 sem	6 sem	7 sem	8 sem	24 sem
H22	G0	G0	G0	G0	G1	G2	G5	G1	G0	G0	G1	G0	G0	-
H23	G0	G0	G0	G2	G5	G5	G1	G0	G1	G0	G0	G0	G0	-
H24	G0	G0	G0	G1	G1	G5	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H27	G0	G0	G1	G5	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
nº animales total	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2

Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos (tumores que se desarrollaron post-T0)

DBNCT, 4 Gy cada irradiación, 2 semanas de intervalo

Tabla 63. Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos en tejido con PMD para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: DHaz solo; DBPA-BNCT; D(GB-10+BPA)-BNCT (4 Gy, 2 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

DBNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
CONTROL	7	17	27	43	53	57	62	64	68	74	76	78	79	81	82	81	85
DHaz solo	0	0	0	0	10	20	20	20	30	30	40	50	50	50	40	40	40
DBPA-BNCT	0	0	9	9	18	20	60	60	60	70	70	70	70	70	70	80	80
D(GB-10+BPA)-BNCT	0	0	10	10	20	40	50	50	70	70	70	70	70	70	70	70	78

DBNCT 4 Gy (2 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T23	T24	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
CONTROL	84	85	85	85	87	87	87	88	89	90	89	89	89
DHaz solo	40	60	60	60	60	60	70	70	70	90	90	80	70
DBPA-BNCT	80	80	80	80	90	90	100	100	100	100	100	100	100
D(GB-10+BPA)-BNCT	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78

SBNCT, 8 Gy

Tabla 64. Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos en tejido con PMD para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: SHaz solo; SBPA-BNCT; S(GB-10+BPA)-BNCT (8 Gy, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 8 Gy - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T15	T16
CONTROL	7	17	27	43	53	57	62	64	68	74	76	78	79	81	81	85
SHaz solo	0	0	0	0	0	33	33	33	50	83	100	100	100	100	100	100
SBPA-BNCT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S(GB-10+BPA)-BNCT	0	0	0	0	0	0	17	33	33	33	33	33	40	40	40	40

SBNCT 8 Gy - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
CONTROL	84	85	85	85	88	87	87	87	87	88	88	89	90	89	89	89
SHaz solo	100	100	100	100	100	83	83	83	83	100	100	100	100	100	100	100
SBPA-BNCT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S(GB-10+BPA)-BNCT	40	40	40	40	40	40	40	20	20	20	25	25	25	25	25	25

V. Estudios de BNCT “piloto” *in vivo* en el modelo de cancerización de campo empleando una única aplicación de BNCT, utilizando una dosis total absorbida de 6 Gy.

Promedio de pesos corporales y promedio de porcentaje de cambio de peso corporal, con sus desvíos estándar

Tabla 65. Peso promedio (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y SBPA-BNCT (6 Gy, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 6 Gy - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-prom (gr.)	127,4	129,6	131,8	135,0	137,3	139,4	141,3	143,6	143,6	144,2	146,0	147,7	159,4	146,9	145,8	145,2	145,2
Desvío estándar	18,0	19,4	19,2	21,3	22,0	22,4	23,0	23,8	24,5	25,5	25,2	26,8	29,0	26,9	26,5	26,0	28,3
SBPA-BNCT-prom (gr.)	176,5	180,2	162,0	175,3	179,8	186,4	190,3	190,7	189,9	192,4	192,4	188,8	194,9	193,5	187,3	191,5	192,4
Desvío estándar	25,3	29,2	25,0	21,1	27,3	26,6	23,5	24,9	28,8	27,6	27,4	23,9	22,8	26,1	20,7	18,6	19,4

SBNCT 6 Gy - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-prom (gr.)	145,1	146,3	148,5	148,4	147,5	147,6	145,7	147,3	145,0	145,8	145,2	145,7	145,2	145,5	147,4	141,7
Desvío estándar	28,6	29,1	28,0	27,5	27,7	28,7	29,1	25,8	24,4	25,1	25,2	28,1	28,0	27,5	27,8	25,6
SBPA-BNCT-prom (gr.)	192,4	193,5	192,4	189,6	189,6	187,0	189,4	185,9	189,3	187,9	188,7	194,7	191,8	198,1	198,1	201,6
Desvío estándar	21,1	22,4	18,5	16,4	20,1	19,6	17,1	17,9	17,7	15,3	15,4	11,3	8,7	9,6	10,2	10,2

Tabla 66. Promedio del porcentaje de cambio de peso corporal (/) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y SBPA-BNCT (6 Gy, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 6 Gy - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-/ prom	100	102	104	106	108	110	111	113	113	114	115	117	112	116	117	116	114
Desvío estándar	0	6	7	8	8	9	9	10	10	11	11	13	14	13	13	14	15
SBPA-BNCT-/ prom	100	102	98	100	102	106	108	108	108	109	109	107	111	110	107	109	109
Desvío estándar	0	3	1	4	2	3	2	4	4	2	2	3	5	6	5	7	5

SBNCT 6 Gy - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-/ prom	114	115	116	116	115	115	113	114	112	113	113	113	112	112	114	114
Desvío estándar	17	15	14	13	14	14	16	14	14	14	14	15	15	14	12	11
SBPA-BNCT-/ prom	109	110	110	108	108	106	108	106	108	107	108	112	105	108	108	110
Desvío estándar	4	3	6	7	6	5	7	8	7	8	8	12	10	8	9	11

Radiotoxicidad

Tabla 67. Grados de mucositis por animal cancerizado tratados con SBPA-BNCT (6 Gy, RA-3), a tiempos representativos. Los grados resaltados en gris corresponden a la porción de bolsa remanente. (-) Indica animal no disponible (sacrificio o muerte). G0: grado 0; G1: grado 1; G2: grado 2; G3: grado 3; G4: grado 4; G5: grado 5.

SBPA-BNCT 6 Gy - RA-3	Pre y 1º irrad (0 sem)	24hs (post irrad)	4 días	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem	32 sem
H1	G0	G1	G1	G2	G5	G0	G0	G0
H2	G0	G0	G1	G2	G5	G0	G0	G0
H3	G0	G1	G1	G1	G5	G0	G0	G0
H4	G0	G0	G0	G1	G5	G0	G0	-
nº animales total	4	4	4	4	4	4	4	3

Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos (tumores que se desarrollaron post-T0)

Tabla 68. Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos en tejido con PMD para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y SBPA-BNCT (6 Gy, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

SBNCT 6 Gy - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
CONTROL	7	17	27	43	53	57	62	64	68	74	76	78	79	81	82	81	85
SBPA-BNCT	0	0	0	0	25	25	25	25	25	50	50	50	50	50	50	50	50

SBNCT 6 Gy - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
CONTROL	84	85	85	85	88	87	87	87	87	88	88	89	90	89	89	89
SBPA-BNCT	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	67	67	67	67	67

VI. Estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de cancerización de campo desarrollado empleando una doble aplicación de BNCT con un intervalo de 4 semanas entre irradiaciones, 5 Gy en cada irradiación (10 Gy dosis total absorbida).

