Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer bucal: desarrollo de nuevas modalidades de BNCT, evaluación de su radiobiología, eficacia terapéutica y potencial radiotoxicidad en un modelo de hámster

Molinari, Ana Julia

2013

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:
Molinari, Ana Julia. (2013). Captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer bucal: desarrollo de nuevas modalidades de BNCT, evaluación de su radiobiología, eficacia terapéutica y potencial radiotoxicidad en un modelo de hámster. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Molinari, Ana Julia. "Captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer bucal: desarrollo de nuevas modalidades de BNCT, evaluación de su radiobiología, eficacia terapéutica y potencial radiotoxicidad en un modelo de hámster". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer bucal: desarrollo de nuevas modalidades de BNCT, evaluación de su radiobiología, eficacia terapéutica y potencial radiotoxicidad en un modelo de hámster

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

Ana Julia Molinari

Director de tesis: Amanda Elena Schwint

Consejero de estudios: Lilia Lauría

Lugar de Trabajo: Comisión Nacional de Energía Atómica

Buenos Aires, 2013

Captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento del cáncer bucal: desarrollo de nuevas modalidades de BNCT, evaluación de su radiobiología, eficacia terapéutica y potencial radiotoxicidad en un modelo de hámster

La Captura Neutrónica en Boro (BNCT) es una terapia binaria que se basa en la acumulación selectiva de compuestos borados dentro del tumor y la subsiguiente irradiación con neutrones térmicos. La reacción de captura que se produce entre el ^{10}B y los neutrones genera partículas letales de corto alcance que dañan el tumor sin causar daño significativo al tejido normal. Previamente en nuestro laboratorio se reportó el éxito terapéutico de una única aplicación de BNCT mediada por los compuestos borados borofenilalanina (BPA), decahidrodecaborato de sodio (GB-10) o la administración combinada de ambos, para el tratamiento del cáncer bucal en un modelo de hámster. Si bien los resultados en términos de eficacia terapéutica fueron muy buenos, pueden ser mejorados. En este trabajo de tesis, buscamos optimizar la terapia de BNCT potenciando el control tumoral y minimizando su radiotoxicidad. Para ello desarrollamos una nueva modalidad terapéutica denominada BNCT secuencial (BPA-BNCT seguido de GB-10-BNCT luego de 24 ó 48 horas), establecimos un método para inducir la normalización de los vasos sanguíneos tumorales (con talidomida) y evaluamos el efecto de esta normalización en la eficacia terapéutica del BNCT mediado por BPA. Complementariamente estudiamos la combinación de ambas modalidades (normalización con talidomida y BNCT secuencial). Asimismo, realizamos un análisis exhaustivo de los posibles cambios en la microdistribución de los compuestos borados por autorradiografía neutrónica. En el presente estudio demostramos que el BNCT secuencial mejora el control del cáncer bucal, que el tratamiento previo con talidomida aumenta la eficacia terapéutica del BNCT mediado por BPA a través de la normalización de los vasos sanguíneos aberrantes del tumor, y que con el tratamiento con talidomida previo al BNCT secuencial se alcanza una respuesta tumoral total (respuesta completa + parcial) del 100% de los tumores. Además, en todos los casos se redujo la radiotoxicidad en el tejido precanceroso circundante al tumor.

PALABRAS CLAVES: terapia por captura neutrónica en boro (BNCT), cáncer bucal, bolsa de la mejilla del hámster, normalización, mucositis, autorradiografía neutrónica.

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for the treatment of oral cancer: development of new BNCT protocols, evaluation of radiobiology, therapeutic efficacy and radiotoxicity in a hamster model

Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) is based on targeting of tumor cells with boron compounds followed by irradiation with thermal neutrons. The capture reaction that occurs between the ^{10}B and the neutrons generates short-range lethal particles that destroy the tumor cells but spare normal tissue. We previously reported the therapeutic success of a single application of BNCT mediated by boronophenylalanine (BPA), decahydrodecaborate (GB-10) or by the combined administration of BPA and GB-10, for the treatment of oral cancer in the hamster cheek pouch experimental model. These previous BNCT studies showed marked therapeutic efficacy but left room for improvement. In this thesis, we explored the way to improve the therapeutic effect without causing unacceptable toxicity in normal or dose-limiting precancerous tissue. Here we developed a novel approach to BNCT termed Sequential BNCT based on the sequential application of BPA-BNCT followed by GB-10-BNCT with an interval of 24 or 48 h between the two treatments. We developed a technique to normalize aberrant blood vessels with thalidomide and assessed its effect prior to the administration of BPA on the therapeutic efficacy of BNCT. As a third new protocol we studied the combination of both modalities, thalidomide treatment prior to Sequential BNCT. Additionally, we performed an autoradiography analysis to explore potential changes in boron microdistribution and content that are not detectable by gross boron measurements. We can conclude based on the observations reported in this thesis that Sequential BNCT enhanced tumor response, that the pretreatment with thalidomide prior to BNCT mediated by BPA was therapeutically beneficial, and that tumor blood vessel normalization before Sequential BNCT controlled the entire population of tumors. For all the new protocols, no extra cost in terms of mucositis in the dose-limiting precancerous tissue was observed.

KEYWORDS: Boron Neutron Capture Therapy (BNCT), oral cancer, hamster cheek pouch, normalization, mucositis, autoradiography.

Agradecimientos

A Mandy por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis. A Verónica, Emiliano, Andrea y Marcela. A Lisien por tantas palabras de aliento y haberme apoyado hasta el final de este trabajo.

A Gisele por el tiempo y dedicación que le otorgó a las autorradiografías, por tantas charlas y buenos momentos compartidos. A Agus por su dedicación al trabajo, por ayudarme generosa e incondicionalmente, por ser mi colaboradora y maestra, pero fundamentalmente por ser mi amiga. Sin ella nunca se hubiera concretado una gran parte de este trabajo.

A Mariel y Romina por la colaboración con la histo-patología. Al Dr. Cabrini por su generosidad a la hora de transmitir y compartir sus conocimientos conmigo. A Daniel por su asesoramiento y confianza.

A Silvia y Paula por toda la ayuda brindada durante las irradiaciones, y por el profesionalismo con que se desempeñan.

A María Teresa por la paciencia que tuvo enseñándome y ayudándome con los temas administrativos. A Euge y Sabri por el café de todas las mañanas, pero especialmente por los buenos momentos compartidos que siempre me ayudaron a levantar el ánimo. A Moni por su optimismo hacia mi trabajo y ayuda académica.

A Triquim S.A. y el Laboratorio Lazar por haber confiado en nuestro proyecto y proveernos gratuita y gentilmente la Talidomida.

A Nico por haberme alentado a realizar el doctorado, por acompañarme desde los inicios de mi carrera, por seguir siendo mi amigo a pesar de las distancias, y por enseñarme todo lo referente al sistema.

A mi marido y gran amor, Luis Otegui, por haberme dado buenas ideas, por compartir su conocimiento con nuestro grupo de trabajo, por haberme enseñado las técnicas quirúrgicas necesarias, por ayudarme a sobrellevar los momentos más difíciles, por darme buenos consejos, y fundamentalmente por haberme aguantado estoicamente durante todos estos años de trabajo.

Especialmente a mi madre, por haberme inculcado los valores, la rectitud y tenacidad que resultaron fundamentales para mi labor científica, y fundamentalmente por haberme enseñado a enfrentar la vida hasta en el contexto más adverso.

A mi familia, la de siempre
y la más reciente.

Índice

Publicaciones..... 8
Listado de abreviaturas y acrónimos 9

INTRODUCCIÓN 10
1. Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) 11
2. Fuentes de neutrones 15
3. Radiobiología 18
4. Compuestos borados 21
5. Cáncer 30
   5.1 Cáncer de cabeza y cuello 33
   5.2 Mucositis 37
6. Modelos Animales 41
   6.1 Modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster 43
7. Historia y antecedentes clínicos de BNCT 47
   7.1 Tumores cerebrales malignos 48
   7.2 Melanomas cutáneos 52
   7.3 Tumores de cabeza y cuello 53
   7.4 Otras patologías 55
8. Proyecto BNCT en la Comisión Nacional de Energía Atómica 56

OBJETIVOS GENERALES 60
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 61

MATERIALES Y MÉTODOS..... 63
1. Inducción de tumores en la bolsa de la mejilla del hámster y cuidado de los animales 64
2. Preparación de soluciones de boro 65
3. Estudios de biodistribución 66
   3.1 Biodistribuciones con BPA 67
   3.2 Biodistribuciones con GB-10 67
   3.3 Biodistribuciones con BPA + GB-10 67
4. Valoración de Boro 68
   4.1 Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivo (ICP-OES) 68
   4.2 Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) 70
   4.3 Autorradiografía neutrónica 71
5. Tratamiento con talidomida 73
6. Ensayo de permeabilidad de vasos sanguíneos 74
7. Morfología de vasos sanguíneos 76
8. BNCT *in vivo* 77
   8.1 BNCT secuencial 79
   8.2 "Normalización" de vasos sanguíneos tumorales en BNCT 80
   8.3 "Normalización" de vasos sanguíneos tumorales + BNCT secuencial 82
9. Seguimiento post BNCT 82

9.1 Evolución natural de la enfermedad 83
10. Evaluación de la Mucositis 84
11. Análisis estadístico 85

CAPÍTULO 1 86
BNCT SECUENCIAL
1. Introducción 87
2. Resultados 90
3. Discusión 101

CAPÍTULO 2 105
NORMALIZACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS TUMORALES
1. Introducción 106
2. Resultados 113
2.1 Estudios de toxicidad 113
2.2 Examinación macroscópica y microscópica de la bolsa 114
2.3 Ensayo de permeabilidad vascular 115
2.4 Morfología de los vasos sanguíneos 116
2.5 BNCT *in vivo* 117
3. Discusión 126

CAPÍTULO 3 132
COMBINACIÓN DE LA NORMALIZACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS CON BNCT SECUENCIAL
1. Introducción 133
2. Resultados 134
3. Discusión 145

CAPÍTULO 4 149
ANÁLISIS POR AUTORRADIOGRAFÍA NEUTRÓNICA
1. Introducción 150
2. Resultados 158
2.1 BNCT secuencial 158
2.2 Tratamiento con talidomida 170
2.3 Tratamiento con talidomida + BNCT secuencial 172
3. Discusión 176
3.1 BNCT secuencial 176
3.2 Tratamiento con talidomida 179
3.3 Tratamiento con talidomida + BNCT secuencial 180

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES 182

REFERENCIAS 196

Publicaciones

Este trabajo de tesis dio lugar a 3 publicaciones en revistas internacionales con referato de pares:

"Sequential" boron neutron capture therapy (BNCT): a novel approach to BNCT for the treatment of oral cancer in the hamster cheek pouch model.
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.
Radiat Res. 2011; 175(4):463-72.

Tumor blood vessel "normalization" improves the therapeutic efficacy of boron neutron capture therapy (BNCT) in experimental oral cancer.
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.
Radiat Res. 2012; 177(1):59-68.

Blood vessel normalization in the hamster oral cancer model for experimental cancer therapy studies.
Molinari AJ, Aromando RF, Itoiz ME, Garabalino MA, Monti Hughes A, Heber EM, Pozzi EC, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE.
Anticancer Res. 2012; 32(7):2703-9.

Listado de abreviaturas y acrónimos

4 NQO: tetradecanoilforbol
AQL: autorradiografía neutrónica cualitativa
AQT: autorradiografía neutrónica cuantitativa
BHE: barrera hematoencefálica
BNCT: Boron Neutron Capture Therapy ó Terapia por Captura Neutrónica en Boro
BNL: Brookhaven National Laboratory
BPA: borofenilalanina
CBE: eficacia biológica del compuesto
CNEA: Comisión Nacional de Energía Atómica
CR-39: marca comercial de PADC
DE: desvío estándar
DMBA: dimetilbenzantraceno
DMSO: dimetilsulfóxido
DSPC: distearoilfosfatidilcolina
EBD: colorante Azul de Evans
EE: error estándar
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
FiR 1: Finnish Reactor 1
GB-10: decahidrodecaborato de sodio
GBM: glioblastoma
GMPs: proliferaciones microvasculares glomeruloideas
GNPs: nanopartículas coloidales de oro
Gy: Gray
Gy-Eq: Gray equivalentes
HER2: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
i.p.: intraperitoneal
i.v.: intravenoso
ICP-MS: espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
ICP-OES: espectrometría de emisión óptica con plasma inductivo
IFP: presión de fluido intersticial
IO-BNCT: BNCT intra operatorio
JRR4: Japan Research Reactor 4
KURR: Kyoto University Research Reactor
LET: transferencia lineal de energía
MIT: Massachusetts Institute of Technology
MPM: mesotelioma maligno pulmonar
NUMF: no unusual microscopic features
OMS: Organización Mundial de la Salud
OSCC: carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal
p.c.: peso corporal
PADC: polialildiglicol carbonato
PET: tomografía de emisión de positrones
PGNAA: activación neutrónica de radiación gamma instantánea ó prompt gamma
PMD: tejido con alteraciones potencialmente malignas
PMGs: proliferaciones microvasculares glomeruloideas
RA: relación de aspecto
RA-3: Reactor Argentino 3
RA-6: Reactor Argentino 6
RBE: eficacia biológica relativa
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROS: especies reactivas de oxígeno
SCC: carcinoma de células escamosas
SLCs: cajas pequeñas de Lexan
SSNTDs: detectores de trazas nucleares de estado sólido
TGF: factor de crecimiento tumoral
VADS: vías aéreas digestivas superiores
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial
VIH: virus de inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

1. Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT)

La terapia por Captura Neutrónica en Boro (Boron Neutron Capture Therapy o BNCT) es una modalidad de tratamiento binario que puede actuar selectivamente sobre un tejido neoplásico. Se basa en la acumulación selectiva de compuestos transportadores de ^{10}B en el tumor y la subsiguiente irradiación con neutrones térmicos o epitérmicos. Este concepto sencillo fue publicado por primera vez por Gordon Locher en el año 1936. Cada una de las componentes de esta terapia binaria puede ser manipulada independientemente. Sólo cuando ambas se encuentren juntas se obtendrá un resultado terapéutico sobre el tumor. La componente neutrónica de esta terapia, en sí misma, tiene muy poco efecto en el tumor o en el tejido normal ya que los neutrones térmicos tienen energía insuficiente para dañar el tejido (< 0,4 eV). Al ser irradiado con neutrones de baja energía, el isótopo estable del boro (^{10}B) captura un neutrón desencadenando una reacción de captura que da lugar a la formación de un átomo de ^{11}B que se escinde en 10^{-12} segundos generando una partícula alfa (^{4}He) y un núcleo de ^{7}Li de alta transferencia lineal de energía (LET), que son emitidas en direcciones opuestas (Coderre JA y Morris GM, 1999; Coderre JA et al., 2003). Esta reacción de captura tiene dos posibles canales de salida:

$$
\begin{aligned}
{}^{10}B + {}^{1}n \rightarrow \left[{}^{11}B\right] &\rightarrow {}^{7}Li + {}^{4}He + 2{,}79\,MeV \\
&\rightarrow {}^{7}Li + {}^{4}He + 2{,}3\,MeV + \gamma\left(0{,}48\,MeV\right)
\end{aligned}
$$

En el 94% de los casos el ^{7}Li queda en un estado exitado, por lo que regresa a su estado fundamental tras la emisión de un rayo gamma (ɣ), mientras que en el 6% restante, el ^{7}Li es emitido en su estado fundamental. Las partículas emitidas por la reacción de captura tienen una trayectoria definida, independiente del espesor de la muestra. Estas partículas de alto LET son suficientes para causar un daño letal o esterilizar las células donde se produce la reacción. Asimismo, el corto

alcance de la partícula α (9 µm) y litio (5 µm), limita el daño a las células que contienen ^{10}B. En las células normales (que contienen menor cantidad de boro que las células tumorales) se producirán menos reacciones de captura (Figura 1). El LET es una medida de densidad de las ionizaciones producidas cuando una radiación interactúa con el tejido. A mayor LET habrá más cantidad de ionizaciones y por lo tanto mayor daño. Dentro de este contexto, las partículas de alto LET son más eficientes en producir daño que la radiación de bajo LET, como los rayos X o gamma usados normalmente en radioterapia (Gabel D et al., 1984).

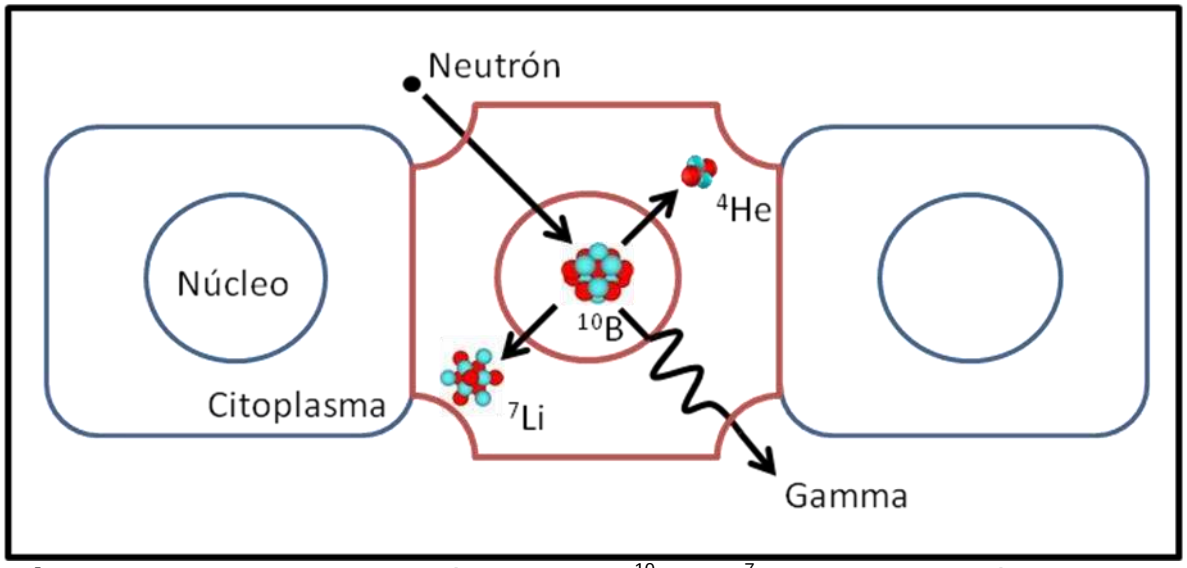


Figura 1 – Esquema de la reacción de captura $^{10}B(n, \alpha)^{7}Li$ dentro de una célula tumoral (representada en rojo), rodeada de células normales (representadas en azul).

El ^{10}B tiene una alta sección eficaz para la reacción de captura de neutrones de baja energía, y dado que es un elemento no tóxico ha sido el nucleído de elección en el desarrollo de la Terapia por Captura Neutrónica, dando origen al BNCT.