Promedio de pesos corporales y promedio de porcentaje de cambio de peso, con sus desvíos estándar

Tabla 69. Peso corporal promedio (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: DHaz solo; DBPA-BNCT; D(GB-10+BPA)-BNCT (5 Gy, 4 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

DBNCT 5 Gy (4 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-prom (gr.)	127,4	129,6	131,8	135,0	137,3	139,4	141,3	143,6	143,6	144,2	146,0	147,7	159,4	146,9	145,8	145,2	145,2
Desvío estándar	18,0	19,4	19,2	21,3	22,0	22,4	23,0	23,8	24,5	25,5	25,2	26,8	29,1	26,9	26,5	26,0	28,3
DHaz solo-prom (gr.)	146,0	143,9	144,0	147,6	150,3	150,8	151,0	153,6	154,3	156,1	156,3	159,0	158,8	159,5	158,2	158,9	157,4
Desvío estándar	14,8	15,0	15,3	15,1	14,6	16,1	16,1	16,1	15,8	16,5	16,5	16,2	17,4	18,6	18,7	18,8	19,0
DBPA-BNCT-prom (gr.)	132,3	130,9	128,6	131,6	131,6	134,3	135,5	139,3	141,4	141,8	142,7	144,6	142,4	143,9	142,9	144,4	143,5
Desvío estándar	7,5	8,6	9,0	9,0	6,6	8,0	9,2	7,4	9,6	6,6	8,2	8,1	8,0	8,3	9,1	10,4	10,1
D(GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	146,9	142,3	141,0	145,6	147,1	148,7	147,2	148,0	149,4	156,1	155,1	158,2	158,7	157,5	158,6	160,1	161,7
Desvío estándar	9,2	10,0	15,9	14,6	13,6	14,4	13,0	11,6	9,4	16,5	14,6	14,7	15,3	14,2	14,1	16,5	18,6

DBNCT 5 Gy (4 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-prom (gr.)	145,1	146,3	148,5	148,4	147,5	147,6	145,7	147,3	145,0	145,8	145,2	145,7	145,2	145,5	147,4	141,7
Desvío estándar	28,6	29,1	28,0	27,5	27,8	28,7	29,1	25,8	24,4	25,1	25,2	28,1	28,0	27,5	27,8	25,6
DHaz solo-prom (gr.)	154,7	160,1	158,9	160,7	159,5	160,9	160,7	157,6	151,6	150,2	149,9	153,4	157,1	158,5	160,6	165,1
Desvío estándar	21,3	19,3	18,0	18,2	16,1	16,3	16,1	13,6	10,7	9,8	8,6	10,3	12,6	14,7	18,7	24,0
DBPA-BNCT-prom (gr.)	142,5	141,6	139,4	142,8	140,4	141,8	138,3	139,1	136,8	131,0	136,0	135,3	136,4	134,6	130,6	135,7
Desvío estándar	9,0	12,2	13,4	14,5	13,8	10,1	9,4	8,6	7,3	12,4	8,1	5,5	6,4	7,5	13,6	10,2
D(GB-10+BPA)-BNCT-prom (gr.)	161,3	159,0	161,5	157,8	152,5	153,2	152,2	156,1	154,8	152,5	154,5	142,1	148,4	151,8	140,5	139,6
Desvío estándar	19,8	16,1	18,7	14,8	12,6	13,4	11,8	14,8	16,0	15,3	15,9	10,5	20,5	21,5	11,9	13,4

Tabla 70. Promedio del porcentaje de cambio de peso corporal (/) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: *D*Haz solo; *DBPA*-BNCT; *D*(GB-10+BPA)-BNCT (5 Gy, 4 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

<i>DBNCT</i> 5 Gy (4 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Control-/ prom	100	102	104	106	108	110	111	113	113	114	115	117	112	116	117	116	114
Desvío estándar	0	6	7	8	8	9	9	10	10	11	11	13	14	13	13	14	15
<i>D</i> Haz solo-/ prom	100	99	99	101	103	103	103	105	106	107	107	109	109	109	108	109	108
Desvío estándar	0	1	2	2	1	1	2	2	2	3	2	2	3	2	3	2	2
<i>DBPA</i> -BNCT-/ prom	100	99	97	99	100	102	102	105	107	107	108	109	108	109	108	109	108
Desvío estándar	0	4	6	5	4	5	5	4	8	4	6	5	4	5	7	7	6
<i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT-/ prom	100	97	96	99	100	101	100	101	102	107	106	108	108	107	108	109	110
Desvío estándar	0	2	7	6	4	5	5	5	5	16	6	5	6	5	5	7	9

<i>DBNCT</i> 5 Gy (4 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
Control-/ prom	114	115	116	116	115	115	113	114	112	113	113	113	112	112	114	114
Desvío estándar	17	15	14	13	14	14	16	14	14	14	14	15	15	14	12	11
<i>D</i> Haz solo-/ prom	106	108	107	108	107	108	108	106	106	105	103	106	108	109	110	113
Desvío estándar	6	3	3	3	2	2	3	2	4	2	4	3	4	7	9	12
<i>DBPA</i> -BNCT-/ prom	108	107	106	108	106	107	105	106	104	100	105	104	105	104	101	107
Desvío estándar	7	9	11	10	9	6	8	5	5	11	6	6	6	8	14	6
<i>D</i> (GB-10+BPA)-BNCT-/ prom	110	108	110	107	104	104	104	106	105	104	105	100	102	106	101	101
Desvío estándar	10	8	9	7	6	7	5	7	8	7	7	9	13	10	10	11

Tabla 71. Peso corporal promedio (gramos) y desvío estándar para cada tiempo correspondiente al grupo normal expuesto a DBPA-BNCT (5 Gy cada irradiación, 4 semanas de intervalo entre irradiaciones, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post irradiación (T0).

DBNCT 5 Gy (4 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Normal DBPA-BNCT - prom (gr.)	92,7	94,7	98,8	104,7	108,7	115,2	117,5	122,6	128,7	138,2	143,3	148,1	142,9	150,3	151,3	153,2	156,9
Desvío estandar	7,9	12,9	14,1	15,1	15,4	15,3	14,5	18,6	16,8	19,3	19,7	19,5	20,0	24,9	22,3	21,5	22,4

DBNCT 5 Gy (4 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24
Normal DBPA-BNCT - prom (gr.)	157,6	158,8	160,4	158,8	158,9	158,7	158,4	158,4
Desvío estandar	25,4	26,3	22,3	20,9	21,0	22,6	20,8	21,4

Radiotoxicidad

Tabla 72. Grados de mucositis por animal cancerizado, por protocolo, a tiempos representativos: A) DHaz solo; B) DBPA-BNCT; C) D(GB-10+BPA)-BNCT (5 Gy, 4 semanas de intervalo, RA-3). Los grados resaltados en gris corresponden a la porción de bolsa remanente. (-) Indica animal no disponible (sacrificio o muerte). G0: grado 0; G1: grado 1; G2: grado 2; G3: grado 3; G4: grado 4; G5: grado 5.

A)

DHaz solo 5 Gy (4 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad	48hs	1 sem	9 días	11 días	2 sem	3 sem	Pre y 2º irrad	24hs	5 sem	10 días	6 sem	7 sem	8 sem	9 sem	32 sem
	(sem 0)	(post 1º irrad)	4 sem						(post 2º irrad)							
H7	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H8	G0	G1	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H9	G0	G1	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H10	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H11	G0	G0	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	-
H12	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
nº animales total	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3

B)

DBPA-BNCT 5 Gy (4 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad	48hs	1 sem	9 días	11 días	2 sem	3 sem	Pre y 2º irrad	24hs	5 sem	10 días	6 sem	7 sem	8 sem	9 sem	32 sem
	(sem 0)	(post 1º irrad)					4 sem	(post 2º irrad)								
H1	G0	G0	G1	G2	G2	G5	G0	G0	G1	G1	G2	G1	G1	G0	G0	-
H2	G0	G1	G1	G2	G2	G5	G0	G0	G1	G0	G2	G0	G0	G0	G0	G0
H3	G0	G1	G1	G2	G2	G5	G2	G1	G1	G1	G2	G0	G0	G0	G0	G0
H4	G0	G0	G1	G2	G2	G5	G2	G1	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0	-
H5	G0	G0	G1	G2	G1	G0	G0	G0	G1	G1	G2	G1	G1	G0	G0	G0
H6	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G2	G1	G0	G0	G0	-
nº animales total	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3

C)

D(GB-10+BPA)-BNCT 5 Gy (4 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad	48hs	1 sem	9 días	11 días	2 sem	3 sem	Pre y 2º irrad	24hs	5 sem	10 días	6 sem	7 sem	8 sem	9 sem	32 sem
	(sem 0)	(post 1º irrad)					4 sem	(post 2º irrad)								
H13	G0	G0	G1	G1	G2	G2	G1	G0	G1	G2	G2	G1	G0	G0	G0	G0
H14	G0	G1	G2	G2	G1	G0	G0	G0	G1	G1	G1	G0	G0	G0	G0	G0
H15	G0	G1	G1	G2	G2	G1	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H16	G0	G0	G1	G2	G2	G5	G0	G1	G1	G2	G2	G0	G0	G0	G0	G0
H17	G0	G1	G1	G1	G1	G0	G0	G0	G1	G1	G2	G0	G0	G0	G0	G0
H18	G0	G0	G1	G1	G1	G1	G0	G1	G1	G5	G5	G5	G2	G1	G1	G0
nº animales total	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tabla 73. Grados de mucositis por animal normal tratados con DBPA-BNCT (5 Gy, 4 semanas de intervalo, RA-3), a tiempos representativos. G0: grado 0; G1: grado 1; G2: grado 2; G3: grado 3; G4: grado 4; G5: grado 5.

DBPA-BNCT 5 Gy (4 sem) - RA-3	Pre y 1º irrad	24hs	1 sem	10 días	2 sem	17 días	3 sem	Pre y 2º irrad	24hs	5 sem	10 días	6 sem	7 sem	8 sem	24 sem
	(sem 0)	(post 1º irrad)						(4 sem)	(post 2º irrad)						
H1	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	-
H2	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0
H3	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G0	G0	G0
H4	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G2	G0	G0	G0	G0
H5	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G0	G1	G1	G0	G0	G0	G0
nº animales total	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4

Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos (tumores que se desarrollaron post-T0).

Tabla 74. Porcentaje acumulado de animales que desarrollaron tumores nuevos en tejido con PMD para cada tiempo correspondiente al grupo control (cancerizados, sham-irradiados) y los diferentes protocolos experimentales: DHaz solo; DBPA-BNCT; D(GB-10+BPA)-BNCT (5 Gy, 4 semanas de intervalo, RA-3). Los tiempos (T) son semanas post primera irradiación (T0).

DBNCT 5 Gy (4 sem) - RA-3	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
CONTROL	7	17	27	43	53	57	62	64	68	74	76	78	79	81	82	81	85
DHaz solo	0	0	0	50	67	67	67	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83
DBPA-BNCT	0	0	0	17	33	33	17	33	33	33	67	67	67	83	83	83	83
D(GB-10+BPA)-BNCT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	33	33	33	33	33

DBNCT 5 Gy (4 sem) - RA-3	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T29	T30	T31	T32
CONTROL	84	85	85	85	88	87	87	87	87	88	88	90	89	89	89
DHaz solo	83	83	83	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
DBPA-BNCT	83	83	83	83	83	83	83	83	67	67	67	67	67	67	67
D(GB-10+BPA)-BNCT	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
BHE: Barrera hematoencefálica
BNCT: Boron Neutron Capture Therapy
BNL: Brookhaven National Laboratory
BPA: Borofenilalanina
BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina
BSH: Sodio mercaptoundecahidro-closo-dodecaborato
CAF: Carcinoma associated fibroblasts o fibroblastos asociados al cáncer
CBE: Compound biological effectiveness o efectividad biológica del compuesto borado
DBNCT: "doble" BNCT o doble aplicación de BNCT
DIRI: Dynamic Infrared Imaging o técnica de Imagenología Dinámica Infrarroja
DMBA: 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno
DS: desvío estándar
EGF: Epidermal growth factor o factor de crecimiento epidérmico
FGF: Fibroblast growth factor o factor de crecimiento fibroblastos
GB-10: Decahidrodecaborato de sodio
GBM: Glioblastoma Multiforme
GUI: interface gráfica
Gy: Gray
H&E: Hematoxilina y Eosina
ICP-OES: Espectrómetro de emisión óptica por plasma inductivo
ICP-MS: Espectrómetro de Emisión por plasma inductivo de masa
IL-11: Interleuquina-11
i.p.: Intraperitoneal
IP: Índice de proliferación
i.v.: Intravenoso
KGF: Keratinocyte growth gactor o factor de crecimiento de queratinocitos
LET: Lineal Energy Transference
MCNP: Monte Carlo N-Particle
MIT: Massachusstes Institute of Technology
NCT: Neutron Capture Therapy
NF- κ B: Nuclear factor κ B o Factor nuclear κ B
NUMF: No Unusual Microscopic Features o sin características microscópicas inusuales
p.c.: Peso corporal
PMD: Potentially malignant disorders, lesiones potencialmente malignas
RBE: Relative biological effectiveness o efectividad biológica relativa