De los elementos que componen los tejidos humanos, el hidrógeno y el nitrógeno, muestran una tasa positiva de reacciones de captura. A pesar que dichas tasas son pequeñas comparadas con la del boro, la inevitable presencia de hidrógeno y nitrógeno en concentraciones bastante altas conduce a una liberación de energía ineludible y deposición de dosis en los tejidos expuestos a los

neutrones térmicos (Gabel D, 1994). La reacción de captura en hidrógeno produce rayos γ, mientras que en nitrógeno produce protones.

Para garantizar el éxito terapéutico se debe alcanzar una importante diferencia de concentración de los compuestos transportadores de ^{10}B entre las células normales y las tumorales y una concentración absoluta de ^{10}B en tumor suficiente para que se produzcan las reacciones de captura necesarias para dañar las células tumorales. Se ha estimado que se debe alcanzar una concentración de ^{10}B en tumor de al menos 20-30 µg/g de tejido. A pesar que, teóricamente, sólo es necesario que unas pocas partículas α descarguen su energía en una célula para que ésta muera, la probabilidad que un único átomo de boro y un neutrón interactúen es muy baja, y por eso se requiere un número alto de átomos de ^{10}B por célula. Además, el éxito del BNCT dependerá del contenido y distribución de boro tanto en tumor como en tejido normal, la fluencia de neutrones, la localización del tumor y su profundidad (Barth RF et al., 1996).

El conocimiento del contenido de boro en los tejidos es sumamente importante para el BNCT, especialmente en las áreas tumorales y en el tejido circundante. Para ello se realizan estudios de biodistribución, que consisten en administrar uno o varios compuestos borados según los protocolos a ensayar en la terapia. Desde el comienzo del protocolo, y hasta varias horas después, se toman muestras de sangre y, si es posible, de tumor y tejido normal en las cuales se analiza la concentración de boro. Estos datos permiten determinar la cantidad absoluta de boro en dichos tejidos y las relaciones tumor/tejido normal y tumor/sangre para luego calcular la dosis que se entregará al tumor y al resto de los tejidos durante el BNCT. Estos estudios también permiten determinar el tiempo óptimo post-administración en el cual se logra la mayor concentración de boro en tumor asociada a máximas relaciones respecto a los tejidos normales y la sangre. Desde el punto de vista clínico, es de relevancia estudiar la biodistribución de los compuestos borados en el tumor de interés, no sólo para corroborar datos previos, sino para obtener información adicional que permita optimizar los protocolos y mejorar el pronóstico de las patologías tratadas en los ensayos clínicos de BNCT (Liberman SJ et al., 2004). A pesar que se desarrollaron numerosos y sofisticados algoritmos computacionales para predecir las

concentraciones de boro en tumor basados en los niveles de boro en sangre o en la captación de ^{18}F-BPA[1] por tomografía de emisión de positrones (PET), todavía no es posible determinar en tiempo real cuál será la concentración de ^{10}B dentro del tumor en el momento del tratamiento (Barth RF, 2009). Hasta el momento, los cálculos de la concentración de boro en tumor durante la irradiación están basados en asumir que la relación tumor/sangre se mantiene constante durante el tiempo de irradiación (Gonzalez SJ et al., 2004a).

BNCT es la única radioterapia de alta dosis para el tratamiento del cáncer que es selectiva para tumor. Una única aplicación de BNCT parece ser más, o por lo menos igualmente eficaz, que la radioterapia convencional fraccionada (por ejemplo 60 Gy en 30 fracciones para glioblastoma) (Yamamoto T et al., 2008). Asimismo, como se trata de una terapia basada en el direccionamiento biológico en lugar del geométrico, sería particularmente útil para el tratamiento de micrometástasis no detectables. Sin embargo el procedimiento es uno de los más complejos de todas las terapias anti tumorales (Yamamoto T et al., 2008).

Los primeros tratamientos clínicos de BNCT se realizaron entre 1951 y 1962 en el Brookhaven National Laboratory (BNL) y en el Massachusetts Institute of Technology (MIT). Los resultados fueron muy pobres y los efectos colaterales inducidos por la radiación fueron severos. Pero luego del fracaso del BNCT en Estados Unidos, los clínicos japoneses mantuvieron viva la idea del BNCT (Gabel D, 1994). Si bien el BNCT fue pensado primariamente para tumores de cerebro, actualmente esta terapia se encuentra en ensayo clínico en el mundo para tumores de cerebro, melanoma y, más recientemente, para tumores de cabeza y cuello y metástasis de hígado (Barth RF et al., 2005; Barth RF et al., 2012).

---

[1] La borofenilalanina (BPA) es el compuesto transportador de boro más utilizado en BNCT, y puede marcarse con flúor radiactivo para cuantificarlo y localizarlo por tomografía de emisión de positrones.

2. Fuentes de neutrones

La energía de los neutrones involucrados en BNCT es mucho más baja que la usada en terapias de neutrones rápidos. La reacción de captura requiere un neutrón en el rango de energía térmica, < 0,4 eV. Los neutrones térmicos son atenuados exponencialmente como función de la profundidad en el tejido, principalmente por la captura en hidrógeno (Coderre JA y Morris GM, 1999). En los primeros ensayos clínicos de BNCT se utilizaron haces de neutrones térmicos para tratar pacientes con tumores profundos. Debido al corto camino libre de los neutrones térmicos, los niveles de flujo fueron insuficientes para proveer la fluencia total necesaria para que el tratamiento sobre tumores profundos fuera exitoso sin causar un daño excesivo al tejido normal; por ello y debido a la escasa selectividad de los compuestos borados por el tumor, fracasaron los primeros ensayos clínicos (Gahbauer R et al., 1998).

Alternativamente, se puede producir un haz de neutrones epitérmicos (1-10000 eV) usando moderadores o filtros que enlentezcan los neutrones rápidos en la región de energía neutrónica media o epitérmica. Se puede producir un haz epitérmico relativamente puro filtrando los neutrones térmicos residuales con absorbentes como boro o cadmio (Barth RF et al., 1990). Sin embargo, tienen un espectro de energía, y están "contaminados" por radiación gamma no deseada. Un requerimiento básico del BNCT es que la dosis entregada no exceda la tolerancia del tejido normal. Esta restricción se aplica al diseño de los haces de neutrones, la selección de compuestos borados, la elaboración de los protocolos de tratamiento, así como a la planificación del tratamiento (Barth RF et al., 2005).

Los ensayos clínicos iniciales para glioma multiforme se realizaron con neutrones térmicos provenientes de haces producidos por reactores de fisión. La inadecuada penetración del haz de neutrones térmicos (3-4 cm), condujo al equipo clínico del MIT/Harvard a introducir una irradiación intra-operatoria (a calota abierta) para incrementar la penetración de los neutrones. En ensayos clínicos posteriores, iniciados en el BNL y en el MIT a mediados de la década de 1990, se usaron por primera vez neutrones de mayor energía en el rango epitérmico (0,4 < E < 10keV). Estos neutrones más energéticos obviaron la

necesidad de utilizar el BNCT intra-operatorio cuando se tratan tumores a profundidades mayores que la penetración del haz de neutrones térmicos.

Los haces de neutrones epitérmicos son usados más frecuentemente en BNCT para tratar tumores más profundos. Se ha sugerido que, para garantizar el éxito terapéutico, esas facilidades cumplan con las siguientes condiciones:

1. Intensidad suficiente para entregar un campo de irradiación en pocos minutos y durante el tiempo de distribución óptima del boro tanto en tumor como en los tejidos normales sensibles localizados en el campo de irradiación con neutrones.
2. Adecuada penetración de neutrones para irradiar tumores profundos con una relación terapéutica significativamente superior a 1.
3. La facilidad de configuración para permitir la irradiación de los pacientes con varios campos en todos los sitios posibles del tumor.
4. Colimación y tamaño de apertura del haz variables.
5. Sistemas de seguimiento y control del haz precisos, fiables y automatizados.
6. Un cuarto de irradiación bien blindado con comunicación audiovisual entre el paciente y el cuerpo médico y con rápido acceso al paciente en todo momento.
7. Instalaciones para los exámenes del paciente, las infusiones de drogas, simulaciones de la configuración del haz, y planificación del tratamiento (Harling OK, 2009).

Para que la terapia por captura neutrónica sea exitosa se necesita una fluencia de 5 x 10^{12} neutrones cm^{-2} (Barth RF et al., 1990). Hasta el momento, sólo los reactores nucleares son capaces de generar esos haces (Burian J et al., 1997). Sin embargo, la demanda de más facilidades de irradiación epitérmica se verá incrementada significativamente si el BNCT alcanza una aceptación general como tratamiento oncológico de rutina. Para ello será necesario considerar modificaciones en los reactores existentes, diseñar nuevos reactores específicos para BNCT y fuentes basadas en aceleradores. Se espera que estas fuentes sean más fáciles de fabricar que los reactores. Los defensores de los aceleradores creen

que podrán hacerlos más compactos y menos costosos que los reactores (Harling OK, 2009). Asimismo, los aceleradores se podrían instalar en hospitales.

El desarrollo de fuentes de neutrones basadas en aceleradores ha sido de interés por al menos tres décadas. En el 14th International Congress en Neutron Capture Therapy, llevado a cabo en Buenos Aires en 2010, se presentaron más de veinte trabajos con progresos en la investigación en esta área. Pareciera, que en un futuro no muy lejano, habrá aceleradores que producirán haces con el suficiente flujo de neutrones con una energía similar a la producida por los reactores nucleares. Uno de estos aceleradores se está construyendo en el Centro atómico Constituyentes de la Comisión Nacional de Energía Atómica bajo la dirección del Dr. Kreiner (Kreiner AJ et al., 2011). Recientemente, en Japón, Sumitomo Haeavy Industries ha construido un acelerador cuyo uso clínico ha sido garantizado por el ministerio de salud japonés, y se ha anticipado que los ensayos clínicos comenzarán en este año (Barth RF et al., 2012).

Mundialmente, existen varios reactores que son utilizados para llevar a cabo proyectos clínicos de BNCT. Las irradiaciones del primer protocolo europeo se realizaron en el European High Flux Reactor de Petten, Holanda, conducido por el departamento de radioterapia de la universidad de Essen, Alemania (Sauerwein W y Zurlo A, 2002). El reactor de investigación FiR 1 de Espoo, Finlandia, es utilizado para el tratamiento de tumores recurrentes de cabeza y cuello (Kankaanranta L et al., 2012). En Japón sigue siendo muy utilizado el reactor de investigación JRR4 para el tratamiento de glioblastoma (Nakai K et al., 2011). El primer tratamiento de melanoma en Argentina fue realizado en el RA-6 del Centro Atómico Bariloche (Gonzalez SJ et al., 2004b).

Basado en el proyecto TAOrMINA de la Universidad de Pavía para el tratamiento ex–situ de metástasis hepáticas irresecables (Zonta A et al., 2006), en nuestro país, el cirujano de hígado Dr. Jorge Cardoso, propuso una técnica alternativa basada en un autotransplante parcial (Cardoso JE et al., 2007). Para llevar a cabo este tratamiento y otros posibles tratamientos de órganos ex–situ en Argentina, se construyó una nueva facilidad de irradiación en la columna térmica del reactor RA-3 en el Centro Atómico Ezeiza, Buenos Aires. Esta facilidad se encuentra a una hora de auto del Instituto de Oncología Dr. Ángel Roffo, uno de

los centros donde se podría realizar la cirugía. El RA-3 es un reactor de pileta abierta con una potencia máxima de 10 MW que es usado principalmente para la producción de radioisótopos y opera continuamente durante cinco días a la semana. A un lado de la pileta tiene una columna térmica de grafito que antes de la modificación no era accesible mientras el reactor estaba operando. Se construyeron blindajes y compuertas adicionales para poder introducir la muestra con el reactor funcionando. El flujo térmico en la posición más cercana al núcleo es de $(9\pm1)\ 10^{9}$ n cm^{-2} s^{-1}, suficiente para entregar las dosis requeridas en pocos minutos (Miller M et al., 2009). Debido a las características del haz y la comodidad de operación, se realizaron muchos experimentos biológicos en los últimos años. Estos incluyeron irradiaciones de pequeños animales (hámsteres y ratas), células tumorales y la caracterización del flujo neutrónico *in situ* en porciones de hígados vacunos y porcinos.

3. Radiobiología

La radiobiología del BNCT es compleja debido a la mezcla de radiaciones de alto y bajo LET dentro del campo de irradiación. Sin embargo, mucha de ésta complejidad ha sido aclarada (Coderre JA y Morris GM, 1999).

El daño al tejido producido por la captura neutrónica en boro se debe a la energía depositada por tres tipos de radiaciones ionizantes que difieren en su transferencia lineal de energía característica y, por lo tanto, en sus efectividades biológicas (Coderre JA et al., 2003):

1. Rayos gamma (γ) de bajo LET, resultantes principalmente de la captura de los neutrones térmicos en hidrógeno, pero también presentes en el haz.
2. Protones de alto LET, o provenientes de la colisión entre núcleos de hidrógeno y neutrones rápidos, o de la captura de neutrones de baja energía en nitrógeno.
3. Partículas pesadas cargadas de alto LET, liberadas como producto de la reacción de captura en ^{10}B.

El campo de radiación producido en un tejido durante el BNCT consiste en una mezcla de componentes con diferentes LET característicos. La principal componente de dosis, además de las partículas α y los iones ^{7}Li resultantes de la reacción de captura de boro, incluye rayos γ provenientes del haz e inducidos por la reacción de captura neutrónica en hidrógeno [a través de la reacción $^{1}H(n,\gamma)^{2}H$]. La reacción de captura de un neutrón térmico por el nitrógeno del tejido, $^{14}N(n,p)^{14}C$, libera un protón de alto LET con una energía de 590 keV. Los neutrones rápidos contaminantes del haz epitérmico producen protones de alto LET. La dosis de los neutrones rápidos es mayor en la superficie de la piel y decrece exponencialmente con la profundidad. Esta interacción de los neutrones con los núcleos de elementos del tejido entrega una inevitable dosis de fondo inespecífica, con una mezcla de componentes de radiación de alto y bajo LET, al tumor y al tejido normal (Coderre JA y Morris GM, 1999; Hopewell JW et al., 2011). Se asume que las diferentes componentes del campo mixto de irradiación utilizado en BNCT actúan de modo totalmente independiente, aunque hay alguna evidencia de sinergismo (Hopewell JW et al., 2011). Así la ventaja terapéutica del BNCT vendrá dada por la acumulación preferencial del boro dentro del tumor, ya que las otras componentes de dosis están presentes en tumor y tejido normal en magnitudes similares.

Las componentes de dosis con diferente LET tienen diferentes grados de efectividad biológica respecto al tumor y los tejidos normales. La dosis total de BNCT en algún tejido es la suma de las diferentes componentes ya descriptas, y comúnmente se expresa como dosis absorbida en Gy. Sin embargo, una dosis absorbida total expresada en Gy no necesariamente es igual para dos centros de tratamiento diferentes ya que sus componentes pueden ser distintas. Para expresar la dosis total de BNCT en una unidad común a fotones se puede utilizar Gray equivalentes (Gy-Eq), donde cada componente de alto LET es multiplicada por un factor de efectividad biológica relativa (RBE) determinado experimentalmente. La medida de RBE de un dado haz de neutrones, puede ser obtenida en ausencia de boro comparando la dosis neutrónica con la dosis de rayos X suficiente para producir el mismo efecto biológico en un sistema dado. Las dosis expresadas de esta manera equivalente permiten comparar los efectos del

BNCT en diferentes modelos para los cuales los efectos de la irradiación con fotones son conocidos, pero quizás más importante es que el uso de Gy-Eq permitiría comparar las dosis entregadas por distintas instituciones en las que se aplica BNCT.

Como hemos mencionado, la efectividad del BNCT está relacionada principalmente con la acumulación selectiva del transportador de boro dentro del tumor. El corto alcance de las partículas producidas por la reacción de captura hace que la microdistribución del boro cercana al núcleo de la célula tumoral sea crítica para la eficacia biológica. La microdistribución del boro dentro de la célula es uno de los factores más importantes para estimar la dosis absorbida dentro del núcleo (Kobayashi T y Kanda K, 1982). Debido a la variación en la localización de diferentes agentes de captura dentro de los tejidos, se consideró inapropiado definir a la efectividad biológica de la radiación de alto LET resultante de la reacción de captura de $^{10}B(n, \alpha)^{7}Li$, usando el término RBE. Alternativamente se utilizó el término efectividad biológica del compuesto (CBE) (Morris GM et al., 1994). Es fundamental que la determinación experimental del CBE sea hecha imitando lo mejor posible las condiciones clínicas, ya que el modo de administración del compuesto, el patrón de distribución en la célula y en el tejido, y hasta el tamaño del núcleo de la célula blanco pueden influir en el factor (Coderre JA et al., 2003).

Entonces, para poder expresar las dosis entregadas al tumor y los tejidos normales en Gy-Eq en BNCT, es necesario calcular:

a. La concentración de boro dentro del tumor y tejido normal.
b. El CBE para el compuesto particular en el tumor y todos los tejidos normales que se encuentren dentro del campo de irradiación.
c. El RBE de las componentes de alto LET propias del haz para tumor y tejido normal.

La "dosis absorbida" en un punto dado es útil para especificar la cantidad de irradiación en ese punto sin tener en cuenta su eficacia biológica y es un parámetro comúnmente utilizado en diferentes técnicas. Este concepto es fácilmente aplicable a las modalidades terapéuticas de radiación convencional, o a

las componentes de dosis de BNCT que no son la "dosis Boro", ya que esta última depende de la incorporación del compuesto borado para generar las partículas α y de ^{7}Li y la cantidad puede variar de una célula tumoral a otra. En los tratamientos clínicos sólo es posible calcular la concentración media de boro dentro del tumor a partir de la medición de la concentración de boro en una muestra de sangre y la relación de concentración de boro tumor/sangre obtenida en estudios de biodistribución previos. Si las células tumorales no contienen boro, o contienen menos que el tejido normal, un incremento en la fluencia de neutrones no producirá ningún beneficio terapéutico y aumentará la toxicidad en el tejido normal limitante de dosis (Gahbauer R et al., 1998). La dificultad de determinar la dosis boro también entorpece los estudios de escalamiento de dosis de BNCT, ya que pueden realizarse de tres maneras posibles:

1. Aumentando el tiempo de exposición.
2. Aumentando el boro administrado o entregado al tumor.
3. Con ambos factores.

El incremento del tiempo de irradiación aumentará la contribución de la dosis γ, la de nitrógeno y los neutrones rápidos, pero el tejido normal se acercará a su límite de tolerancia. El aumento de la concentración de boro se traducirá en una ganancia terapéutica sólo si se produce en el tumor y no en el tejido normal.

4. Compuestos borados

Hay un número de nucleídos que son altamente propensos a absorber neutrones térmicos como el ^{3}He, ^{6}Li, ^{10}B, ^{113}Cd, ^{157}Gd y ^{235}U entre otros. Esta propiedad se denomina sección eficaz de captura (σ).