ROI: Región de interés

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SBNCT: Single BNCT o única aplicación de BNCT

SMT: Somatic mutation theory o teoría somática de la mutación

STP: second primary tumors, segundos tumores primarios

T0: Tiempo donde se realizó la primera irradiación (T0); semana 0 de seguimiento

T50: Tiempo después de T0 al cual 50% de los animales desarrollaron nuevos tumores

T80: Tiempo después de T0 al cual 80% de los animales desarrollaron nuevos tumores

TGF: Transforming growth factor o factor de crecimiento transformante

TOFT: Tissue organization field theory o teoría de la organización tisular

VEGF: Vascular endothelial growth factor o factor de crecimiento vascular-endotelial

REFERENCIAS

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

<http://www.eaglabs.com/mc/inductively-coupled-plasma-spectroscopy.html>

http://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf

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.* 2011; 61(4): 250-81.

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.* 2006; 28(9): 850-5.

Albers AE, Chen C, Köberle B, Qian X, Klussmann JP, Wollenberg B, Kaufmann AM. Stem cells in squamous head and neck cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012; 81(3): 224-40.

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), 2010, Buenos Aires, Argentina.

Altieri S, Bortolussi S, Bruschi P, Chiari P, Fossati F, Stella S, Prati U, Roveda L, Zonta A, Zonta C, Ferrari C, Clerici A, Nano R, Pinelli T. Neutron autoradiography imaging of selective boron uptake in human metastatic tumours. *Appl Radiat Isot.* 2008; 66(12): 1850-5.

Ariyoshi Y, Miyatake S, Kimura Y, Shimahara T, Kawabata S, Nagata K, Suzuki M, Maruhashi A, Ono K, Shimahara M. Boron neutron capture therapy using epithermal neutrons for recurrent cancer in the oral cavity and cervical lymph node metastasis. *Oncol Rep.* 2007; 18(4): 861-6.

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.* 2009; 38(5): 448-54.

Aromando RF, Trivillin VA, Heber EM, Pozzi E, 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.* 2010; 46(5):355-9.

Baker SG, Kramer BS. Paradoxes in carcinogenesis: new opportunities for research directions. *BMC Cancer* 2007; 7: 151.

Barth RF, Soloway AH, Fairchild RG. Boron neutron capture therapy of cancer. *Cancer Res.* 1990; 50(4): 1061-70.

Barth, RF. Rat brain tumor models in experimental neuroncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neuro-Oncol* 1998; 36: 91-102.

Barth RF, Coderre JA, Vicente MGH, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 3987-4002.

Barth RF. Boron neutron capture therapy at the crossroads: challenges and opportunities. *Appl Radiat Isot.* 2009; 67(7-8 Suppl): S3-6.

Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci.* 2012; 9(3): 193-9.

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.* 1992; 74: 105-8.

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.* 1994; 140: 72-8.

Biasco G, Paganelli GM, Miglioli M, Brillanti S, Di Febo G, Gizzi G, Ponz de Leon M, Campieri M, Barbara L. Rectal cell proliferation and colon cancer risk in ulcerative colitis. *Cancer Res.* 1990; 50: 1156-9.

Blaickner M, Kratz JV, Minouchehr S, Otto G, Schmidberger H, Schütz C, Vogtländer L, Wortmann B, Hampel G. Dosimetric feasibility study for an extracorporeal BNCT application on liver metastases at the TRIGA Mainz. *Appl Radiat Isot.* 2012; 70(1): 139-43.

Blaumann HR, González SJ, Longhino J, Santa Cruz GA, Calzetta Larrieu OA, Bonomi MR, Roth BM. Boron neutron capture therapy of skin melanomas at the RA-6 reactor: a procedural approach to beam set up and performance evaluation for upcoming clinical trials. *Med Phys.* 2004; 31(1): 70-80. Erratum in: *Med Phys.* 2004; 31(8): 2373.

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.* 2011a; 69(2): 394-8.

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.* 2011b; 69: 1924-27.

Bowen JM, Gibson RJ, Keefe DM. Animal models of mucositis: implications for therapy. *J Support Oncol.* 2011; 9(5): 161-8.

Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003; 63(8): 1727-30.

Bregadze V, Semioshkin A, Sivaev I. Synthesis of conjugates of polyhedral boron compounds with tumor-seeking molecules for neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot.* 2011; 69(12): 1774-7.

Bhuvanewari V, Rao KS, Nagini S. Altered expression of anti and proapoptotic proteins during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by tomato and garlic combination. *Clin Chim Acta.* 2004; 350(1-2): 65-72.

Byvaltsev V, Kanygin V, Belykh E, Taskaev S. Prospects in boron neutron capture therapy of brain tumors. *World Neurosurg.* 2012; 78(1-2): 8-9.

Cahan WG. Multiple primary cancers of the lung, esophagus and other sites. *Cancer (Phila.)* 1977; 40: 1954-60.

Capala J, Stenstam BH, Sköld K, Munck af Rosenschöld P, Giusti V, Persson C, Wallin E, Brun A, Franzen L, Carlsson J, Salford L, Ceberg C, Persson B, Pellettieri L, Henriksson R. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: clinical studies in Sweden. *J Neurooncol.* 2003; 62(1-2): 135-44.

Capuani S, Gili T, Bozzali M, Russo S, Porcari P, Cametti C, D'Amore E, Colasanti M, Venturini G, Maraviglia 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. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 72(2): 562-7.

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.* 2007; 83(10): 699-706.

Cardoso J, Nieves 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.* 2009; 67(7-8 Suppl): S76-9.

Carmeliet P y Jain. RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000; 407: 249-64.

Carnelio S, Sunil Rodrigues G, Shenoy R, Fernandes D. A Brief Review of Common Oral Premalignant Lesions with Emphasis on Their Management and Cancer Prevention. *Indian J Surg.* 2011; 73(4): 256-61.

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), 2010, Buenos Aires, Argentina.

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).

Chang KW, Lin SC, Koos S, Pather K, Solt D. p53 and Ha-ras mutations in chemically induced hamster buccal pouch carcinomas. *Carcinogenesis.* 1996; 17(3): 595-600.

Chen PT, Kuan FC, Huang CE, Chen MF, Huang SH, Chen MC, Lee KD. Incidence and patterns of second primary malignancies following oral cavity cancers in a prevalent area of betel-nut chewing: a population-based cohort of 26,166 patients in Taiwan. *Jpn J Clin Oncol.* 2011; 41(12): 1336-43.

Chen YK, Lin LM. DMBA-induced hamster buccal pouch carcinoma and VX2-induced rabbit cancer as a model for human oral carcinogenesis. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2010; 10(9): 1485-96.

Choy ATK, van Hasselt CA, Chisholm EM, Williams SR, King WWK, Li ARC. Multiple primary cancers in Hong Kong Chinese patients with squamous cell cancer of the head or neck. *Cancer.* 1992; 70(4): 815-20.

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.* 1987; 47(23): 6377-83.

Coderre JF, Joel DD, Micca PL, Nawrocky MM. Control of intracerebral gliomas in rats by boron neutron capture therapy with *p*-boronophenylalanine. *Radiat Res.* 1992; 129: 290–6.

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 celularity. *Radiat Res.* 1998; 149: 163-170.

Coderre JA, Morris GM. The radiation biology of boron neutron capture therapy. *Radiat Res.* 1999; 151: 1-18.

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).* 2011; 47(44): 12179-81.

Dagrosa A, Carpano M, Perona M, Thomasz L, Nievas S, Cabrini R, Juvenal G, Pisarev M. Studies for the application of boron neutron capture therapy to the treatment of differentiated thyroid cancer. *Appl Radiat Isot.* 2011; 69(12): 1752-5.

Detta A, Cruickshank GS. L-amino acid transporter-1 and boronophenylalanine-based boron neutron capture therapy of human brain tumors. *Cancer Res.* 2009; 69(5): 2126-32.

Diakides NA, Bronzino JD. Medical Infrared Imaging. CRC Press-Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, 2008.

Di Carlo A. Thermography and the possibilities for its applications in clinical and experimental dermatology. *Clin Dermatol.* 1995; 13(4): 329-36.

Diaz A, Stelzer K, Laramore G, Wiersema R. Pharmacology studies of Na₂¹⁰B₁₀H₁₀ (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).

Eveson JW. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. *J Oral Pathol.* 1981; 10(3): 129-46.

Fariás R, González S J, Thorp S, Pozzi ECC, Monti Hughes A, Molinari AJ, Trivillin VA, Schwint AE. Dose Estimation for an oral cancer model in rodents: Computational modeling in MCNP and dedicated software for 3D dosimetric analysis. In: *Proceedings 6th Young Researchers BNCT Meeting*, 2011, Hsinchu, Taiwan.

Farr LE, Robretson JS, Stickley EE. Physics and physiology of neutron capture therapy. *Pro Nat Acad Sci US*. 1954a; 40: 1087-93.

Farr LE, Sweet WH, Locksley HB, Robertson JS. Neutron capture therapy of glioma using boron-10. *Transact Amer Neurol Ass*. 1954b; 79: 110-3.

Farr LE, Sweet WH, Robertson JS, Foster CG, Sutherland DL, Mendelshon ML. Neutron capture therapy with boron in the treatment of glioblastoma multiforme. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1954c; 71: 279-91.

Feng B, Tomizawa K, Michiue H, Miyatake S, Han XJ, Fujimura A, Seno M, Kirihata M, Matsui H. Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His. *Biomaterials*. 2009; 30(9): 1746-55.

Feng L, Wang Z. Chemopreventive effect of celecoxib in oral precancers and cancers. *Laryngoscope*. 2006; 116(10): 1842-5.

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*. 2009; 67(7-8 Suppl): S341-4.

Fujii H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai M, Suzuki M, Asano T, Doki Y, Kirihata 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*. 2011; 6: 8.

Fujimoto T, Andoh T, Sudo T, Fujita I, Imabori M, Moritake H, Sugimoto T, Sakuma Y, Takeuchi T, Sonobe H, Epstein AL, Akisue T, Kirihata 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*. 2011; 69(12): 1713-6.

Fukuda H, Hiratsuka J, Kobayashi T, Sakurai Y, Yoshino K, Karashima H, Turu K, Araki K, Mishima Y, Ichihashi M. Boron neutron capture therapy (BNCT) for malignant melanoma with special reference to absorbed doses to the normal skin and tumor. *Australas Phys Eng Sci Med*. 2003; 26(3): 97-103.

Fuwa N, Suzuki M, Sakurai Y, Nagata K, Kinashi Y, Masunaga S, Maruhashi A, Imahori Y, Kodaira T, Tachibana H, Nakamura T, Ono K. Treatment results of boron neutron capture therapy using intra-arterial administration of boron compounds for recurrent head and neck cancer. *Br J Radiol*. 2008; 81(969): 749-52.

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*. 2011; 50: 199–207.

Gabel D, Fairchild RG, Larsson B. The relative biological effectiveness in V79 Chinese hamster cells in the neutron capture reaction in boron and nitrogen. *Radiat Res*. 1984; 98: 307-16.

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

Ge L, Meng W, Zhou H, Bhowmick N. Could stroma contribute to field cancerization?. *Med Hypotheses*. 2010; 75(1): 26-31.

Gimenez-Conti IB, Shin DM, Bianchi AB, Roop DR, Hong WK, Conti CJ, Slaga TJ. Changes in keratin expression during 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Cancer Res*. 1990; 50(14): 4441–5.

Gimenez-Conti IB, Slaga TJ. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J Cell Biochem Suppl*. 1993; 17F: 83–90.

Gimenez-Conti IB, LaBate M, Liu F, Osterndorff E. p53 alterations in chemically induced hamster cheek-pouch lesions. *Mol Carcinog*. 1996; 16(4): 197–202.

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*. 2004a; 61(5): 1101-5.

González SJ, Carando DG, Bonomi MR. A new approach to determine tumor-to-blood ^{10}B concentration ratios from the clinical outcome of a BNCT treatment. *Appl Radiat Isot*. 2004b; 61(5): 923-8.