El ^{235}U radiactivo fue considerado como un posible nucleído a emplear al comienzo del desarrollo de la terapia por captura neutrónica. Las partículas de fisión generadas por la reacción de captura de los neutrones térmicos por el ^{235}U son muy grandes, que van en números de masa de 85-104 a 130-149. Debido a su tamaño y energía, el daño estaría confinado a la célula en la que se produce la

reacción de captura. Sin embargo, en general, los compuestos de uranio son tóxicos (Soloway AH et al., 1998).

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

1. No es radiactivo y está fácilmente disponible (compone aproximadamente el 20% del boro natural).
2. Las partículas emitidas por la reacción de captura [$^{10}B(n, \alpha)^{7}Li$] son en gran parte de alta transferencia lineal de energía (LET).
3. Sus trayectorias son aproximadamente del diámetro de una célula (10-14 µm), limitando, teóricamente, el efecto de la irradiación a las células tumorales que hayan captado suficiente cantidad de ^{10}B sin causar daño al tejido normal circundante.

El boro es el quinto elemento de la tabla periódica, es un metaloide y, como su vecino el carbono (C), es propenso a formar compuestos moleculares covalentes. El boro y el C son los únicos dos elementos capaces de generar familias de compuestos químicos uniéndose a ellos mismos o a otros (Hawthorne MF y Lee MW, 2003). El boro tiene dos isótopos naturales estables, el ^{10}B y el ^{11}B con una abundancia de aproximadamente 19% y 81% respectivamente. Además, la química del boro permite que sea incorporado en muchas estructuras diferentes (Barth RF et al., 1990).

Idealmente, los compuestos borados para ser usados en BNCT deberían tener:

- Una alta especificidad por las células malignas y bajas concentraciones en las células normales adyacentes y sangre.
- Una baja toxicidad de modo que, en la dosis administrada, sean bien tolerados por animales y eventualmente por pacientes.
- Una concentración absoluta de ^{10}B en tumor suficiente para que cada célula tumoral contenga 10^9 átomos (10-30 ppm de ^{10}B, dependiendo del compuesto borado).
- Una microlocalización que favorezca el daño a los blancos subcelulares tumorales más radiosensibles.

En los primeros ensayos clínicos, se utilizaron bórax ($Na_2B_4O_7.10H_2O$), ácido p-carboxifenilbórico y perhidrodecaborato ($Na_2B_{10}H_{10}$) como portadores de ^{10}B, básandose en investigaciones llevadas a cabo por Soloway (Sweet WH, 1997). El perhidrodecaborato de sodio demostró ser el más soluble, estable químicamente e inerte de todos los compuestos que se habían estudiado hasta el momento. Presentaba baja toxicidad y unas relaciones de 5-8:1 (tumor:cerebro normal), por 2-3 horas. Sin embargo, sus concentraciones en sangre permanecían elevadas. Debido a que estos compuestos generaban un daño severo en la vasculatura al ser sometidos a la irradiación con neutrones, continuó la investigación en la búsqueda de mejores compuestos.

Muchos compuestos fueron evaluados en animales con tumores de cerebro, y entre ellos se encontró un grupo que tenía buena llegada al tumor y permanecía con bajos niveles en sangre. Estos compuestos contienen un grupo sulfidrilo borado (Soloway AH et al., 1967; Soloway AH et al., 1998). El sulfidrilo borado $Na_2B_{12}H_{11}SH$ o borocaptato de sodio (BSH) es un compuesto difusivo y no atraviesa la barrera hematoencefálica intacta en el cerebro normal, pero se acumula en los tumores debido a que los vasos sanguíneos tumorales intracraneales carecen de las propiedades funcionales de la barrera hematoencefálica (Soloway AH et al., 1967). Estudios de biodistribución en modelos animales mostraron una relación de 0,5-1:1 (tumor:sangre), y concentraciones en tumor con magnitudes suficientes para BNCT (Kraft SL et al., 1992). El BSH fue identificado como posible candidato para ensayos pre clínicos en EE.UU. y fue elegido por Hatanaka para ensayos clínicos llevados a cabo en Japón (Coderre JA y Morris GM, 1999). La falta de toxicidad en casi 100 pacientes, junto con la aparente eficacia terapéutica del BNCT, motivó estudios de biodistribución y farmacocinética del BSH más intensivos (Barth RF et al., 1990).

El aminoácido *p*-borofenilalanina (BPA) fue sintetizado a fines de la década de 1950 con la posibilidad de ser usado en BNCT. En esos años los esfuerzos se concentraban en encontrar compuestos que no atravesaran la barrera hematoencefálica intacta. Por eso, el BPA fue dejado de lado hasta que Mishima y colaboradores, aprovechando su similitud con precursores de la melanina, iniciaron un programa de investigación de BNCT en melanoma. El BPA tiene la

propiedad de formar complejos químicos con monómeros de melanina (Mishima Y, 2001), y el hecho que sea un aminoácido podría ser la causa de que alcance altos niveles de persistencia en melanomas (Soloway AH et al., 1998). A diferencia del BSH, el BPA es transportado activamente a través de la membrana de la célula tumoral por el sistema transportador L, el cual puede ser estimulado por la acumulación previa de aminoácidos dentro de la célula. La administración de L-DOPA (dihidroxifenilalanina) previa a la del BPA, con un intervalo de tiempo apropiado, incrementaría el contenido de boro dentro de las células malignas intercambiando el L-DOPA intracelular por el BPA extracelular a través del sistema transportador L (Wittig A et al., 2000). Kulvik y colaboradores propusieron que el mayor movimiento del BPA al interior de la célula ocurre a través de un transporte bioquímicamente activo, pero que una parte minoritaria también podría entrar y salir de la célula de manera difusiva (Kulvik M et al., 2003).

Los primeros estudios de biodistribución con BPA, en hámsteres con melanoma, mostraron relaciones de 10:1 (tumor:sangre) mientras que la relación hígado:sangre fue de 1:1. Luego de demostrar que el BPA no era tóxico para el uso humano, se investigó la dinámica del compuesto en pacientes con melanoma que se sometían a cirugía. Nuevamente, se encontraron buenas diferencias en la captación de ^{10}B entre las células de melanoma y las células normales, y comenzaron los ensayos clínicos en el Musashi Institute of Technology de Tokio (Mishima Y, 2001).

Fairchild, Glass, Coderre y Joel continuaron los estudios de BPA para uso en BNCT en el Brookhaven National Laboratory, y mostraron que este compuesto se acumulaba en tumores no melanómicos, como gliosarcoma de rata, atravesando la barrera hematoencefálica del cerebro normal (Coderre JA y Morris GM, 1999). Usando la experiencia de los químicos japoneses, quienes descubrieron como solubilizar el BPA usando fructosa (Mori Y et al., 1989) se inició un ensayo clínico de BNCT para tratar glioblastomas con BPA como agente de captura (Sweet WH, 1997). Para que el BPA sea lo suficientemente soluble a pH fisiológico, hay que administrarlo acomplejado con fructosa. Sin embargo, en la sangre el complejo es hidrolizado espontáneamente en BPA y fructosa (Kulvik M et al., 2003). Recientemente, estudios de estabilidad sobre el complejo BPA-fructosa

demostraron que la solución puede ser utilizada para infusión en pacientes hasta al menos una semana luego de su preparación (Heikkinen S et al., 2011).

El decahidrodecaborato de sodio (GB-10), una sal, fue reportado por primera vez en 1959 por Hawthorne. Es un dianión borado poliédrico estable que contiene una mayor cantidad de boro por molécula. Este compuesto fue utilizado en un segundo ensayo clínico en Brookhaven en 1961. Una vez más, este ensayo no fue exitoso debido al poco conocimiento sobre la biodistribución del compuesto entre otros factores. Sin embargo, el fracaso de estas pruebas no se debió a la toxicidad del compuesto, ya que grandes dosis fueron administradas a los pacientes sin efectos deletéreos (Hawthorne MF y Lee MW, 2003). El GB-10 es un compuesto difusivo que no atraviesa la barrera hematoencefálica intacta. Si bien es antiguo, en los últimos diez años, se ha reanudado la investigación en modelos animales debido a las ventajas mencionadas. Fue utilizado en estudios de biodistribución como potencial transportador de boro para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello (Heber EM et al., 2004), y en ensayos de BNCT en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster con éxito. Se vio que, a pesar de no ser incorporado selectivamente por el tumor, el BNCT mediado por GB-10 presenta un 70% de respuesta tumoral total, preservando el tejido normal y el tejido precanceroso alrededor del tumor (Trivillin VA et at., 2006).

Los agentes borados y sus mecanismos de entrega se pueden clasificar según su forma de reconocimiento, si existiera, y por su tamaño. En la figura 2 se muestran algunos compuestos borados de bajo peso molecular. Dentro de ellos pueden determinarse cuatro categorías:

1. Agentes globales, no dirigidos a las células blanco.
2. Sólo reconocimiento de las células malignas.
3. Sólo unión al núcleo de la célula.
4. Reconocimiento de la célula tumoral con unión al núcleo de la célula blanco.

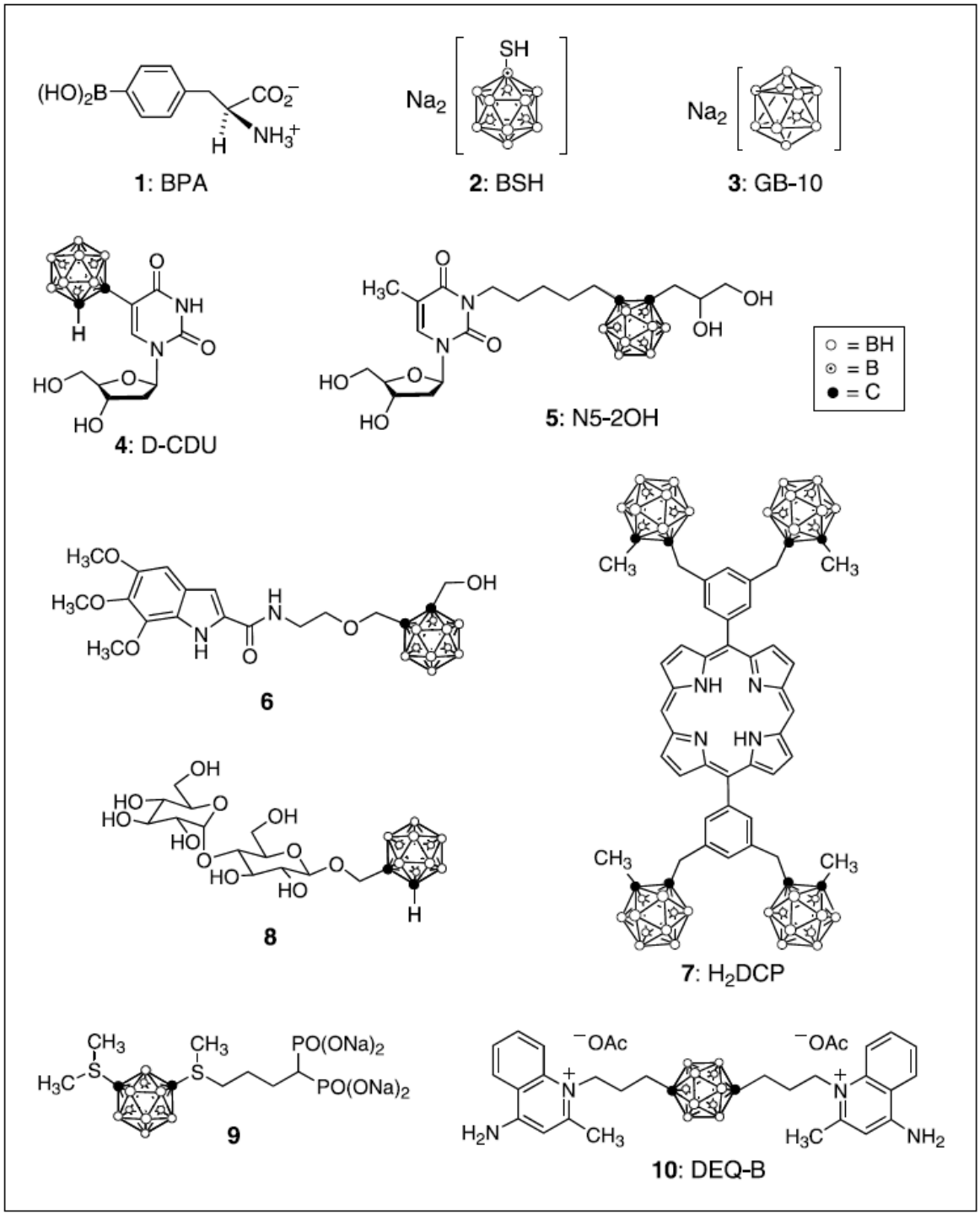


Figura 2 – Fórmulas químicas de algunos compuestos borados de bajo peso molecular aceptados para ser usados en humanos (BPA, BSH y GB-10) y en investigación para uso en BNCT (Barth RF et al., 2005).

Los agentes globales no tienen características de direccionamiento, son pequeños e hidrofílicos. Entre ellos se encuentran el BSH y el GB-10, que están disponibles para ensayos clínicos, aunque el primero es más tóxico que el segundo. Los agentes de la categoría 2 se dirigen a los receptores presentes en la

membrana plasmática de la célula y luego son internalizados. Dentro de esta categoría se encuentran agentes de bajo peso molecular como el BPA. Los agentes de la categoría 3 son nucleótidos o nucleósidos conteniendo boro y de bajo peso molecular. Los compuestos de bajo peso molecular que representan la categoría 4 son acridinas y poliaminas entre otros (Hawthorne MF y Lee MW, 2003).

El aminoácido *p*-borofenilalanina (BPA), el borocaptato de sodio (BSH) y el decahidrodecaborato de sodio (GB-10), son los únicos tres compuestos que están aprobados por la Food and Drug Administration (FDA, USA) bajo la categoría de IND (Investigational New Drug). En la actualidad, sólo el BPA y el BSH son utilizados en ensayos clínicos, y debido a la relativamente baja selectividad por el tumor, existe la necesidad de desarrollar nuevos transportadores de boro que sean más selectivos. Probablemente el hallazgo de un compuesto borado óptimo contribuiría notablemente al progreso en BNCT. Según Barth también debería explorarse en mayor profundidad el uso de diferentes agentes borados combinados, como ya se ha hecho en estudios experimentales en animales o como actualmente se hace en el tratamiento clínico (Barth RF, 2009). El protocolo de administración de los compuestos borados en forma combinada debería ser tal que ambos alcancen simultáneamente su biodistribución óptima en el momento de la irradiación con neutrones. La administración combinada de compuestos borados con diferentes propiedades y mecanismos de incorporación contribuiría a una distribución más homogénea dentro de las células tumorales heterogéneas (Heber EM et al., 2006). Las posibilidades de emplear mezclas de compuestos son muy numerosas y potencialmente permitirían diseñar la óptima combinación para cada tipo de tumor (Hawthorne MF y Lee MW., 2003).

Hasta el momento se han investigado numerosos compuestos transportadores de boro, entre los que se incluyen: porfirinas, aminoácidos, boranos poliédricos, carbohidratos, poliaminas, precursores bioquímicos, agentes de unión al DNA, agentes antisentido, péptidos, liposomas y anticuerpos monoclonales (Yamamoto T et al., 2008). Estos compuestos, llamados de tercera generación, comparten la característica de no haber alcanzado la etapa de ensayos clínicos. La selectividad por el tumor es sólo uno de los aspectos a tener

en cuenta. El segundo, y quizás más importante, es la toxicidad. Si bien se admite un cierto grado de toxicidad para alcanzar las concentraciones de boro requeridas en el tumor, no debe exceder los límites de tolerancia (Soloway AH et al., 1998). Otro aspecto importante a tener en cuenta es la eficiencia del compuesto borado como portador de boro ya que la concentración absoluta de ^{10}B en tumor influye centralmente sobre el éxito terapéutico (Coderre JA y Morris GM, 1999).

Los precursores bioquímicos tienen su origen en los quimioterapéuticos. El principio de su diseño es que, en contraste con las células normales, las células tumorales están en diferentes estados de división y tienen un alto requerimiento de constituyentes necesarios para su replicación. En BNCT, el objetivo es crear compuestos cargados de boro que simulen naturalmente los precursores necesarios, por ejemplo, para la replicación celular. En definitiva, el objetivo es usar el metabolismo bioquímico para alcanzar una incorporación selectiva de boro dentro del tumor (Soloway AH et al., 1998). Dentro de este grupo se incluyen los precursores de ácido nucleico conteniendo boro, los aminoácidos y péptidos, los lípidos y fosfolípidos, y los carbohidratos.

Los liposomas cargados con boro para uso en BNCT fueron estudiados profundamente por Frederick Hawthorne y colaboradores. La idea de utilizar vesículas de monocapa lipídica resultó atractiva por la posibilidad de encapsular grandes concentraciones de boro en el núcleo acuoso. Si bien los liposomas no se concentran exclusivamente en tumor, se ha demostrado que los de un tamaño adecuado se acumulan en tumor en concentraciones altas respecto de los tejidos normales, incluyendo la sangre (Shelly K et al., 1992). Los liposomas atraviesan preferentemente los vasos sanguíneos tumorales aberrantes a través de fenestraciones. Los liposomas tipo A encapsulan soluciones hipertónicas de sales de boro solubles dentro de una bicapa de distearoilfosfatidilcolina (DSPC)/colesterol, mientras que los tipo B utilizan la misma bicapa cargada con lípidos conteniendo boro que encapsulan una solución tampón isotónica. Los liposomas tipo C son una combinación de los A y los B, en los cuales se encapsula una solución acuosa de boro hiper ó isotónica, en una bicapa de DSPC/colesterol y compuestos borados lipofílicos (Li T et al., 2006).

Recientemente, se realizaron en nuestro laboratorio, los primeros estudios de biodistribución con liposomas, tipo B (MAC) y tipo C (MAC-TAC), en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster. Ambos compuestos entregaron el boro selectivamente al tumor y no mostraron efectos tóxicos aparentes. En base a los valores absolutos de boro obtenidos, los liposomas cargados con boro serían potencialemente terapéuticos (Heber EM et al., 2012).