Gossio S, Carando DG, González SJ. A computational dosimetry tool for the study of tumor doses and skin toxicities in BNCT. *Appl Radiat Isot*. 2009; 67(7-8 Suppl): S145-8.

Green S. Developments in accelerator based boron neutron capture therapy. *Radiat Phys Chem*. 1998; 51(4-6): 561-9.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010; 140(6): 883–99.

Ha PK, Califano JA. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003; 14(5): 363-9.

Haginomori S, Miyatake S, Inui T, Araki M, Kawabata S, Takamaki A, Lee K, Takenaka H, Kuroiwa T, Uesugi Y, Kumada H, Ono K. Planned fractionated boron neutron capture therapy using epithermal neutrons for a patient with recurrent squamous cell carcinoma in the temporal bone: a case report. *Head Neck*. 2009; 31(3): 412-8.

Halfon S, Paul M, Arenshtam A, Berkovits D, Bisyakoev M, Eliyahu I, Feinberg G, Hazenshrung 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), 2010, Buenos Aires, Argentina.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74.

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*. 1994; 28: 1175-81.

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

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*. 2005; 220(2): 185-95.

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*. 2004; 49(4): 313-24.

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*. 2006; 51(10): 922-9.

Heber EM, Aromando RF, Trivillin VA, Itoiz ME, Nigg DW, Kreimann EL, Schwint AE. Therapeutic effect of boron neutron capture therapy (BNCT) on field cancerized tissue: inhibition of DNA synthesis and lag in the development of second primary tumors in precancerous tissue around treated tumors in DMBA-induced carcinogenesis in the hamster cheek pouch oral cancer model. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(3): 273-9.

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.* 2012; 51(2): 195-204.

Henriksson R, Capala J, Michanek A, Lindahl SA, Salford LG, Franzén L, Blomquist E, Westlin JE, Bergenheim AT; Swedish Brain Tumour Study Group. Boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma multiforme: a phase II study evaluating a prolonged high-dose of boronophenylalanine (BPA). *Radiother Oncol.* 2008; 88(2): 183-91

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.* 2011; 43(1):52-8.

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.* 2003; 62(1-2): 145-56.

Hiratsuka J, Morita N, Aihara T, Imajo Y, Maruhashi A, Ono K. First clinical trial of boron neutron capture therapy for thyroid cancer. In: *Advances in Neutron Capture Therapy 2006* (Proceedings of 12th International Congress on Neutron Capture Therapy), 2006, Takamatsu, Japón.

Hoebbers F, Heemsbergen W, Moor S, Lopez M, Klop M, Tesselaar M, Rasch C. Reirradiation for head-and-neck cancer: delicate balance between effectiveness and toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 81(3):e1111-8.

Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol.* 2006; 42(5): 461-74.

Hopewell JW, Morris GM, Schwint A, Coderre JA. The radiobiological principles of boron neutron capture therapy: a critical review. *Appl Radiat Isot.* 2011; 69(12): 1756-9.

Hsue SS, Wang WC, Chen YK, Lin LM. Expression of inhibitors of apoptosis family protein in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinogenesis is associated with mutant p53 accumulation and epigenetic changes. *Int J Exp Pathol*. 2008; 89(5): 309–20.

Humayun S and Ram Prasad V. Expression of p53 protein and ki-67 antigen in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. *Natl J Maxillofac Surg*. 2011; 2(1): 38–46.

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, 2011, Hsinchu, Taiwan*.

Janjan NA, Weissman DE, Pahule A. Improved pain management with daily nursing intervention during radiation therapy for head and neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992; 23(3): 647-52.

Javid M, Brownell GL, Sweet WH. The possible use of neutron-capturing isotopes such as boron 10 in the treatment of neoplasms. II. Computation of the radiation energies and estimates of effects in normal and neoplastic brain. *J Clin Invest*. 1952; 31(6): 604-10.

Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman, D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61: 69–90.

Jham BC, da Silva Freire AR. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006; 72(5): 704-8.

Jin Y, Tipoe GL, White FH, Yang L. A quantitative investigation of immunocytochemically stained blood vessels in normal, benign, premalignant and malignant human oral cheek epithelium. *Virchows Arch*. 1995; 427(2): 145-51.

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*. 2011; 69(12): 1778-81.

Kageji T, Mizobuchi Y, Nagahiro S, Nakagawa Y, Kumada H. Clinical results of boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma. *Appl Radiat Isot*. 2011; 69(12): 1823-5.

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.* 2007; 69(2): 475-82.

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.* 2011; 80(2): 369-76.

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.* 2012; 82(1): e67-75.

Kastenbauer E, Wollenberg B. In search of new treatment methods for head-neck carcinoma. *Laryngorhinootologie.* 1999; 78(1): 31-5.

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.* 2004; 61(5): 1069-73.

Kingsbury JS, Cecere W, Mang TS, Liebow C. Photodynamic therapy for premalignant lesions in DMBA-treated hamsters: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55(4): 376- 81; discussion 381-2.

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

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), 2010, Buenos Aires, Argentina.

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.* 2001a; 61(24): 8775-81.

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.* 2001b; 61(24): 8638-42.

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.* 2003; 48(3):223-32.

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.* 2011; 69(12): 1672-5.

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.* 2003; 18(2): 155-63.

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, 2011*, Hsinchu, Taiwan.

Laconi E, Sonnenschein C. Cancer development at tissue level. *Semin Cancer Biol.* 2008; 18(5): 322–9.

Laconi E, Doratiotto S, Vineis P. The microenvironments of multistage carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2008; 18(5): 322–9.

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).

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).

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.* 2006; 16(4): 167-78.

Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006; 66: 605–12.

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.* 2004; 61(5): 1095-100.

Lin MH, Hsieh SY, Li SY, Shih HC, Chiang J, McBride J, Todd R, Chou LS, Chou MY, Wong DT. Sequential cytogenetic alterations in hamster oral keratinocytes during DMBA-induced oral carcinogenesis. *Eur J Cancer Oral Oncol.* 1994; 30B(4): 252–64.

Lin W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007; 117(5): 1175–83.

Lingen MW, DiPietro LA, Solt DB, Bouck NP, Polverini PJ. The angiogenic switch in hamster buccal pouch keratinocytes is dependent on TGFbeta-1 and is unaffected by ras activation. *Carcinogenesis.* 1997; 18(2): 329–38.

Locher GL. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons. *Am J Roentgenol.* 1936; 36: 1-13.

Longhino JM, Blaumann HR. Current status of the RA-6 BNCT facility. In: *New Challenges in Neutron Capture Therapy 2010* (Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy), 2010, Buenos Aires, Argentina.

López Castaño F, Oñate-Sánchez RE, Roldán-Chicano R, Cabrerizo-Merino MC. Measurement of secondary mucositis to oncohematologic treatment by means of different scale. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 10(5): 412–21.

Masunaga S, Kasaoka S, Maruyama K, Nigg D, Sakurai Y, Nagata K, Suzuki M, Kinashi Y, Maruhashi A, Ono K. The potential of transferrin-pendant-type polyethyleneglycol liposomes encapsulating decahydrodecaborate-(10)B (GB-10) as (10)B-carriers for boron neutron capture therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 66(5): 1515-22.

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.* 2012; 85(1011): 249-58.

Medeiros CA, Leitão RF, Macedo RN, Barboza DR, Gomes AS, Nogueira NA, Alencar NM, Ribeiro RA, Brito GA. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67(5): 1085-100.

Menakuru SR, Brown NJ, Staton CA, Reed MW. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Br J Cancer*. 2008; 99(12): 1961-6.

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*. 2009; 67(7-8 Suppl): S50-3.

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*. 2009; 67(7-8 Suppl): S226-9.

Mishima Y, Ichihashi M, Hatta S, Honda C, Yamamura K, Nakagawa T. New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma. Melanogenesis-seeking ^{10}B molecular-melanoma cell interaction from in vitro to first clinical trial. *Pigment Cell Res*. 1989; 2: 226-34.

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*. 1989; 1: 388-9.

Mishima Y. Melanoma and nonmelanoma neutron capture therapy using gene therapy: overview. In: *Advances in neutron capture therapy*. Vol I, Medicine and Physics (B. Larsson, J. Cranford and R. Weinreich, Eds.) pp.10-25. Elsevier (1997).

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), 2010, Buenos Aires, Argentina.

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*. 2011; 175(4): 463-72.

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*. 2012; 177(1): 59-68.

Molinari AJ, Aromando RF, Itoiz ME, Garabalino MA, Monti Hughes A, Heber EM, Pozzi EC, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE. Blood vessel normalization in the hamster oral cancer model for experimental cancer therapy studies. *Anticancer Res.* 2012; 32(7): 2703-9.

Morris AL. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J. Dent. Res.* 1961; 40(1): 3–15.

Morris AL, Reiskin AB. Hamster cheek pouch response to varying lengths of carcinogen exposure. *J Dent Res.* 1965; 44: 664-7.

Multhoff G, Radons J. Radiation, inflammation, and immune responses in cancer. *Front Oncol.* 2012; 2: 58.

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.* 2009; 45(6): e31-7.

Nakagawa Y, Kageji T, Mizobuchi Y, Kumada H, Nakagawa Y. Clinical results of BNCT for malignant brain tumors in children. *Appl Radiat Isot.* 2009; 67(7-8 Suppl): S27-30.

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.* 1996; 34: 1081-6.

Ono K, Masunaga S, Suzuki M, Kinashi Y, Takagaki M, Akaboshi M. The combined effect of boronophenylalanine and borocaptate in boron neutron capture therapy for SCCVII tumors in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999; 43(2): 431-6.

Ono K, Kinashi Y, Suzuki M, Takagaki M, Masunaga SI. The combined effect of electroporation and borocaptate in boron neutron capture therapy for murine solid tumors. *Jpn J Cancer Res.* 2000; 91(8): 853-8.

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.* 2009; 95(2): 169-76.

Papaspyrou M, Feinendegen LE, Müller-Gärtner HW. Preloading with L-tyrosine increases the uptake of boronophenylalanine in mouse melanoma cells. *Cancer Res.* 1994; 54(24): 6311-4.

Raimondi AR, Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34(1): 17-22.

Perona M, Pontiggia O, Carpano M, Thomasz L, Thorp S, Pozzi E, Simian M, Kahl S, Juvenal G, Pisarev M, Dargosa A. In vitro studies of cellular response to DNA damage induced by boron neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot.* 2011; 69(12): 1732-6.

Portu A, Molinari AJ, Pozzi ECC, Thorp SI, Schwint AE, Saint Martin G. Spatial Distribution of ^{10}B Delivered by GB-10 en Sequential BNCT: Autoradiography Analysis in the Hamster Cheek Pouch Oral Cancer Model. *Proceedings 6th Young Researchers BNCT Meeting, 2011, Hsinchu, Taiwan.*

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.* 2007; 97: 309–11.

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.* 2009; 67(7-8 Suppl): S309-12.

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.* 2012; 51(3): 331-9.

Pulkkanen KJ, Yla-Herttuala S. Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Mol Ther.* 2005; 12(4): 585-98.

Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer.* 2009; 45(11): 1924-34.

Raimondi A, Cabrini R, Itoiz ME. Ploidy analysis of field cancerization and cancer development in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34(4): 227–31.

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.* 2004; 61(5): 947-52.

Räsänen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res.* 2010; 316 (17): 2713-22.

Ruiz-Esquide G, Nervi B, Vargas A, Maíz A. Treatment and prevention of cancer treatment related oral mucositis. *Rev Med Chil.* 2011; 139(3): 373-81.

Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J. Dent. Res.* 1954; 33(2): 253–62.

Salley JJ. Histologic changes in the hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. *J Dent Res.* 1957; 36(1): 48-55.

Santa Cruz GA, Bertotti J, Marín J, González SJ, Gossio S, Alvarez D, Roth BM, Menéndez P, Pereira MD, Albero M, Cubau L, Orellano P, Liberman SJ. Dynamic infrared imaging of cutaneous melanoma and normal skin in patients treated with BNCT. *Appl Radiat Isot.* 2009; 67(7-8 Suppl): S54-8.

Sarode SC, Sarode GS, Tupkari JV. Oral potentially malignant disorders: Precising the definition. *Oral Oncol.* 2012; 48(9): 759-60.

Schulte-Herman R, Grasl-Kraupp B, Bursch W. Tumor development and apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994; 105: 363-7.

Schwint AE, Savino TM, Lanfranchi HE, Marschoff E, Cabrini RL, Itoiz ME. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of human oral mucosa. *Cancer.* 1994; 73: 2674-9.

Schwint AE, Folco A, Morales A, Cabrini RL, Itoiz ME. AgNOR mark epithelial foci in malignant transformation in hamster cheek pouch carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25(1): 20-4.