Por otra parte, la idea de utilizar porfirinas cargadas con boro surgió a partir de la experiencia con compuestos similares utilizados como radiosensibilizadores en la terapia fotodinámica, en la cual se había observado una incorporación selectiva y persistente dentro de los tumores. La protoporfirina borada (BOPP) mostró una captación y retención de aproximadamente veinte veces más que el BSH en estudios *in vitro* (Fairchild RG et al., 1990). Sin embargo, estudios preclínicos han indicado que presenta una alta toxicidad (Ozawa T et al., 2005). Biodistribuciones *in vivo*, en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, con la porfirina borada CuTCPH mostraron relaciones de ^{10}B de 9:1 entre tumor y tejido normal, sin toxicidad aparente, transformándolo en un potencial candidato terapéutico (Kreimann EL et al., 2003). Más recientemente, el estudio de tres carboranilporfirinas en glioma de rata, reveló que pese a que la concentración de boro fue de 3 a 5 veces mayor que la observada con BPA, la sobrevida de los animales luego del tratamiento con BNCT fue similar con ambos compuestos (aunque mayor que la del grupo control sin tratamiento). Una posible explicación a este hallazgo vino dada por el resultado del análisis histopatológico que reveló un gran número de macrófagos conteniendo las porfirinas, indicando que la captación de boro por las células tumorales fue menor a la predicha con un método de medición global de la concentración de boro (Kawabata S et al., 2011). Estos estudios recalcan la importancia de la microlocalización de los compuestos borados y su homogeneidad dentro del tumor, más allá de los valores globales.

Con el desarrollo tecnológico del hibridoma y el avance en el direccionamiento de los anticuerpos monoclonales a una variedad de antígenos asociados a tumores, se abrieron nuevas posibilidades para la entrega de ^{10}B (Barth RF et al., 1990). Muchos años estuvieron dedicados al desarrollo de agentes de alto peso molecular. El gen que codifica para el receptor del factor de

crecimiento epidérmico (EGFR) y su forma mutante (EGFRvIII), está sobreexpresado frecuentemente en glioblastomas y tumores de cabeza y cuello (Barth RF y Joensuu H, 2007). El uso de EGF o anticuerpos monoclonales anti-EGFR borados como agentes de entrega en BNCT fue estudiado por Yang y colaboradores (Yang W et al., 2004; Yang W et al., 2009). Sin embargo, uno de los principales problemas de estos compuestos es la variabilidad en la expresión del EGFR de tumor a tumor, así como dentro de un mismo tumor, y la necesidad de alcanzar tanto las células positivas como las negativas para el receptor. Asimismo, si bien los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, tienen una eficiencia baja para transportar átomos de boro (Barth RF, 2009).

Recientemente, las nanopartículas coloidales de oro (GNPs) han sido consideradas como posibles vehículos transportadores de boro, por cualidades que incluyen la biocompatibilidad, la baja toxicidad y su tamaño pequeño. Para dirigir las GNPs al tejido de interés se utiliza el ácido fólico, ya que presenta la ventaja de tener alta afinidad por sus receptores que frecuentemente se encuentran sobre expresados en la superficie de las células tumorales humanas. Mandal y colaboradores propusieron el uso de las GNPs multifuncionales con BPA, ácido fólico e isotiocianato de fluoresceína para permitir su seguimiento. En estudios posteriores sería posible correlacionar la intensidad de la fluorescencia con la concentración de ^{10}B y proveer un mapa histológico de la captación de boro para determinar la localización *in vivo* de estos transportadores en células tumorales positivas para ácido fólico (Mandal S et al., 2011).

En el futuro, habrá que seguir mejorando los compuestos borados dirigidos al tumor, los métodos de administración y el sistema de entrega de los mismos para optimizar los protocolos de tratamiento y aumentar la efectividad terapéutica del BNCT.

5. Cáncer

El desarrollo de un tumor maligno completo involucra interacciones complejas entre diversos factores ambientales y endógenos (genéticos y

hormonales entre otros). La carcinogénesis generalmente procede a través de múltiples pasos ostensibles denominados iniciación, promoción y progresión; y el proceso completo puede ocupar una fracción muy importante de la vida de un individuo (Weinstein IB, 1988). El desarrollo y mantenimiento de un tumor maligno comprende múltiples cambios en la estructura y función de los genes. El proceso de iniciación involucra la inducción de una célula alterada irreversiblemente que frecuentemente es identificado con un evento de mutación. El mecanismo de iniciación puede variar en diferentes tejidos, o con diferentes iniciadores en el mismo tejido. La promoción es un proceso definido experimentalmente por el cual las células iniciadas se expanden clonalmente resultando en un tumor visible (Barrett JC, 1993).

En el año 1939 Rous describió a los carcinógenos como agentes capaces de inducir un disturbio prolongado sobre el cual pueden surgir tumores discretos de origen desconocido (Rous P y Kidd J, 1939). Se sabe que administrando una única dosis de un carcinógeno químico como iniciador no se logra desarrollar tumores. Por otra parte, la aplicación de repetidas dosis de un promotor, sin iniciador previo, tampoco es suficiente. Sin embargo, la administración secuencial del iniciador y repetidas dosis del promotor dan lugar a la aparición de tumores (Figura 3). La carcinogénesis por un agente químico que tiene tanto actividad iniciadora como promotora, requiere la interacción con más de una macromolécula, por ejemplo con el ADN y proteínas específicas (Miller EC, 1978).

Hace más de diez años Hanahan y Weinberg sugirieron que la gran cantidad de genotipos celulares en cáncer son una manifestación de seis alteraciones en la fisiología celular que conjuntamente rigen el crecimiento maligno. Ellas son: autonomía en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis continua e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan D y Weinberg RA, 2000). En el año 2011, estos mismos autores, sugirieron dos nuevas características adicionales que están involucradas en algunos, o quizás todos, los tipos de cáncer. Una involucra la capacidad de modificar, o reprogramar, el metabolismo celular para sostener la proliferación neoplásica más eficazmente; y la segunda permite a las células cancerígenas evadir la destrucción inmunológica,

en particular por linfocitos T y B, macrófagos y células natural killers (Hanahan D y Weinberg RA, 2011). Sin embargo, las células tumorales no actúan de manera aislada, sino que subsisten en un microambiente rico. Es más, muchas de las características delineadas por Hanahan y Weinberg son provistas por varios componentes del estroma, como fibroblastos, células endoteliales, pericitos, varias clases de leucocitos y la matriz extracelular (Pietras K y Östman A, 2011). Además, los fibroblastos asociados al cáncer y los pericitos están siendo reconocidos como parte integral del proceso de tumorigénesis. Asimismo, en la última década, las investigaciones demostraron la importancia de los efectos de promoción tumoral que tienen las células inmunes sobre la progresión neoplásica. La inflamación puede contribuir a las múltiples características descriptas por Hanahan y Weinberg por medio del suministro de moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluyendo factores de crecimiento, factores de sobrevida, factores proangiogénicos, y enzimas modificadoras de la matriz extracelular entre otras (Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

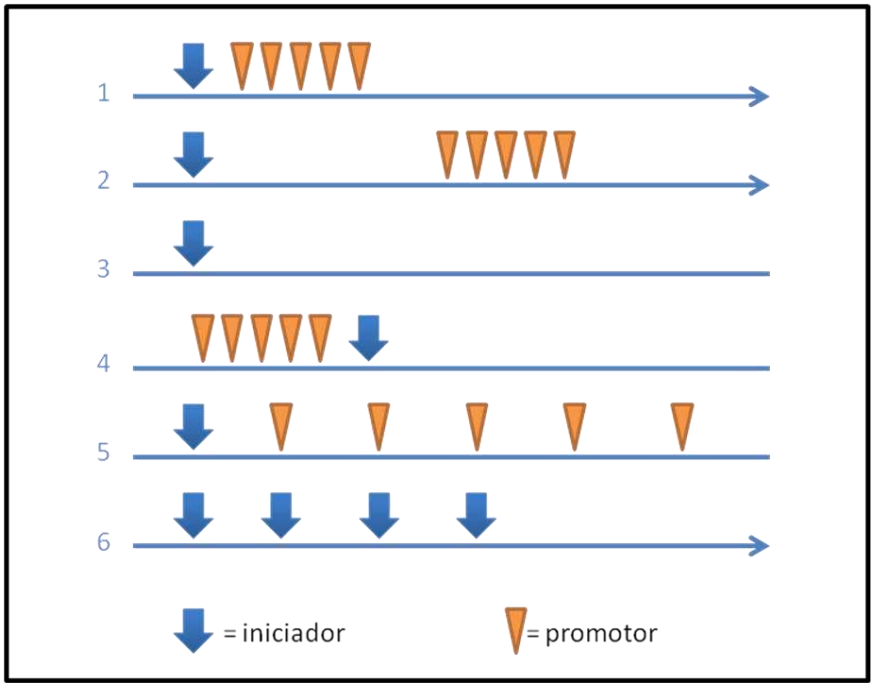


Figura 3 – Esquema de aparición de tumores según el orden de administración del iniciador y del promotor. En los casos 1, 2 y 6 se desarrollarán tumores, mientras que en los casos 3, 4 y 5 no se desarrollarán tumores.

Hay evidencias que sugieren la existencia de dos microambientes distintos con significancia patogénica diferente en la secuencia carcinogénica. Las alteraciones en el entorno del tejido pueden contribuir a la expansión clonal de células alteradas dentro de las áreas de lesiones proliferativas focalizadas; proceso de promoción tumoral que no necesariamente implica un cambio cualitativo dentro de la población celular en expansión (Laconi E, 2007). Sin embargo, el atípico patrón de crecimiento que define esas lesiones proliferativas conduce a la aparición de un microambiente tumoral (por ejemplo, un entorno biológico con la resultante hipoxia, acidosis, y otras alteraciones metabólicas que incluyen la inestabilidad genética). La formación de este nuevo nicho biológico permite que ocurra la progresión tumoral, y este proceso, obviamente, implica cambios cualitativos dentro de la población celular que está en progresión (Laconi E et al., 2008).

La progresión de tumores benignos en malignos es una fase de la carcinogénesis claramente distinta de la promoción. Las células deben adquirir uno o más cambios heredables durante la progresión a neoplasias malignas. Por lo menos dos clases de genes están involucrados en la mayoría de los cánceres, los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores (Barrett JC, 1993). A fines de la década de 1980 se estableció el concepto de que los iniciadores de la carcinogénesis podrían actuar mutando proto-oncogenes para producir oncogenes "activados" y así conducir a anormalidades en el control y diferenciación del crecimiento (Weinstein IB, 1988). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) pueden funcionar como iniciadoras y promotoras de la carcinogénesis, mientras que los antioxidantes proveen protección contra el daño celular y molecular causado por las ROS y RNS (Rasheed MH et al., 2007).

5.1 Cáncer de cabeza y cuello

El término "cáncer de cabeza y cuello" incluye tumores malignos en diferentes sitios anatómicos, tales como labio, cavidad bucal, nariz y sinusoides paranasales, nasofaringe, orofaringe, laringofaringe, laringe, esófago, glándulas salivales, y partes blandas de cuello y oreja (Syrjänen S, 2005). Estas

localizaciones tumorales presentan muchas variantes histopatológicas que forman parte de subespecialidades de la patología quirúrgica.

El carcinoma de células escamosas es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad bucal y orofaringe (OSSC). Representa entre el 0,6 y el 5% de todos los tumores malignos del cuerpo humano (Binnie WH y Rankin KV, 1984). El OSCC parece evolucionar gradualmente del epitelio normal a un fenotipo metastásico totalmente desarrollado a través de estados precursores transitorios. Estos cambios genéticos eventualmente se manifestarán en cambios fenotípicos con la aparición de lesiones potencialmente malignas (Bagan JV y Scully C, 2008). Los cambios epiteliales de las lesiones precancerosas hacen que estas zonas tengan mayor probabilidad de transformarse en malignas que el tejido normal de otras partes de la mucosa. Las lesiones clínicas precancerosas incluyen las leucoplasias, la queilitis actinica y las eritroplasias (Bagan JV y Scully C, 2008). Existen otras lesiones precancerosas de la cavidad bucal cuyos datos bibliográficos son controversiales, como el liquen y la ulceración traumática crónica. En un estudio realizado en Buenos Aires, sobre 719 pacientes, el 6% de los que presentaban liquen bucal sufrió transformación maligna (Lanfranchi-Tizeira HE et al., 2003). Asimismo, en la actualidad se ha demostrado que el trauma crónico actúa como un promotor en el proceso de carcinogénesis bucal (Maeda H y Kameyama Y, 1986; Pérez MA et al, 2005). Sin embargo, un proceso maligno que involucre cambios genéticos puede ocurrir *"de novo"* sin la existencia previa de algún cambio en la mucosa que sea detectable clínicamente (Syrjänen S, 2005).

El hallazgo que los pacientes con carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello presenten lesiones premalignas y múltiples tumores primarios esparcidos a lo largo de sus vías aéreas digestivas superiores (VADS) condujo a D. Slaughter y colaboradores a postular el concepto de cancerización de campo, según el cual todas las mucosas de las VADS de un mismo paciente, sometidas de forma similar a los agentes cancerígenos habituales relacionados con el desarrollo de cáncer bucal y orofaríngeo, tienen un mayor riesgo de desarrollar nuevos carcinomas (van Oijen MG y Slootweg JS, 2000).

Se diagnostican más de quinientos mil nuevos casos de OSCC por año en todo el mundo. Sólo en Estados Unidos se presentaron 40250 nuevos cánceres de

cavidad bucal y orofaringe en el año 2011 y fallecieron 7320 pacientes a causa del diagnóstico tardío y la consecuente progresión de la enfermedad[2]. El OSCC tiene una alta incidencia de micrometástasis cervicales y, algunas veces, metástasis contralaterales por su abundante comunicación linfática (Fan S et al., 2011). Los carcinomas de células escamosas (SCC) de cabeza y cuello son la sexta causa más común de muertes por cáncer en el mundo, y su incidencia está aumentando rápidamente en los países en desarrollo. La prognosis es pobre: el 50-70% de los pacientes muere en cinco años debido a las recidivas, metástasis en esófago y pulmón, o segundos tumores primarios en alguna parte de la cavidad bucal (cancerización de campo) (Mognetti B et al., 2006). La relación hombres-mujeres, a nivel mundial, es aproximadamente de 4 a 1.

En el pasado, el OSCC se encontraba principalmente en hombres mayores de 55 años con factores de riesgo asociados al tabaco y al excesivo consumo de alcohol. Pero, durante los últimos quince años, la tasa de incidencia de SCC de lengua aumentó cinco veces entre los jóvenes adultos menores de 40 años y seis veces entre las mujeres del mismo rango de edad (Shiboski CH et al., 2005). Sin embargo, poco se conoce sobre los factores de riesgo asociados con la enfermedad en pacientes jóvenes, ya que existen evidencias claramente contrapuestas en la literatura sobre la situación del alcohol y el tabaco como factores de riesgo en la población joven (Zygoginni AG et al., 2011). No obstante, estudios a nivel mundial reportan la asociación entre el SCC de amígdalas y la infección por HPV en pacientes jóvenes (Shiboski CH et al., 2005). Asimismo, se ha asociado la presencia de *Candida* en lesiones estomatológicas como factor de riesgo, tanto en pacientes jóvenes como añosos (Gilligan G et al., 2010).

También existen factores de riesgo asociados a regiones geográficas específicas. Las áreas y países con mayor riesgo de OSCC incluyen Francia (departamento del Bajo Rin), Hungría (condado de Vas), India, Brasil, China y Filipinas (Syrjänen S, 2005). Por ejemplo, en las provincias de Hunan y Hainan (en

---

[2] Según los datos obtenidos del sitio web de la Sociedad Americana de Cáncer: http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveilance/documents/document/acspc-031941.pdf

China), y en India, es habitual masticar la nuez de Betel (o areca), y hay una relación dosis dependiente entre las lesiones potencialmente malignas y su consumo (Nagini S et al., 2009). *Shammah* es el hábito de masticar hojas de tabaco molidas (junto con otras sustancias) en la península arábiga, y la costumbre está relacionada con la prevalencia de leucoplasias. Otro ejemplo, es una enfermedad autoinmune autosómica recesiva excepcionalmente común en Finlandia que predispone al crecimiento de *Candida albicans* y favorece la mucositis crónica y el OSCC (Bagan JV y Scully C, 2008). En el centro y sureste de Asia, el carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal es el más común de todos los cánceres orales, en oposición a lo que ocurre en el norte de América y oeste de Europa donde sólo representa el 10% de todos los cánceres orales (Chen YK y Lin LM, 2010).

La resección quirúrgica del tumor primario con márgenes patológicos seguros es primordial para el tratamiento de los OSCC. Para estadíos tempranos de la enfermedad, esa práctica quirúrgica, incluso sin tratamiento adyuvante, generalmente cura al paciente. Sin embargo, como la cavidad bucal tiene muchas funciones importantes como deglución y articulación, una cirugía muy amplia pone en peligro los resultados funcionales y cosméticos para el paciente, lo que resultará en detrimento de la calidad de vida (Chen TC et al., 2012). La cirugía de OSCCs primarios puede ser con o sin disección del cuello, o combinada con radioterapia. Sin embargo, a pesar de la naturaleza radical del tratamiento, son frecuentes las recidivas (Zygoginni AG et al., 2011).

Los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello suelen presentar cuadros heterogéneos cuyo pronóstico no siempre es fácil de establecer. El pronóstico en el cáncer bucal está afectado por múltiples variables como la diversidad histopatológica, el grado de diferenciación tumoral, la extensión del tumor primario, su localización, la invasión de estructuras vecinas, la presencia o ausencia de ganglios linfáticos metastásicos regionales, la presencia o ausencia de metástasis a distancia, la elección de la terapéutica, la edad y el estado general del paciente (Nemec A et al., 2012; Ghoshal S et al., 2006). Habitualmente los cánceres bucales se diagnostican tardíamente en etapas avanzadas de la enfermedad.

En la Argentina, la tasa de mortalidad por cáncer bucal se ha incrementado en los últimos años en mayor medida que el cáncer de cualquier otra parte del organismo (Morelatto RA y López de Blanc SA, 2006). Asimismo, este aumento ha sido más notable en mujeres que hombres según un trabajo efectuado por un grupo de la ciudad de Córdoba (Bolesina N et al., 2010). Adicionalmente, una revisión de trabajos desde 1950 hasta el año 2000 reveló que la relación hombre-mujer en centros de referencia de la ciudad de Buenos Aires cambió radicalmente de 7:1 a 1:1 (Brandizzi D et al., 2005). El mal pronóstico del cáncer bucal en la Argentina está asociado fundamentalmente al elevado número de diagnósticos tardíos, ya que se determinó que el 65% de los casos se diagnosticaron como tumores avanzados (Brandizzi D et al., 2008).

5.2 Mucositis

La mucositis es una reacción inflamatoria que tiene lugar en el epitelio oral. Es un efecto colateral común y doloroso en pacientes con cáncer de cabeza y cuello expuestos a tratamientos antineoplásicos tales como la radioterapia y la quimioterapia con determinadas drogas. Se considera que la mucositis es un efecto secundario limitante de dosis y que genera altos costos económicos. La tasa de hospitalización debida a mucositis severa es del 32% para pacientes tratados con radioterapia fraccionada, y del 50% para los pacientes tratados con quimioterapia (Sonis ST, 2004b). Los costos adicionales son producidos por la necesidad de una nutrición parenteral, los medicamentos adicionales para el tratamiento de infecciones y el incremento en el uso de analgésicos opiáceos. Además, la presencia de mucositis puede tener como consecuencia la interrupción del tratamiento antineoplásico, una limitación en la dosis, la afectación de la calidad de vida o el fracaso del mismo (Lopez Castaño F et al., 2005). La irradiación de tumores de cabeza y cuello no solo puede causar mucositis ulcerativa, sino que también puede inducir daños que resultan en una disfunción permanente en la vasculatura, el tejido conectivo, las glándulas salivales y hueso (Shih A et al., 2003).

Las lesiones ulcerativas que se producen, además de ser muy dolorosas, restringen la capacidad de ingerir alimentos y actúan como puerta de entrada de

patógenos. Por lo tanto, la mucositis es un factor de riesgo importante de infecciones sistémicas. En los pacientes con neutropenia el riesgo de hacer una septicemia es cuatro veces mayor si presentan mucositis.

Por observaciones clínicas se ha visto que los pacientes jóvenes desarrollan mucositis más frecuentemente que los pacientes mayores que reciben el mismo tratamiento y tienen la misma patología (Sonis ST, 1998). Además, los pacientes con buena salud dental que mantienen una higiene bucal escrupulosa durante el tratamiento contra el cáncer tienen menos episodios de mucositis que los pacientes con mala salud bucal o con poco mantenimiento. Pero lo que demuestra la complejidad del proceso de mucositis es la observación de pacientes que, con la misma edad, el mismo tipo de tumor, que reciben el mismo tratamiento y tienen condiciones bucales similares, no desarrollan mucositis con la misma frecuencia (Sonis ST, 1998).

La mucositis aguda es el resultado de hipoplasia y destrucción del epitelio escamoso, esterilización de las células madre del epitelio e inhibición de la proliferación de las células de transición (Shih A et al., 2003). Según Stephen Sonis, es un proceso biológico complicado que puede dividirse en cinco fases (Figura 4):

1. Iniciación.
2. Generación del mensaje.
3. Señalización y amplificación.
4. Ulceración.
5. Curación.

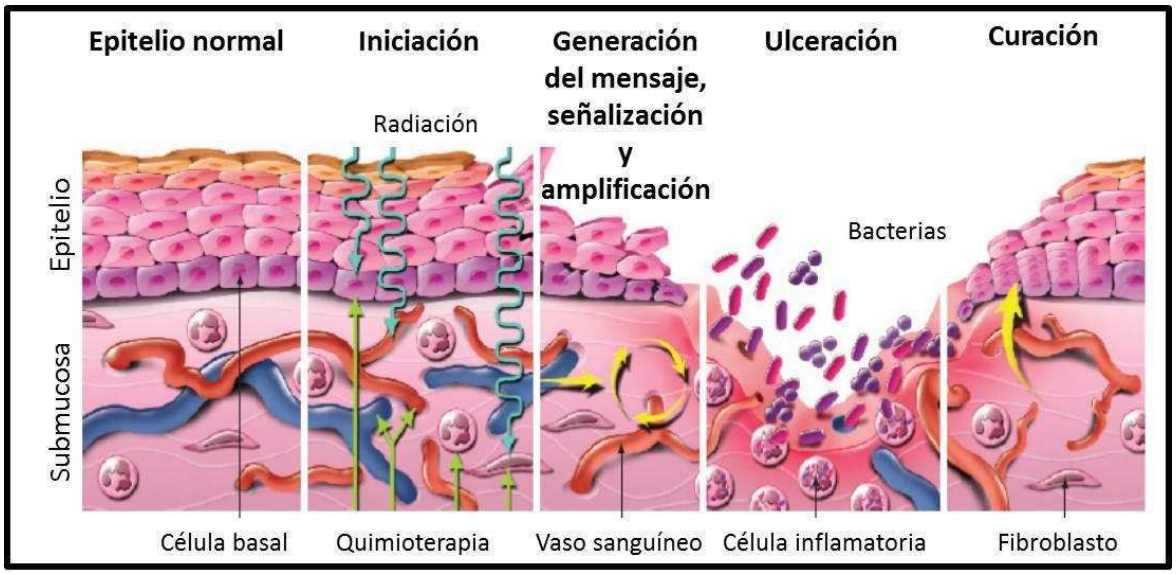


Figura 4 – Esquema de la diferentes fases del proceso de mucositis según Stephen Sonis: iniciación, generación del mensaje, señalización y amplificación, ulceración y curación (Sonis ST, 2004).

Inmediatamente después de la exposición a la radiación o a la quimioterapia se produce el daño al ADN que conduce a una proporción pequeña de las células a morir rápidamente. Pero, la mayoría de las otras, inician una cascada de eventos biológicos mediados por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sonis ST, 2004). El camino de señalización que se dispara conduce a la activación de numerosos factores de transcripción, tales como el NF-κB. Éste puede ser activado directamente por la quimioterapia y la radioterapia, o indirectamente por ROS. Entre los 200 genes cuya expresión está gobernada por NF-κB se encuentran aquellos que codifican para moléculas que demostraron actividad en la patogénesis de la mucositis, tales como citoquinas pro-inflamatorias, respondedores a estrés y moléculas de adhesión (Sonis ST, 2009). Como esos genes son regulados positivamente, se producen las proteínas efectoras y comienza el daño al tejido. Simultáneamente, la vía de la ceramida es activada por los mismos mecanismos que NF-κB, y la apoptosis mediada por este camino conduce a la muerte de las células endoteliales y fibroblastos de la submucosa (Sonis ST, 2004). La destrucción de los fibroblastos está asociada con la generación de fibronectina, la producción de metaloproteasas, y apoptosis adicional. Todos estos cambios ocurren rápidamente en el tejido que,

clínicamente, tiene apariencia normal. La producción de proteínas tiene dos efectos, uno directamente dirigido a causar daño en las células blanco y otro dirigido a la señalización y amplificación del proceso. Un ejemplo es TNF-α. Esta citoquina no solo es un mediador eficiente del daño celular y al tejido, sino que tiene funciones de señalización y amplificación. Toda esta actividad culmina en la ulceración, etapa en la que la integridad epitelial es destruida. Cuando las úlceras son profundas, son rápidamente colonizadas por bacterias. Los productos de la pared celular (como lipoproteínas) penetran en la submucosa, rica en macrófagos, y los estimulan a secretar citoquinas pro-inflamatorias (Sonis ST, 2009). En la mayoría de los casos la mucositis bucal se resuelve espontáneamente, y es el resultado de un proceso activo en el cual las señales de la matriz extracelular de la submucosa conducen a la proliferación, migración y diferenciación del epitelio que bordea la úlcera. Este evento es seguido de una continua proliferación hasta que el grosor de la mucosa retorna al estado normal (Sonis ST, 2004).

El 85% de los pacientes sometidos a tratamientos oncológicos con dosis elevadas de radioterapia y/o quimioterapéuticos mucotóxicos desarrollan complicaciones en la cavidad bucal (Lopez Castaño F et al., 2005). Mientras que el dolor y las incapacidades funcionales son potencialmente importantes por sus implicaciones clínicas, la cuantificación de estas variables presenta un desafío importante. Existen muchos métodos para documentar y cuantificar los cambios en los tejidos epiteliales de la cavidad bucal y las alteraciones de su función, durante y después del tratamiento del cáncer. Actualmente las escalas disponibles son:

- Generales.
- De múltiples variables.
- Específicas de cada tratamiento.

De todos los sistemas de medición que se consideran válidos, el de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es uno de los más utilizados (Lopez Castaño F et al., 2005). La escala de la OMS está dentro de las generales y se compone de cinco grados (0-4 de normal a severo). Sin embargo, la misma combina signos objetivos de la mucositis (eritema y formación de úlceras) con

parámetros subjetivos y funcionales como dolor y capacidad para comer (Sonis ST et al., 1999). Si bien las escalas generales ofrecen un método simple y de fácil manejo, incluso por personal no entrenado, su principal inconveniente es que carecen de especificidad.

6. Modelos animales

Es claro que ningún modelo animal es perfectamente aplicable a cualquier tipo de cáncer humano. Así y todo, existe consenso en que recurrir a los modelos animales es el preludio inevitable para entender el desarrollo de las neoplasias y ensayar la eficacia de los nuevos enfoques terapéuticos.

Además de los modelos de cáncer inducidos químicamente, en la actualidad se están utilizando otros para el estudio del cáncer de cabeza y cuello. Entre ellos se incluyen los que utilizan tumores transplantados, animales transgénicos y los modelos de co-carcinogenisidad. Si bien el modelo animal ideal sería aquél en el que el cáncer ocurre espontáneamente, los OSCC espontáneos son muy poco frecuentes en animales domésticos y de laboratorio. Por esta razón la inducción artificial es esencial para la investigación del cáncer bucal.

Probablemente porque los componentes químicos del tabaco y del alcohol fueron identificados rápidamente como los responsables de la mayoría de los OSCC, es que se limitaron los modelos animales por mucho tiempo a los inducidos químicamente (van Oijen MG y Slootweg JS, 2000). El modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster [inducido por dimetilbenzantraceno (DMBA)] ha sido el más utilizado por sus características anatómicas y fisiológicas, y lo abordaremos en profundidad más adelante. Dentro de los modelos inducidos químicamente también se ha estudiado la interacción del DMBA con otros carcinógenos en ratones SENCAR, y el uso de acetato de tetradecanoilforbol (4NQO) en ratas (Ribeiro DA et al., 2005) y ratones C57Bl/6 (Czerninski R et al., 2009). En estos dos últimos modelos, se ha visto que la administración de 4 NQO en el agua de bebida induce SCC en paladar y lengua. Los primates son muy

resistentes a los cancerígenos químicos conocidos, y por eso no hay modelos de cáncer bucal satisfactorios en ellos (Eveson JW, 1981).

El transplante de células neoplásicas para inducir tumores es ampliamente utilizado en todas las ramas de la investigación del cáncer. Las combinaciones células-huésped van desde animales inmunosuprimidos en los cuales puede introducirse un tejido xenogeneico a huéspedes inmunocompetentes que reciben células singeneicas. Pero, como los clones seleccionados *in vitro* no son necesariamente similares a los originales del paciente, los modelos de xenotrasplante podrían no reflejar el desarrollo y comportamiento de los tumores humanos. Por ese motivo, los transplantes de células a individuos singeneicos representan modelos más realistas. Sin embargo, para este tipo de transplante, hay que lidiar con las dificultades que implica la tarea de establecer líneas de células provenientes de tumores bucales y sus bajas tasas de éxito debido a la contaminación bacteriana durante su resección. Así y todo, se han establecido, por lo menos, cuatro líneas celulares provenientes de carcinomas de la bolsa de la mejilla del hámster inducidos por DMBA, y tres líneas murinas de OSCC inducido por la aplicación de 4NQO (Mognetti B et al., 2006). Además, recientemente, fue establecida una línea de SCC de lengua de conejo, a partir de tumores inducidos por DMBA (Li SJ et al., 2011).

Otro tema a tener en cuenta en los modelos que utilizan transplante de tumores o células, es el sitio donde será implantado. Como regla general, lo mejor es inducir los tumores en el mismo lugar en el que se presentan en los humanos. Por lo tanto, los transplantes ortotópicos (sitio idéntico al de origen) son los preferidos, ya que arrojan resultados más certeros por la influencia del microambiente.

Los modelos transgénicos y knockout en ratones han contribuido al entendimiento de la tumorigénesis; sin embargo, han tenido varios inconvenientes. Generalmente, los ratones transgénicos poseen promotores heterólogos que conducen a niveles no fisiológicos de la expresión del transgen. En los animales knockout, las mutaciones están presentes en todas las células, mientras que en los tumores humanos las mutaciones son adquiridas por algunas células rodeadas de células normales. Además, el microambiente tumoral en estos

modelos podría ser diferente al de los cánceres humanos. A pesar que la mayoría de los tumores han sido representados por varios modelos de animales transgénicos, los tumores de cabeza y cuello en animales genéticamente modificados continúan siendo poco comunes (Mognetti B et al., 2006). El primer modelo diseñado específicamente para generar SCC orofaríngeo fue establecido en el año 2002 por Oliver Opitz y colaboradores (Opitz OG et al., 2002).

En los modelos de co-carcinogénesis pueden estudiarse las etapas de iniciación y promoción. Dentro de esta categoría se encuentra el modelo experimental de carcinogénesis por acción de úlceras producidas por trauma crónico, las que actúan como promotor de la carcinogénesis iniciada con DMBA (Pérez MA et al., 2005). En la década comprendida entre 1960 y 1970, los modelos de co-carcinogénesis fueron ampliamente utilizados para estudiar el efecto promotor de diferentes compuestos (tales como alcohol, Tween 60 y aceite de crotón entre otros) luego de la aplicación de DMBA como iniciador (Eveson JW, 1981). Todos estos estudios fueron realizados en la bolsa de la mejilla del hámster.

6.1 Modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster

Los hámsteres Syrian (*Mesocricetus auratus*) se emplean en investigaciones biomédicas desde hace más de 80 años. Particularmente, son utilizados en estudios de carcinogénesis por su sorprendentemente baja incidencia de tumores espontáneos (Kamino K et al., 2001). La prevalencia y espectro de los mismos, varía dependiendo de la especie, por ejemplo el número total de tumores espontáneos es mayor en los hámsteres Djungarian que en los Syrian (Kondo H et al., 2008). Asimismo, los más frecuentemente observados, en hámsteres Syrian (o Golden), son los tumores hematopoyéticos (incluyendo plasmocitomas y linfomas), y los adenocarcinomas de las glándulas suprarrenales (Kamino K et al., 2001; Kondo H et al., 2008).

En el año 1954, John Salley produjo el primer carcinoma de células escamosas (SCC) en la bolsa de la mejilla de un hámster Syrian pintándola con 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) (Salley JJ, 1954). Siete años más tarde, Alvin Morris estandarizó el modelo experimental de carcinogénesis química en la

bolsa de la mejilla del hámster, y afirmó que es posible inducir a la mucosa normal de la bolsa a malignizarse en aproximadamente 12 semanas (Morris AL, 1961; Morris AL et al., 1961). Según Gerald Shklar, el modelo es confiable, preciso y constante, y puede ser modificado para estudios específicos (Shklar G et al., 1979).

Desde 1950 los hámsteres Syrian han sido ampliamente utilizados por varias características. Poseen dos bolsas (o abazones) bajo los músculos de las mejillas, una a cada lado de la boca, que están revestidas por un epitelio escamoso estratificado queratinizado similar al que reviste la cavidad bucal propiamente dicha. Las bolsas sólo están comunicadas con la boca en las comisuras, y pueden ser fácilmente evertidas o expuestas para un rápido acceso a la inspección visual. En esa posición pueden ser estudiadas por microscopía por transiluminación debido a su grosor (Salley JJ, 1954). Además, la falta de estructuras anexas hace que la bolsa sea extremadamente útil para el estudio de las interacciones epitelio-mesenquimáticas durante la carcinogénesis.

Los estudios de carcinogénesis en la bolsa de la mejilla del hámster generalmente son llevados a cabo por múltiples aplicaciones semanales de DMBA al 0,5% en aceite mineral. Mediante esta modalidad se utiliza al DMBA como cancerígeno completo (es decir como iniciador y promotor). Sin embargo, las etapas de la carcinogénesis (iniciación, promoción y progresión) no están bien definidas en este modelo (Slaga TJ y Gimenez Conti IB, 1992). Este modo de carcinogénesis, provee un modelo de tumores rodeado por tejido con alteraciones potencialmente malignas (PMD, por sus siglas en inglés)[3], permitiendo el estudio de efectos terapéuticos sobre el mismo. Sin embargo, la agresividad de este protocolo lo hace inadecuado para el seguimiento de tejidos con PMD a largo plazo. Dado que el control de los tejidos con PMD es crucial para la terapia

---

[3] Se han usado diferentes términos para referirse a la mucosa bucal que puede desarrollar tumores malignos, por ejemplo tejido precanceroso (Kreimann EL et al., 2001a), campo premaligno (Gonzalez-Moles MA et al., 2012), tejido con PMD (Heber EM et al., 2010; Sarode SC et al., 2012), condición precancerosa (Sarode SC et al., 2012), y tejido con cancerización de campo (Braakhuis BJ et al., 2003). A lo largo de esta tesis se utilizarán indistintamente los términos tejido premaligno, tejido precanceroso y tejido con PMD.

oncológica (por los segundos tumores primarios que son causa frecuente del fracaso terapéutico), en nuestro laboratorio se desarrolló un protocolo lo suficientemente agresivo para garantizar el desarrollo de tumores en la mayoría de los animales cancerizados, pero que fuera bien tolerado como para realizar un seguimiento a largo plazo (Heber EM et al., 2010). Ocasionalmente, para el estudio de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la génesis tumoral, se utilizan protocolos que involucran la administración de DMBA como iniciador, seguido por algún otro cancerígeno.

La inducción química de la carcinogénesis en este modelo produce lesiones premalignas y malignas muy similares a las de la boca humana. Aún después de tiempos largos de cancerización, cuando se manifiestan los carcinomas, coexisten áreas de epitelio histológicamente normal. Estas áreas "normales", pero cancerizadas, han sido denominadas NUMF, por su sigla en inglés (no unusual microscopic features) y constituyen un modelo adecuado para el estudio de marcadores de cancerización de campo (Pérez MA e Itoiz ME, 2004). Los biomarcadores de malignidad tienen una gran importancia en el diagnóstico precoz, en la evaluación de márgenes de seguridad pos-quirúrgicos, y en la estimación del riesgo de recidiva.

Una bolsa normal está compuesta por una capa delgada de células escamosas, tejido conectivo y una capa de músculo. El epitelio consiste en tres o cuatro capas de células escamosas con una ligera queratinización. Durante el tratamiento con DMBA la secuencia de los cambios histopatológicos en la bolsa es la siguiente: hiperplasia, hiperqueratosis e inflamación, hiperqueratosis y displasia, papilomas y carcinomas de células escamosas (Gimenez Conti I, 1993). Helen Santis y colaboradores mostraron que estas lesiones generadas en la bolsa del hámster son comparables a las leucoplasias humanas (Santis H et al., 1964). Luego de 18 semanas de topicación pueden desarrollarse tumores endofíticos. Estos tumores son infiltrantes, de mayor velocidad de crecimiento y menor diferenciación que los exofíticos, y aunque se producen formas exo-endofíticas, no son formas evolutivas de los tumores exofíticos, sino que constituyen dos formas independientes. En la figura 5 puede observarse la transición entre los distintos estadíos del proceso de cancerización. Los distintos cuadros histológicos co-

existen dentro de una misma bolsa. Sin embargo, a medida que avanza el proceso de carcinogénesis, aumenta la incidencia de áreas de displasia y tumor.