Shih A, Miaskowski C, Dodd MJ, Stotts NA, MacPhail L. Mechanisms for radiation-induced oral mucositis and the consequences. *Cancer Nurs.* 2003; 26(3): 222-9.

Shin DM, Gimenez IB, Lee JS, Nishioka K, Wargovich MJ, Thacher S, Lotan R, Slaga TJ, Hong WK. Expression of epidermal growth factor receptor, polyamine levels, ornithine decarboxylase activity, micronuclei, and transglutaminase I in a 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Cancer Res.* 1990; 50(8): 2505–10.

Shklar G, Eisenberg E, Flynn E. Immunoenhancing agents and experimental leukoplakia and carcinoma of the buccal pouch. *Prog Exp Tumor Res.* 1979; 24: 269-82.

Shrivastav N, Li D, Essigmann JM. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 59-70.

Silverman S, Griffith M. Smoking characteristics of patients with oral carcinoma and the risk for second oral primary carcinoma. *J Am Dent Assoc*. 1972; 85(3): 637-40.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953; 6: 963-8.

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*. 1996; 56: 4302-6.

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).

Smith BD and Haffty BG. Molecular Markers as prognostic factors for local recurrence and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiat. Oncol. Invest*. 1999; 7(3): 125-44.

Snyder HR, Reedy AJ, Lennarz WJ. Synthesis of aromatic boronic acids. Aldehyde boronic acids and boronic acid analog of tyrosine. *J Am Chem Soc*. 1958; 80: 835-8.

Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990; 69(4): 437-443.

Song C, Appleyard V, Murray K, Frank T, Sibbett W, Cuschieri A, Thompson A. Thermographic assessment of tumor growth in mouse xenografts. *Int J Cancer*. 2007; 121(5): 1055-8.

Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Mason L, Login G, Ymamkawa M, Moses G, Bouchard P, Hayes LL, Bedrosian C, Dorner AJ. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol*. 2000; 36(4): 373-81.

Sonis ST. A biological approach to mucositis. *J Support Oncol*. 2004; 2(1): 21-32; discussion 35-6.

Sonis ST. Pathobiology of Oral Mucositis: Novel Insights and Opportunities. *J Support Oncol*. 2007; 5: 3-11.

Sonis ST. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncol.* 2009; 45(12): 1015-20.

Stelzer KJ, Gavin PR, Risler R, Kippenes H, Hawthorne MF, Nigg DW, Laramore GE. 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).

Sternberg LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970; 18: 315-30.

Sweet WH, Javid M. The possible use of slow neutrons plus boron-10 in the therapy of intracranial tumors. *Trans Amer Neurol Ass.* 1951; 76: 60-3.

Sweet WH, Soloway AH, Brownell GL. Studies relevant to slow neutron capture therapy of brain tumor. *Acta Unio Int Contra Cancrum.* 1960; 16:1216-9.

Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol.* 2011; Volume 2011, Article ID 603740, 10 pages.

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

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.* 2004; 61(5): 939-45.

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 BNCTradiobiology. *Radiat Res.* 2006; 166(2): 387-96.

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.* 2008; 47(1): 147-55.

Trivillin VA, Garabalino MA, Colombo L, Monti Hughes A, Pozzi ECC, Bortolussi S, Altieri S, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Schwint AE. Biodistribution of BPA and GB-10 for BNCT in an

experimental model of lung metastases in BDIX rats. In: *Proceedings of 15th International Congress on Neutron Capture Therapy*, 2012, Tsukuba, Japan.

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*. 2011; 69(12): 1765-7.

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*. 2008; 44(4): 315-24.

van der Waal I and Scully C. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa. *Dental update* 2011, 1-4.

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*. 2011; 69(12): 1803-6.

Wagner FM, Loeper-Kabasakal B, Breitzkreutz H. Neutron medical treatment of tumours — a survey of facilities. In: *2nd International Workshop on Fast Neutron Detectors and Applications*, 2011, Ein Gedi, Israel. PUBLISHED BY IOP PUBLISHING FOR SISSA MEDIALAB, 2012.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36(10): 575-80.

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*. 2008; 37(3): 127-33.

Weber CE, Kuo PC. The tumor microenvironment. *Surg Oncol*. 2012; 21(3): 172-7.

Wittig A, Sauerwein WA, Coderre JA. Mechanisms of transport of p-borono-phenylalanine through the cell membrane in vitro. *Radiat Res*. 2000; 153(2): 173-80.

Wittig A, Malago M, Collette L, Huiskamp R, Bührmann S, Nievaart V, Kaiser GM, Jöckel KH, Schmid KW, Ortmann U, Sauerwein WA. Uptake of two ^{10}B -compounds in liver metastases of colorectal adenocarcinoma for extracorporeal irradiation with boron neutron capture therapy (EORTC Trial 11001). *Int J Cancer*. 2008a; 122(5): 1164-71.

Wittig A, Michel J, Moss RL, Stecher-Rasmussen F, Arlinghaus HF, Bendel P, Mauri PL, Altieri S, Hilger R, Salvadori PA, Menichetti L, Zamenhof R, Sauerwein WA. Boron analysis and boron imaging in biological materials for boron neutron capture therapy (BNCT). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008b; 68(1): 66-90.

Wittig A, Collette L, Appelman K, Bührmann S, Jäckel MC, Jöckel KH, Schmid KW, Ortmann U, Moss R, Sauerwein WA. EORTC trial 11001: distribution of two ^{10}B -compounds in patients with squamous cell carcinoma of head and neck, a translational research/phase 1 trial. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(8B): 1653-65.

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*. 2011; 69(12): 1760-4.

Wynder EL, Mushinski MH, Spivak JC. Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. *Cancer*. 1977; 40(4 Suppl): 1872-8.

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*. 2011; 69(12): 1854-7.

Yanch JC, Shortkroff S, Shefer RE, Johnson S, Binello E, Griega D, Jones AG, Young G, Vivieros C, Davison A, Sledge C. Boron neutron capture synovectomy: treatment of rheumatoid arthritis based on the $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ nuclear reaction. *Med Phys*. 1999; 26(3), 364-75.

Yang Y, Ge J-P, Zhou Z-T. Effects of thalidomide on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamster with respect to angiogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2009; 38: 455-62.

Yasui L, Kroc T, Gladden S, Andorf C, Bux S, Hosmane N. Boron neutron capture in prostate cancer cells. *Appl Radiat Isot*. 2012; 70(1): 6-12.

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*. 2002; 187(1-2): 135-41.

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*. 1989; 165: 127-9.

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* 2006; 41: 484-95.