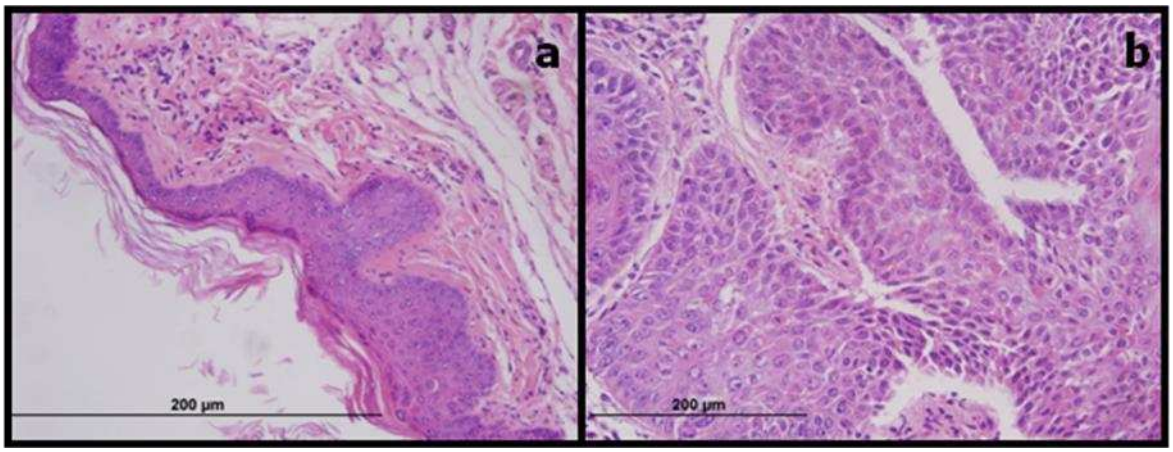


Figura 5 – Imágenes de microscopía óptica, de cortes histológicos coloreados con hematoxilina y eosina, a) Transición entre zonas NUMF, zonas de hiperplasia y displasia en un epitelio de la bolsa de la mejilla de un hámster cancerizado (20x). b) Área de un tumor exhibiendo cordones tumorales con diferenciación y atipia (40x).

Este modelo refleja muchos aspectos del desarrollo del cáncer bucal humano. Estas características comunes incluyen los cambios en la expresión oncogénica (como p53 y/o ras), expresión de marcadores de proliferación, expresión temprana de la gamma glutamil transpeptidasa (GGT), un incremento en las queratinas de bajo peso molecular, aumento del crecimiento en respuesta a varios factores (EGF y TGF entre otros), y el requerimiento de neovascularización durante la carcinogénesis entre otras (Mognetti B et al., 2006).

En resumen, la carcinogénesis en la bolsa de la mejilla de los hámsteres Syrian probablemente es el sistema animal más comparable con el desarrollo del cáncer bucal humano que existe hasta el momento. Las principales ventajas del modelo son:

- La similitud entre la mucosa de la bolsa del hámster y la mucosa queratinizada humana, en términos histológicos, histoquímicos y de ultraestructura.
- La ausencia de carcinomas espontáneos en la bolsa, lo que confundiría los resultados de un proceso de carcinogénesis.

- La producción sistemática de carcinomas (100%) con un carcinógeno químico potente como el DMBA.
- El desarrollo de lesiones displásicas precancerosas comparables con las leucoplasias humanas.

7. Historia y antecedentes clínicos de BNCT

BNCT es una opción muy atractiva para tumores irresecables o que no responden a terapias convencionales. Una de sus ventajas frente a la radioterapia convencional es la única aplicación, o a lo sumo 2 aplicaciones, respecto de las múltiples sesiones y tiempos prolongados del tratamiento con fotones (Henriksson R et al., 2008). Cerca de 1000 pacientes han sido tratados con BNCT en todo el mundo. En la figura 6 pueden observarse todos los países que han implementado, o implementan actualmente, ensayos clínicos de BNCT. Este listado de países se compone por Estados Unidos, Japón, Finlandia, Suecia, Holanda, República Checa, Italia, Taiwán y Argentina.

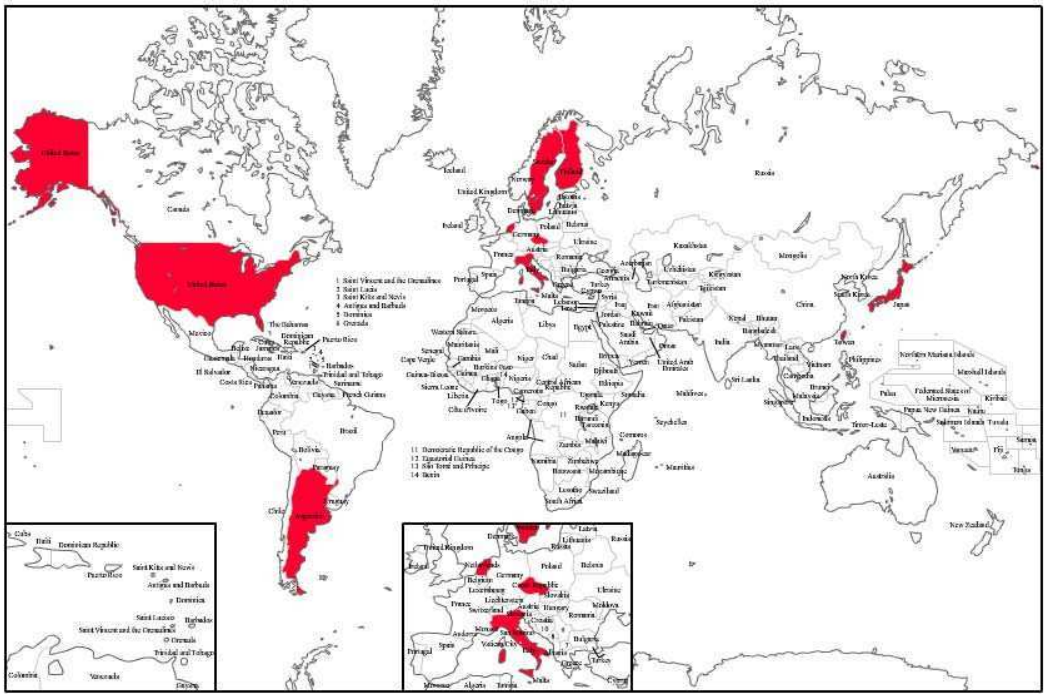


Figura 6 – Países que participan ó participaron de proyectos clínicos en BNCT (coloreados en rojo).

7.1 Tumores cerebrales malignos

El glioblastoma (GBM) es un tipo de tumor cerebral maligno común en adultos, que es resistente tanto a la radioterapia como a la quimioterapia. Los pacientes con GBM suelen tener un tiempo de sobrevida media menor a 1 año. Entre el 80-90% de los GBM tratados recidivan, lo que indica la necesidad de terapias más agresivas o con mayor selectividad por el tumor.

El concepto de BNCT tiene casi 8 décadas, fue propuesto originalmente como tratamiento para el cáncer por Gordon Locher en 1936, justo 4 años después que James Chadwick descubriera el neutrón. Sin embargo, recién entre 1950 y 1960 se realizaron los primeros estudios clínicos en pacientes. William Sweet, neurocirujano del Massachusetts General Hospital (Boston, Estados Unidos), fue el primero en darse cuenta de la potencialidad clínica del BNCT para tratar tumores cerebrales. Él pensó que podría obtenerse una concentración diferencial de compuestos borados dentro del tumor basándose en el principio de selectividad de la barrera hematoencefálica, ya que esta impide que los tejidos normales capten ciertos compuestos, pero al ser defectuosa a nivel tumoral permite el ingreso de los mismos (Sweet WH, 1997). En el año 1951 se realizaron los primeros tratamientos de BNCT en el Brookhaven National Laboratory (BNL), y se llevaron a cabo utilizando bórax como agente de captura. Se trataron 10 pacientes con GBM, a los cuales se les había realizado una resección total de sus tumores. Cinco pacientes recibieron una única dosis, y a los 5 restantes se les aplicó el tratamiento en 2 a 4 fracciones. A pesar que no hubo complicaciones de la terapia que amenazaran la vida de los pacientes, todos murieron de 6 a 21 semanas después del tratamiento, lo que era usual en aquella época en pacientes con GBM tratados por cualquier método (Sweet WH, 1997). Entre 1959 y 1961 se trató un grupo adicional de 16 pacientes en el BNL utilizando bórax o pentaborato de sodio como transportador de ^{10}B, pero al igual que en el grupo anterior, no hubo incremento en el tiempo de sobrevida (Barth RF et al., 1990). En el siguiente estudio, realizado entre 1961 y 1962, se trató una serie de 18 pacientes en el reactor del Massachusetts Institute of Technology (MIT) (Barth RF et al., 1990). En este estudio se utilizaron dos compuestos borados diferentes, basándose en

investigaciones llevadas a cabo por Soloway (Soloway AH et al., 1998). Los 18 pacientes murieron entre 10 días y 11 meses y medio luego del tratamiento.

La falta de compuestos selectivos, de un haz neutrónico adecuado y la imposibilidad de medir la concentración de boro en sangre en el momento del tratamiento, condujeron al fracaso del método. Los resultados desalentadores de la serie tratada en el MIT motivaron a Soloway y Hatanaka a intensificar sus esfuerzos en la búsqueda de nuevos compuestos, y para el año 1967 habían evaluado más de 150.

De regreso en Japón, en el año 1968, Hatanaka introdujo el borocaptato de sodio (BSH) como agente de captura y retomó los tratamientos en el servicio de neurocirugía de la Universidad de Tokio. Entre 1968 y 1998 se trataron más de 170 pacientes con tumores intracraneales malignos, especialmente GBM, con BNCT mediado por BSH y un haz de neutrones puramente térmico (Kageji T et al., 2011). Dada la poca penetración de los neutrones, era necesario realizar una craneotomía bajo anestesia el mismo día del BNCT, para irradiar directamente el tejido tumoral. Esta modalidad había sido implementada por Sweet en los últimos ensayos de BNCT realizados en el MIT, donde mediante una técnica quirúrgica removía el cuero cabelludo, el cráneo y la duramadre para exponer el tumor a los neutrones térmicos (Palmer MR et al., 2002). A esta terapia se la denominó BNCT intra operatorio (IO-BNCT), y los resultados fueron favorables en pacientes cuyos GBMs estaban localizados a una profundidad menor a 4 cm de la superficie cerebral. Sin embargo, fueron insatisfactorios en pacientes cuyos tumores estaban situados en regiones más profundas, debido a la baja fluencia de neutrones recibida en esas regiones (Kageji T et al., 2011). Para mejorar este problema, en Japón desarrollaron un haz de neutrones epitérmicos. Entre 1998 y 2001, el grupo de Nakagawa trató 17 pacientes con IO-BNCT mediado por BSH y neutrones epitérmicos. Finalmente, debido a la mejora del haz, los sistemas de planificación, y la incorporación del BPA en el uso clínico, en el año 2005 abandonaron el IO-BNCT y trataron 6 pacientes con BNCT sin necesidad de una cirugía simultánea (Kageji T et al., 2011). Dentro del grupo de pacientes con tumores cerebrales malignos tratados por IO-BNCT mediado por BSH, 23 eran menores de 15 años, y 4 de ellos menores de 3 años (Nakagawa Y et al., 2009). El uso de BNCT en niños

menores de tres años es alentador, ya que la radioterapia convencional no puede ser aplicada debido al daño que produce sobre el cerebro normal. Entre 2004 y 2005 se obtuvieron resultados que demostraron que el BNCT mediado por BPA (4 pacientes) es efectivo en reducir el volumen tumoral en casos de GBM recurrente, sin severos efectos secundarios (Aiyama H et al., 2011). Estos resultados volvieron a repetirse en el año 2010 cuando se incorporaron 2 pacientes más al protocolo. Este mismo grupo de trabajo condujo un nuevo protocolo para el tratamiento de GBMs primarios entre los años 2005 y 2007. En ese ensayo evaluaron la sobrevida de 8 pacientes tratados con BNCT mediado por la combinación de BSH y BPA, seguido de irradiación con fotones en 15 fracciones. La tasa de sobrevida fue mayor que la de pacientes tratados con radioterapia y temozolomida (tratamiento convencional en pacientes con GMB), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Nakai K et al., 2011). Sin embargo, otro grupo japonés llevó a cabo el mismo protocolo entre los años 2002 y 2006 con 11 pacientes, y obtuvieron diferencias significativas en el tiempo de sobrevida al compararlo con un grupo de pacientes tratados con radioterapia y quimioterapia (Kawabata S et al., 2009). Recientemente, en el 14th International Congress on Neutron Capture Therapy, se presentó un nuevo protocolo que se llevará a cabo en Japón y combinará BNCT con el tratamiento convencional de rayos X y temozolomida (Kawabata S et al., 2010).

En 1994 se inició un nuevo ensayo clínico en el BNL para glioblastoma, y en 1996 en el MIT para melanoma intracerebral y GBM. Estos surgieron luego de la modificación de las fuentes de neutrones que pasaron de térmicas de baja energía a neutrones epitérmicos de mayor energía, con un aumento en las propiedades de penetración dentro de los tejidos, y por los resultados alentadores obtenidos en un modelo de tumor cerebral en rata de BNCT mediado por BPA (Coderre JA et al., 2003; Palmer MR et al., 2002). Entre 1994 y 1999 se trataron 53 pacientes en el BNL con protocolos que fueron escalando la dosis de diferentes maneras. Los primeros 37 pacientes tuvieron una mínima incidencia de efectos secundarios y control tumoral similar al de la radioterapia convencional. En el grupo que recibió mayor dosis los efectos secundarios incrementaron, particularmente los relacionados al sistema nervioso central (Coderre JA et al., 2003). Entre 1996 y

1999 se trataron 22 pacientes enrolados dentro de un nuevo ensayo clínico llevado a cabo por grupos de investigadores de Harvard y del MIT. La principal diferencia con el protocolo del BNL fue el uso de dos fracciones aplicadas en días consecutivos (Palmer MR et al., 2002). Los 2 pacientes con melanoma intracraneal mostraron una respuesta radiográfica completa, y 13 pacientes con GBM mostraron una reducción medible del volumen tumoral luego del BNCT (Coderre JA et al., 2003). Ambos ensayos clínicos, tanto el del BNL como el del MIT, fueron realizados con BPA como agente de captura.

En Europa, un consorcio de naciones comenzó un ensayo clínico de BNCT en 1997 con irradiaciones realizadas en el reactor HFR de Petten (Holanda), y un grupo de la República Checa inició otro protocolo en el año 2000. Esos estudios europeos, como la mayoría de los japoneses, fueron desarrollados para tratar tumores de cerebro usando BSH como agente de captura (Palmer MR et al., 2002). En Holanda se trataron 26 pacientes hasta que el programa fue discontinuado en 2004, mientras que el ensayo clínico desarrollado en la República Checa llegó a tratar 5 pacientes antes de ser discontinuado. Además, se llevaron a cabo ensayos para el tratamiento de GBM con BPA como transportador de ^{10}B. Con este agente, se trataron 22 pacientes con tumores primarios en Finlandia desde el año 1999 a la actualidad, mientras que en Suecia se sometieron al ensayo 29 pacientes entre mayo de 2001 y febrero de 2003 (Kankaanranta L et al., 2011; Coderre JA et al., 2003; Henriksson R et al., 2008). Este último estudio difirió significativamente de todos los ensayos clínicos anteriores en que la cantidad total de BPA fue mayor (900 mg/kg peso corporal) y el tiempo de infusión fue más prolongado (6 hs). Sin embargo, si bien esos cambios fueron bien tolerados por los pacientes, el efecto en la sobrevida fue limitado, y en la mayoría de los casos la enfermedad progresó luego de 6 meses. En todos los protocolos clínicos europeos se emplearon haces de neutrones epitérmicos (Yamamoto T et al., 2008).

7.2 Melanomas cutáneos

Melanoma es una enfermedad agresiva que frecuentemente presenta diseminación a distancia o locorregional, y que en muchos casos, no tiene un tratamiento efectivo. Para los primeros estadíos de la enfermedad su prognosis es favorable, ya que la cirugía con márgenes amplios ofrece una alta probabilidad de cura. Pero para estadíos más avanzados el pronóstico es muy pobre, aún cuando se haya realizado tratamiento quirúrgico, radioterapia o quimioterapia. En determinados casos avanzados, las metástasis o recidivas en la piel no pueden ser operadas y la terapia por radiación es la única alternativa. Pero la toxicidad puede variar de moderada a severa produciendo secuelas cosméticas y funcionales. Por eso, BNCT se planteó como una herramienta atractiva para incrementar la respuesta que se obtiene con rayos X, entregando una dosis mayor al tumor y minimizando los efectos sobre el tejido normal.

En 1972 Mishima y colaboradores comenzaron a estudiar la potencialidad de BNCT para el tratamiento de melanomas malignos cutáneos utilizando un compuesto borado desarrollado por ellos (BPA). El primer paciente tratado, en el año 1985 por Mishima, había presentado un melanoma acral lentiginoso en el hallux derecho que fue amputado, pero tiempo más tarde desarrolló un nódulo metastásico que por la ubicación era irresecable quirúrgicamente. Dos meses después del tratamiento con BNCT el tumor mostró una marcada regresión, y a los 9 meses el tumor había desaparecido completamente (Barth RF et al., 2005). Desde ese momento se han llevado a cabo más de 30 tratamientos en Japón, obteniendo muy buenos resultados sobre el tumor y logrando un 77% de remisión completa. (Fukuda et al., 2003; Hiratsuka et al., 2011).

En Estados Unidos, los tratamientos de BNCT para melanoma localizado en extremidades comenzaron en el año 1994. Además de los tumores cerebrales, se trataron 4 pacientes con melanoma subcutáneo dentro del ensayo clínico llevado a cabo por investigadores en el MIT. Para todos los casos se utilizó BPA acomplejado con fructosa como agente transportador de ^{10}B (Coderre JA et al., 2003; Palmer MR et al., 2002).

En 2003 comenzó el ensayo clínico de BNCT para melanoma en Argentina, a cargo de la Comisión Nacional de Energía Atómica y el Instituto de Oncología Dr.

Ángel Roffo. Hasta el año 2007, se irradiaron 7 pacientes con múltiples metástasis subcutáneas con el haz hipertérmico (mezcla de neutrones térmicos y epitérmicos) del reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche. En total se irradiaron 10 campos, ya que 2 pacientes presentaron nódulos en más de una región. El 69% de los tumores tratados respondió al tratamiento, y el 31% restante no mostró cambios, pero ninguno progresó durante el período de seguimiento. También se pudo observar que los nódulos que no fueron irradiados continuaron su crecimiento. En ningún caso se observaron efectos adversos durante la infusión de BPA o el tratamiento. Sin embargo, durante el período de seguimiento se observaron ulceraciones en la piel de tres pacientes (González SJ et al., 2004b; Menéndez PR et al., 2009). Los tratamientos debieron suspenderse para realizar mejoras en el reactor (cambio de elementos combustibles de alto a bajo enriquecimiento de ^{235}U y reacondicionamiento de las instalaciones). Se espera que los tratamientos puedan reanudarse en el transcurso de este año (2013).

7.3 Tumores de cabeza y cuello

Cuando los tumores recurrentes de cabeza y cuello son irresecables, la enfermedad es fatal, con un tiempo de vida media de pocos meses. Estos tumores son radio-quimio resistentes y muestran un extenso crecimiento, necesitando de grandes cirugías con amplios márgenes. Para evitar discapacidades severas en estructuras y funciones oro-faciales, es necesario explorar nuevos tratamientos.

Los primeros 6 pacientes con cáncer de cabeza y cuello que se trataron por BNCT en el mundo fueron casos de recidivas luego de los tratamientos estándar. Todos los pacientes recibieron una combinación de BSH y BPA como agentes borados, y fueron irradiados en el reactor KURR, de la Universidad de Kioto, con un haz de neutrones epitérmicos. Tres pacientes tenían carcinomas de células escamosas (SCC), dos sarcomas y uno cáncer de parótida. Los resultados fueron favorables en 5 de los 6 casos tratados, y todos los pacientes presentaron efectos adversos muy leves (Kato I et al., 2004). Entre 2001 y 2007, Kato y colaboradores trataron 26 pacientes más (19 SCC, 4 carcinomas de glándula salival y 3 sarcomas). La tasa de respuesta al BNCT fue del 85%, y el 23 % de los pacientes sobrevivió por 30-35 meses (Kato I et al., 2010).

Entre 2003 y 2007, 20 pacientes más fueron tratados por otro grupo de investigadores en Japón. Tres de ellos eran tumores primarios, no recidivas. Este protocolo se realizó con BPA como único transportador de boro, y reveló un resultado alentador. El 90% de los pacientes mostró control tumoral, y particularmente, el 55% manifestó remisión completa (Aihara T et al., 2010). Además, no se observaron reacciones severas o crónicas en el tejido normal de ningún paciente. Teruhito Aihara y colaboradores reportaron que BNCT incrementa la chance de control local, pero que la principal causa de muerte sigue siendo la aparición de metástasis distantes y por tal motivo no se ve incrementada significativamente la tasa de sobrevida luego del tratamiento (Aihara T et al., 2010).

En el año 2009 Kimura y colaboradores reportaron el éxito terapéutico del BNCT en 6 casos con cáncer oral recurrente y metástasis en nódulos linfáticos cervicales. A pesar que no proporcionó una cura completa, aumentó la calidad de vida de los pacientes sin causar efectos adversos severos (Kimura Y et al., 2009). La boca tiene una variedad de funciones, tales como comer y hablar, que se ven afectadas fácilmente con la progresión de los tumores bucales, y que empeoran aún más la calidad de vida cuando se le suma el dolor. Este grupo japonés observó que BNCT no solo es efectivo en reducir el tamaño tumoral, sino también en controlar el dolor y disminuir los sangrados, contribuyendo a un aumento en la calidad de vida del paciente (Kimura Y et al., 2009). El mismo año, reportaron el resultado del primer paciente con un adenocarcinoma quístico en el labio superior, sin ningún tipo de tratamiento previo, al que se le aplicó BNCT en dos fracciones. Un año después de la segunda aplicación de BNCT, el paciente podía usar la dentadura, comer fácilmente y el dolor había disminuido, además de haber obtenido una reducción del 86% en la masa tumoral (Kimura Y et al., 2009b).

Desde 2003 y hasta la actualidad, se están llevando a cabo diversos protocolos clínicos de BNCT para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello con BPA en Finlandia, ya sea como terapia única o en combinación con drogas concomitantes, para cánceres recurrentes. Un primer ensayo sobre 12 pacientes reveló que el 83% respondió al BNCT y los efectos secundarios relacionados a la terapia fueron aceptables (Kankaanranta L et al., 2007). Basándose en esos

primeros resultados, el grupo de la Universidad de Helsinki, amplió el estudio a 30 pacientes más (29 carcinomas y 1 sarcoma) y trató 25 fuera del protocolo. La mayoría de los pacientes respondió al tratamiento o tuvo una estabilización de la enfermedad por varios meses. Sin embargo, a pesar que algunas respuestas fueron durables, la progresión del cáncer es frecuente luego del BNCT (Kankaanranta L et al., 2012). Lina Kankaanranta y colaboradores han reportado resultados superiores cuando se aplica BNCT como tratamiento de primera línea a tumores se de cabeza y cuello (Kankaanranta L et al., 2010).

Entre 2010 y 2011, se realizaron 10 tratamientos de pacientes con cáncer de cabeza y cuello en la Universidad Nacional de Hsinchu, Taiwán, utilizando BPA como agente transportador de boro. Cada paciente recibió dos irradiaciones con un intervalo de 30 días. Los resultados han sido muy satisfactorios, el 30% tuvo remisión completa y el 40% remisión parcial (Wang LW et al., 2011; Jiang SH 2011).

7.4 Otras patologías

En 2001, se aplicó un nuevo concepto en BNCT en el reactor de investigación de la Universidad de Pavia (Italia). Por primera vez, se irradió un órgano ex-situ y se volvió a implantar luego del tratamiento. Esta técnica se repitió en el año 2003, y se utilizó para el tratamiento de metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon. El compuesto borado utilizado fue BPA (Zonta A et al., 2006; Zonta A et al., 2009). Esta experiencia, aunque realizada sólo en 2 pacientes, ha servido para confirmar que BNCT puede erradicar tumores multicéntricos en un órgano sólido y ha inaugurado un nuevo campo de aplicación: BNCT *ex situ*.

En 2005 la aplicación de BNCT en Japón se extendió a mesoteliomas malignos pulmonares (MPMs) y cáncer de hígado (Suzuki M et al., 2008; Ono K, 2011). Para los casos hepáticos, se utilizó BSH como agente transportador de boro, mientras que para los mesoteliomas se empleó BPA. Si bien el tratamiento de los MPMs por BNCT fue un estudio piloto, mostró que puede paliar los síntomas de la enfermedad (como el dolor de pecho o espalda) haciendo que desaparezcan en unos pocos días. Además, recientemente se ha aplicado en 2 pacientes como posible tratamiento de la Enfermedad de Paget extramamaria (Hiratsuka J et al.,

2011). En este ensayo el BNCT fue mediado por BPA, y aunque la muestra es muy pequeña, pareciera ser efectivo contra dicha enfermedad.

8. Proyecto BNCT en la Comisión Nacional de Energía Atómica

En la Argentina, el proyecto BNCT se lleva a cabo en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) con la colaboración de varias instituciones como el Instituto de Oncología Dr. Ángel Roffo. Comenzó en el año 1996 con el objeto de desarrollar la tecnología, las facilidades y los estudios científicos y médicos que permitan concretar la investigación clínica de la terapia por captura neutrónica en pacientes en nuestro país. BNCT representa una conjunción extraordinaria de tecnología nuclear, física médica, química, biología y medicina para tratar el cáncer.

En 2003, se irradiaron los primeros pacientes de melanoma en el Centro Atómico Bariloche, y a la fecha, se han tratado 7 pacientes. Sin embargo, el ensayo clínico fue discontinuado temporariamente por modificaciones en el reactor. Mientras tanto, se está avanzando en los estudios pre clínicos necesarios para comenzar con protocolos de biodistribución en pacientes con metástasis hepáticas provenientes de cáncer colorrectal en el Hospital Austral, en cáncer de pulmón en la Fundación Favaloro y Universidad Maimónides y en cáncer bucal en el Hospital Marie Curie. Asimismo se realizan estudios de investigación básica y aplicada que contribuyen a optimizar los protocolos de tratamiento.

En el proyecto participa personal de los tres Centros Atómicos de la CNEA (Constituyentes, Ezeiza y Bariloche) y un equipo médico formado por especialistas de varias instituciones médicas. Actualmente, participan en él alrededor de 60 profesionales, organizados en diferentes áreas temáticas, que colaboran intensamente entre sí. En Radiobiología se han desarrollado varios modelos *in vitro* e *in vivo* con el objeto de estudiar patologías que podrían tratarse con BNCT: modelos de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster (Kreimann EL et al., 2001b; Heber EM et al., 2010), modelo experimental de metástasis hepática en ratas (Pozzi ECC et al., 2012), modelo de cáncer indiferenciado de tiroides

(Dagrosa et al., 2005; Pisarev et al., 2007) y modelo de melanomas cutáneos (Carpano et al., 2010). Los reactores utilizados son el reactor RA-6 y el RA-3. El RA-6, ubicado en Bariloche, provincia de Río Negro, cuenta con una facilidad de BNCT y un haz de neutrones con características intermedias (térmico-epitérmico), el cual es apto para el tratamiento de melanomas en extremidades con cierta profundidad (Blaumann HR et al., 2004). En el reactor RA-3 (Ezeiza, Buenos Aires) se ha diseñado una facilidad de irradiación en la columna térmica con el objeto de proveer un campo de neutrones térmicos de alto flujo e isotropicidad sin necesidad de tener que suspender las actividades normales de producción de radioisótopos del reactor. En el RA-3 se realizan diferentes experimentos biológicos y el objetivo final es el tratamiento de órganos por irradiación *ex situ* (Miller M et al., 2009; Pozzi ECC et al., 2009). Otro de los grupos de investigación tiene como objetivo desarrollar un acelerador para BNCT y hadronterapia (Kreiner AJ et al., 2011). Física Médica es el área responsable de optimizar la efectividad del tratamiento, garantizando la protección radiológica del paciente (Casal MR et al., 2004). El grupo de Instrumentación se dedica a la elaboración de detectores y medición de flujo neutrónico, además del diseño e implementación de un sistema de análisis isotópico por Prompt Gamma Neutron Activation Analysis y termografía para el seguimiento de tumores (Santa Cruz GA et al., 2009). También es responsable de la Dosimetría Computacional y Planificación de Tratamientos: elaboración de herramientas computacionales, análisis para la dosimetría en BNCT en seres humanos, órganos y en animales de experimentación, planificación de tratamientos y desarrollos en microdosimetría de la reacción de captura neutrónica (Santa Cruz GA y Zamenhof RG, 2004). En Química Analítica del Boro se realizan análisis de boro durante los tratamientos de pacientes por espectrometría de emisión óptica con plasma inductivo (ICP-OES) (Liberman SJ et al., 2004; Cardoso J et al., 2009), además de la medición de muestras biológicas de los diferentes modelos radiobiológicos (Heber EM et al., 2004; Garabalino MA et al., 2011). En el grupo de imagenología del boro se trabaja sobre diversos aspectos del daño por radiación de iones pesados en diferentes materiales detectores, a través del estudio de las trazas nucleares (Saint Martin G et al., 2007; Bernaola OA et al., 2006). En este grupo se ha desarrollado la metodología de autorradiografía

neutrónica para el análisis de la distribución de ^{10}B en muestras biológicas (Portu AM et al., 2011).

Particularmente, este trabajo de tesis se ha desarrollado dentro de uno de los grupos de radiobiología que trabaja intensamente, desde hace más de 10 años, en el desarrollo de modelos animales experimentales y el estudio de la potencialidad terapéutica del BNCT en los mismos. El primer paso fue desarrollar un modelo de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster, y sobre el cual se realizaron estudios de biodistribución con BPA y de BNCT *in vivo* en el reactor RA-6 de Bariloche (Kreimann EL et al., 2001a; Kreimann EL et al., 2001b). Años más tarde, se utilizó el mismo modelo para estudiar la biodistribución de porfirinas, GB-10, BSH y liposomas (Kreimann EL et al., 2003; Heber EM et al., 2004; Garabalino et al., 2010; Heber EM et al. 2012). Además se realizaron estudios de BNCT *in vivo* con GB-10 solo o administrado en combinación con BPA (Trivillin VA et al., 2004; Trivillin VA et al., 2006; Pozzi ECC et al., 2009). Como estudios pre clínicos, se trataron 3 casos de cáncer espontáneo de cabeza y cuello en felinos con BNCT mediado por BPA con el haz térmico del RA-1 del Centro Atómico Constituyentes y 3 casos adicionales con el haz epitérmico del RA-6 (Rao M et al., 2004; Trivillin VA et al., 2008). En 2007 comenzaron los primeros estudios de BNCT sobre hígado normal de rata (Cardoso J et al., 2007), que continuaron con el desarrollo de un modelo de metástasis hepática proveniente de adenocarcinoma de colon en ratas BDIX, sus correspondientes estudios de biodistribución y estudios de BNCT in vivo (Pozzi ECC et al., 2012; Garabalino MA et al., 2011). Simultáneamente, se desarrolló un modelo de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster menos agresivo, que permite el seguimiento de los animales, luego del tratamiento, por períodos muy prolongados (Heber EM et al, 2010). Con este modelo se estudia la aparición de nuevos tumores sobre el campo cancerizado luego del tratamiento dado en una o dos aplicaciones (Monti Hughes A et al., 2009; Monti Hughes A et al., 2011). Finalmente, los temas que conciernen específicamente a esta tesis son el estudio de diferentes protocolos experimentales para BNCT en el modelo clásico de cáncer bucal en el hámster, que mejoren los resultados terapéuticos obtenidos hasta el momento. Entre ellos se encuentra el BNCT secuencial, el uso de agentes

normalizadores de la vasculatura tumoral y la combinación de ambos. Todos estos temas serán abordados en profundidad en los próximos capítulos.

OBJETIVOS GENERALES

Estudios previos realizados por nuestro grupo permitieron establecer la eficacia de una única aplicación de BNCT mediado por los compuestos borados borofenilalanina (BPA), decahidrodecaborato de sodio (GB-10) o la administración combinada de ambos compuestos para tratar tumores de la bolsa de la mejilla del hámster sin radiotoxicidad en el tejido normal y sin exceder la radiotolerancia del tejido precanceroso. Si bien los resultados en términos de eficacia terapéutica fueron muy buenos, pueden ser optimizados. Asimismo, los ensayos clínicos de BNCT actualmente en curso (Kankaanranta L et al., 2012) presentan resultados terapéuticos alentadores, pero sub-óptimos. En este marco y sobre la base de los conocimientos de radiobiologia de BNCT obtenidos en nuestros estudios previos y en los estudios de otros grupos (por ejemplo Kato I et al., 2004; Ono K et al., 1999, Barth et al., 2005), buscamos optimizar la terapia de BNCT potenciando el control tumoral y minimizando su radiotoxicidad. Asimismo, nuestro objetivo incluye contribuir al conocimiento de los mecanismos de respuesta del tejido tumoral, tejido precanceroso y tejido normal. Nuestros estudios previos sugieren la utilidad de usar combinaciones de compuestos borados con distintas propiedades y distintos mecanismos de incorporación para optimizar la homogeneidad de los compuestos borados en las diferentes poblaciones tumorales. Demostramos previamente que el BNCT mediado por BPA actuaría mediante un mecanismo de direccionamiento celular, mientras que el BNCT mediado por GB-10 podría actuar mediante un mecanismo dirigido a los vasos tumorales (Trivillin VA et al., 2006). Nuestros estudios también evidenciaron la necesidad de abordar a las células tumorales que fueron refractarias al tratamiento, y demostraron la necesidad de minimizar la radiotoxicidad en el tejido premaligno circundante a los tumores tratados, ya que la mucositis allí alcanzada limita la dosis que se puede administrar al tumor. En un escenario clínico la mucositis bucal es un efecto frecuente durante la radioterapia convencional o BNCT para tumores de cabeza y cuello (Sonis ST 2004, Kankaanranta L et al., 2012). En este contexto, los protocolos de BNCT que

minimizan la mucositis tendrán mayor probabilidad de entregar dosis terapéuticas al tumor sin exceder la tolerancia del tejido normal y precanceroso.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El primer objetivo de la presente tesis es evaluar por primera vez el efecto de una modalidad terapéutica que denominamos BNCT secuencial sobre el control tumoral y la potencial radiotoxicidad en tejido normal y premaligno en el modelo de cáncer bucal en la bolsa de la mejilla del hámster. El BNCT secuencial involucra la aplicación de BNCT mediado por BPA, seguido de BNCT mediado por GB-10, con un intervalo de 24 ó 48 hs entre aplicaciones. Se comparará el efecto de BNCT secuencial con el efecto de igual dosis total a tumor de una única aplicación de BNCT mediado por (BPA + GB-10) administrados en forma combinada.

Como parte del objetivo de optimizar la eficacia terapéutica de BNCT y contribuir al conocimiento de los mecanismos de acción de esta terapia, se desarrollará, por primera vez, una técnica de "normalización" de los vasos sanguíneos tumorales en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster. Se ha descripto que la normalización de los vasos sanguíneos tumorales favorece la incorporación de agentes terapéuticos (Buchegger et al., 1995, Yeo SG et al., 2009).

Una vez puesta a punto la técnica, nuestro tercer objetivo es analizar el éxito terapéutico y potencial radiotoxicidad del BNCT mediado por BPA, posteriormente al tratamiento de normalización de los vasos sanguíneos tumorales aberrantes. Nuestra hipótesis de trabajo es que la normalización de los vasos sanguíneos tumorales contribuiría a una distribución homogénea de los compuestos borados dentro de las células tumorales, llevando a una mejora en la eficacia terapéutica del BNCT.

Basándonos en el éxito terapéutico obtenido con las dos nuevas modalidades, y teniendo en cuenta la severidad y reversibilidad de la mucositis en el tejido premaligno circundante al tumor, se evaluará el efecto terapéutico de la combinación de la normalización de los vasos sanguíneos tumorales con el BNCT secuencial.

Asimismo, para contribuir al conocimiento de la microdistribución de los compuestos borados sobre las células malignas y sobre el tejido normal y premaligno se plantea un estudio exhaustivo por autorradiografía neutrónica. Particularmente, se evaluará la distribución espacial del ^{10}B proveniente de GB-10 en los protocolos de BNCT secuencial, se analizará la distribución del BPA luego del tratamiento de normalización de los vasos sanguíneos, y se estudiarán los posibles cambios en la microdistribución del GB-10 luego del tratamiento de normalización y BPA-BNCT.

Los estudios descriptos contribuyen a explorar la potencial ventaja terapéutica de nuevos protocolos de BNCT y evaluar sus mecanismos de acción. De esta manera se espera contribuir al conocimiento de la radiobiología de esta compleja modalidad terapéutica y optimizar su eficacia.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describen las metodologías empleadas a lo largo de toda la tesis. En cada capítulo específico se abordarán de modo general, mientras que aquí se desarrollarán de manera más puntual.

1. Inducción de tumores en la bolsa de la mejilla del hámster y cuidado de los animales

El modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster se obtuvo sometiendo hámsteres Syrian (*Mesocricetus auratus*) jóvenes (6-8 semanas) a un protocolo de carcinogénesis química. El carcinógeno químico completo dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) se aplicó al 0,5% en aceite mineral, mediante topicaciones locales de aproximadamente 0,1 ml en la bolsa de la mejilla derecha del animal 2 veces por semana durante 12 semanas según una modificación del protocolo estándar de carcinogénesis (Shklar G, 1979). Las topicaciones se realizaron con una jeringa hipodérmica descartable sin aguja sin necesidad de anestesiar los animales (Figura 7a). Una semana después de finalizado el protocolo de inducción de tumores con DMBA los hámsteres fueron anestesiados periódicamente con Ketamina (70mg/kg de peso corporal)-Xilazina (10,5mg/kg de peso corporal) intraperitonealmente (i.p.) y se examinaron las bolsas tratadas con el fin de monitorear el desarrollo tumoral. Una vez que los tumores exofíticos desarrollaron un volumen superior a 1 mm^3, los animales fueron utilizados para los distintos estudios (Figura 7c).

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

Figura 7 - (a) Topicación de un hámster con DMBA en aceite mineral con jeringa hipodérmica sin aguja. (b) Exposición de la bolsa normal. (c) Exposición de la bolsa cancerizada exhibiendo un tumor rodeado de tejido premaligno.

Los animales fueron eutanasiados humanamente por decapitación bajo anestesia administrada i.p. de Ketamina (140 mg/kg p.c.) y Xilazina (21 mg/kg p.c.).

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las normas institucionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL CNEA), y bajo las normas de la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio" (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 1996).

2. Preparación de soluciones de boro

Para los estudios de biodistribución y BNCT *in vivo* se utilizaron como compuestos borados p-borofenilalanina (BPA) y decahidrodecaborato de sodio (GB-10).

Para las soluciones de BPA se utilizó la p-borofenilalanina (BPA; L-enantiómero, > 98 % enriquecida en ^{10}B de Glyconix Corp. conteniendo 4,9 % de boro por peso de BPA). El BPA fue convertido en solución por formación de un complejo con fructosa en una relación 1:1 molar en agua destilada. Las soluciones del complejo BPA-fructosa (BPA-F) a una concentración 0,14 M se prepararon el mismo día a ser utilizadas en los diferentes protocolos para evitar el precipitado de las mismas. El pH de la solución fue llevado a 10 para permitir la formación de los complejos. Se utilizó NaOH 10M y NaOH 1M para el ajuste fino siempre bajo

agitación y controlando continuamente el pH. Una vez que todos los sólidos estuvieron disueltos el pH se ajustó a 7,4 con HCl 10N, 6N y 0,6N para el ajuste fino. Finalmente las soluciones fueron filtradas con poro de 0,22 µm y se llevaron a la concentración adecuada por agregado de agua destilada en cantidad suficiente dentro de un matraz. Todas las soluciones obtenidas fueron transparentes.

Para preparar el decahidrodecaborato de sodio ($Na_2{}^{10}B_{10}H_{10}$) se empleó una solución de GB-10 (generosamente proporcionado por Neutron Therapies LLC, San Diego, CA), isotópicamente enriquecido en un 99% en ^{10}B. La solución madre de 100 mg ^{10}B/ml se diluyó 1:10 en agua destilada y fue almacenada a 4ºC hasta su utilización.

3. Estudios de biodistribución

Los estudios de biodistribución consisten en analizar la cantidad de boro acumulada en los diferentes tejidos del animal. Para ello, la solución en estudio es administrada al animal mediante el correspondiente protocolo de inyección y se la deja circular el tiempo deseado hasta que los diferentes tejidos del animal son biopsiados. En nuestros estudios de biodistribución para el modelo de la bolsa de la mejilla del hámster los tejidos a estudiar son: sangre, tumor, tejido premaligno, bolsa normal, mucosa de carrillo, paladar, parótida, lengua, piel, hígado, bazo, riñón, pulmón, médula y cerebro. Este procedimiento se realiza bajo anestesia i.p. de Ketamina (140 mg/kg p.c.) y Xilazina (21 mg/kg p.c.). Las muestras de tejido tienen que pesar entre 25 y 50 mg para la medición en ICP-OES y entre 10 y 30 mg para la medición en ICP-MS; si el peso es mayor se dificulta el procesado y si es menor aumentan los errores en la medición de boro. Todas las muestras de tejido son almacenadas a –20ºC y las de sangre (con EDTA al 5%) a 4ºC hasta su posterior pesado y procesamiento.

3.1 Biodistribuciones con BPA

La solución de BPA-F 0,14 M fue administrada de modo intraperitoneal y en bolo, en una dosis de 15,5 mg ^{10}B/kg de peso corporal. La inyección se realizó en hámsteres portadores de tumores inducidos mediante la carcinogénesis química. Basándonos en estudios previos de biodistribución realizados por nuestro grupo (Kreimann EL et al., 2001a; Kreimann EL et al., 2001b), los animales fueron eutanasiados 3 horas después de la administración del compuesto, justo después de tomar las muestras, ya que es ahí donde se encuentra la mayor relación entre el tumor y el tejido normal y concentraciones absolutas de boro en tumor que serían terapéuticamente útiles.

3.2 Biodistribuciones con GB-10

La solución de GB-10 (1:10) fue administrada de manera intravenosa y en bolo. La inyección se realizó en la vena yugular expuesta por cirugía bajo anestesia intraperitoneal con Ketamina (140 mg/kg p.c.)-Xilazina (21 mg/kg p.c.) y posterior sutura de la piel. La dosis administrada fue de 50 mg ^{10}B/kg de peso corporal. Las muestras de tejido fueron tomadas 3 horas post administración del compuesto, y luego los animales fueron eutanasiados (Heber EM et al., 2004).

3.3 Biodistribuciones con BPA + GB-10

La solución de BPA-F 0,14 M fue administrada simultáneamente con la solución de GB-10 (1:10). El BPA se administró de modo intraperitoneal y en bolo, en una dosis de 15,5 mg ^{10}B/kg de peso corporal, y el GB-10 se administró de manera intravenosa y en bolo, en una dosis de 50 mg ^{10}B/kg de peso corporal. La inyección de GB-10 se realizó en la vena yugular en un procedimiento quirúrgico bajo anestesia intraperitoneal con Ketamina (140 mg/kg p.c.)-Xilazina (21 mg/kg p.c.) y posterior sutura de la piel. Las biopsias se realizaron 3 horas después de la administración de ambos compuestos borados, y los animales fueron eutanasiados.

4. Valoración de Boro

4.1 Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivo (ICP-OES).

Todas las mediciones realizadas por esta metodología se hicieron en un equipo Perkin-Elmer, modelo Optima 3100 XL UV, axial.

Las muestras de los diferentes tejidos previamente obtenidos en los estudios de biodistribución fueron pesadas y digeridas durante 1 hora a 100ºC con 0,25 ml de una mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico y ácido nítrico. Luego de la digestión la solución se observó límpida y de color amarillento. A esta mezcla se le agregó un volumen de 600 μl de una solución al 5% de detergente Tritón X-100, y 200 μl de una mezcla de itrio (0,5 ppm) y estroncio (25 ppm) como estándar interno. El uso de un patrón interno (un elemento de concentración conocida que se agrega a cada una de las muestras y el cual no está presente naturalmente en ellas) es de suma importancia para controlar si la muestra ingresó correctamente al área de detección. Antes del análisis por ICP-OES la mezcla fue sonicada durante 90 minutos (Coderre JA et al., 1998).

Las muestras de sangre también fueron pesadas y digeridas por 1 hora a 100ºC con 1 ml de una mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico y ácido nítrico. Luego de la digestión y una vez que se comprobó que la solución estaba límpida y de un color amarillento se agregaron 3 ml de una solución al 5% de detergente Tritón X-100 y 1 ml de la mezcla de itrio y estroncio como patrón interno. De esa solución se extrajo 1ml para ser medido por ICP-OES. Estas muestras también fueron sonicadas durante 90 minutos antes de la medición.

La técnica de ICP-OES se basa en la vaporización, disociación, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma. La característica general de este proceso es que cada elemento emite energía a longitudes de onda específicas, propias de su característica química. A pesar que cada elemento emite energía a múltiples longitudes, en la técnica de ICP-OES es más común utilizar una única (o muy pocas) para un dado elemento. La intensidad de energía emitida a una determinada longitud de onda es

proporcional a la cantidad (o concentración) del elemento en la muestra analizada (Wittig A et al., 2008).

Para determinar la cantidad de elemento presente en la muestra es necesario realizar una curva de calibración relacionando la intensidad de la emisión de luz de alguna de las líneas espectrales con la concentración del elemento, obteniendo 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. Dichas curvas deben realizarse para cada uno de los elementos a medir en forma individual. Cuando se mide una muestra incógnita la intensidad encontrada se compara con la intensidad del elemento de la curva de calibración y de esta forma se calcula la concentración del elemento en la muestra. Usualmente solo es necesario medir una ó dos soluciones estándar además de un blanco para calibrar el instrumento (Boss CB y Fredeen KJ, 1999).

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

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

$$\frac{[\text{elemento}(\text{mg}/\text{l})] \times \text{volumen}(\text{l}) \times 1000}{\text{masa}(\text{g})} = \text{ppm}$$

Empleando este instrumento se obtuvieron los valores de contenido de boro en las distintas muestras de sangre y tejido para los distintos protocolos de administración de compuestos borados. Asimismo, estos valores de contenido de

boro se emplearon para hacer algunos de los cálculos dosimétricos para realizar los estudios de BNCT *in vivo*.

4.2 Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

Todas las mediciones realizadas por esta metodología se hicieron en un equipo Perkin-Elmer, modelo ELAN DRC2.

La técnica de ICP-MS es una variante de las técnicas de análisis por espectrometría de masas. Está basada en la unión del método de producción de iones por el acoplamiento de plasma inductivo con la espectrometría de masa como método de separación y detección de iones. Es una práctica de alta precisión y bajos límites de detección. Estos límites del equipo son de partes por trillón (ppt) para la mayoría de los elementos de la tabla periódica. Además, permite la determinación de concentraciones a nivel de partes por billón (en el orden de 0,2 ppb). El análisis por ICP-MS puede cuantificar cada isótopo individualmente (Wittig A, et al 2008). Particularmente, el boro tiene dos isótopos estables con masas atómicas de 10 y 11 que pueden medirse de forma separada por medio de esta técnica. En el caso de los estudios de biodistribución, los compuestos borados empleados pueden haberse sintetizado con boro natural (20% ^{10}B y 80% ^{11}B) o estar enriquecidos al 95-99% en ^{10}B. Sin embargo, cuando los compuestos borados se emplean en BNCT, deben estar enriquecidos al 95-99% en ^{10}B como se explicó anteriormente.

Las muestras de los diferentes tejidos previamente obtenidos en los estudios de biodistribución fueron pesadas y digeridas durante 1 hora a 100ºC con 0,25 ml de una mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico y ácido nítrico. Luego de la digestión la solución se observó límpida y de color amarillento. A esta mezcla se le agregó agua ultrapura hasta alcanzar un volumen de 10 ml. Antes de ingresar las muestras al equipo, fueron diluidas, 1:10 ó 2:10 (dependiendo del tejido y del compuesto borado en estudio), con el agregado de 0,20 ml de la mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico y ácido nítrico, y 0,25 ml de ^{6}Li como estándar interno, y llevadas a un volumen final de 10 ml con agua ultrapura.

A las muestras de sangre se les realizó el mismo proceso que a los tejidos, pero se digirieron con el doble de volumen de una mezcla 1:1 vol/vol de ácido sulfúrico y ácido nítrico (0,5 ml), y fueron diluidas 0,5:10 ó 0,2:10 antes de ser ingresadas en el equipo.

4.3 Autoradiografía neutrónica

Las muestras de tejido tomadas post-administración de los compuestos borados se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su conservación. Se seccionaron en un criostato Lipshaw USA, o en un criostato Thermo Shandon Cryotome E (AS620E), logrando cortes de alrededor de 10 µm y 30-50 µm de espesor consecutivamente. Los más delgados se depositaron sobre portaobjetos para realizar un análisis histológico, tras una tinción estándar de hematoxilina-eosina. Las muestras más gruesas se montaron sobre folias detectoras de trazas nucleares (Lexan™ de 250 µm de espesor o CR39 de 1mm de espesor). Las secciones montadas sobre el SSNTD se colocaron sobre una plancha de Lexan junto con el resto de las muestras y se cubrieron con otra folia detectora (de alguno de los materiales mencionados anteriormente) (Figura 8). Este segundo detector protege el material biológico y sirve como copia de resguardo de la imagen autorradiográfica. Las muestras fueron irradiadas con neutrones en la facilidad de columna térmica del reactor nuclear RA-3 (CNEA) (Miller M et al., 2009), con fluencias de 10^{12}n.cm^{-2} (para AQT) y 10^{13}n.cm^{-2} (para AQL).

Antes de procesar químicamente las folias de Lexan, los cortes de tejido fueron coloreados con hematoxilina y eosina, observados y fotografiados en un microscopio óptico con bajo aumento (1,25x ó 2,5x), con el objeto de obtener imágenes de la totalidad del corte. Para poder cuantificar las trazas en zonas específicas (epitelio, tejido conectivo, músculo, etc.), hay que fotografiar y delimitar las áreas de interés con algún tipo de sistema de referencia. Para ello se realizó una primera exploración de los cortes coloreados, utilizando un sistema de coordenadas obtenido con 4 perforaciones alrededor de cada corte (Figura 9), y luego se realizó una segunda exploración de las trazas ya reveladas utilizando el mismo sistema de referencia. Las observaciones histológicas pueden corroborarse con el corte consecutivo montado sobre vidrio.

Figura 8 – Muestras listas para ser irradiadas, montadas sobre el SSNTD, adheridas sobre una lámina de Lexan y cubiertas por otra lámina que sirve de copia de resguardo.

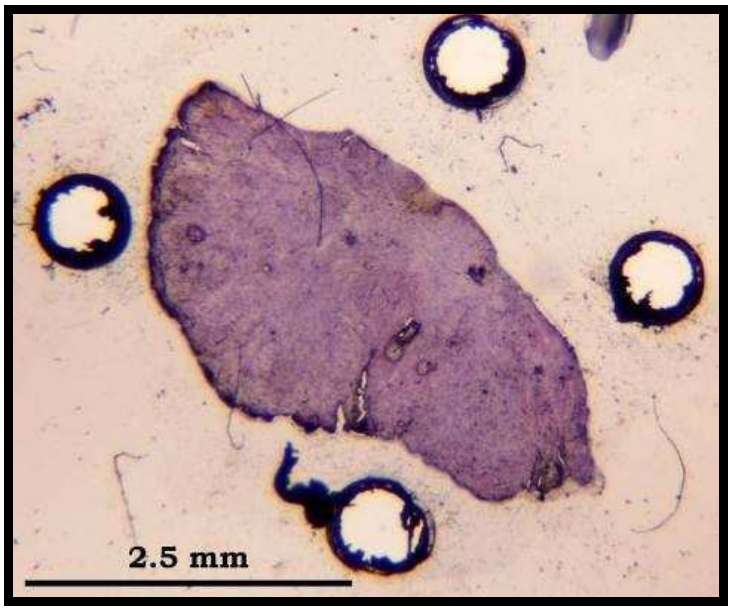


Figura 9 – Sistema de referencia, por perforaciones con taladro alrededor de la muestra, para marcado de las folias para AQT.

El tejido fue removido del detector con tripsina. Las folias de Lexan se revelaron con solución PEW (30g KOH + 80g alcohol absoluto + 90g agua destilada) a 70ºC durante 2 minutos para el análisis cuantitativo ó 6 minutos para el análisis cualitativo. En el caso del CR39, las condiciones fueron 20 minutos en una solución 6,25N de NaOH a 70°C. Las imágenes autorradiográficas para las

AQT fueron adquiridas en un microscopio Carl Zeiss MPM 800 con un objetivo X40/0,75 (LANAIS CNEA-CONICET). Se midió la densidad de trazas en 50 imágenes por muestra, utilizando un software de análisis de imágenes (Portu AM et al., 2011a).

Se utilizaron curvas de calibración con diferentes concentraciones de ácido bórico para obtener la concentración de boro correspondiente al promedio de la densidad de trazas medida. La concentración de boro en los remanentes de tacos cortados por criostato también se midieron por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

5. Tratamiento con talidomida

La talidomida es una droga antiangiogénica que se reportó como inductora de la normalización de los vasos sanguíneos en un modelo murino. Ese estudio determinó la importancia de encontrar el protocolo óptimo para determinar la ventana de normalización (Segers J et al., 2006). Dada la necesidad de desarrollar un protocolo de normalización de vasos sanguíneos tumorales en nuestro modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, se realizaron algunos estudios piloto para identificar la ventana de normalización utilizando diferentes dosis de talidomida y tiempos de aplicación (n=8 hámsteres cancerizados con un total de 48 tumores).

Antes de, y 1 a 15 días después de la primera inyección de talidomida, las bolsas (cancerizada y no cancerizada) fueron evertidas para su examinación macroscópica y microscópica a baja magnificación (1,25x). Esta última se realizó *in vivo* bajo anestesia con Ketamina (70mg/kg de peso corporal)-Xilazina (10,5mg/kg de peso corporal) intraperitoneal. La transparencia de las bolsas hizo posible la observación de los vasos sanguíneos *in vivo* en el tejido premaligno y en el tejido normal de la bolsa de la mejilla. Sin embargo, no fue posible observar *in vivo* los vasos dentro de los tumores sólidos.

En base a estos estudios preliminares, se seleccionó un protocolo que consistió en la administración de 2 dosis de 200 mg de talidomida/kilo de peso

corporal en Dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración de 112 mg talidomida/ml DMSO intraperitonealmente en dos días consecutivos. La talidomida fue donada generosamente por Triquim S.A. (Argentina). Animales con tumor pero sin tratamiento con talidomida fueron utilizados como grupo control. Adicionalmente, se utilizaron controles con DMSO sólo para evaluar su potencial efecto sobre los vasos sanguíneos de los hámsteres cancerizados. Dos dosis de DMSO (1,8 ml/kg de peso corporal cada dosis) fueron administradas i.p. en dos días consecutivos al igual que en el protocolo de talidomida (n=4 hámsteres cancerizados con un total de 20 tumores).

Para estudiar la toxicidad se trataron animales con tumor (n=8 hámsteres cancerizados con un total de 34 tumores) y hámsteres no cancerizados (n=5) como se describió anteriormente. El peso corporal y los signos clínicos fueron monitoreados diariamente durante la primer semana y luego una vez por semana hasta alcanzar un mes. La respuesta clínica a la anestesia en los animales tratados con talidomida también fue examinada en hámsteres con tumor (n=9 hámsteres cancerizados con un total de 76 tumores) y no cancerizados (n=5). Estas observaciones fueron comparadas con datos de estudios previos en hámsteres con tumor y hámsteres no cancerizados pero no tratados con talidomida.

6. Ensayo de permeabilidad de vasos sanguíneos

Los estudios de permeabilidad vascular fueron realizados de acuerdo a una modificación de la técnica de Chen et. al. (2006) en hámsteres Syrian con tumores tratados con talidomida (n=9), no tratados con talidomida (n=10) y tratados con DMSO sólo (n=4). Se administraron 3 ml de Azul de Evans (EBD) al 2% masa/volumen por kg de peso corporal, de forma intravenosa y se lo dejó circular durante 30 minutos. Para remover el colorante intravascular se perfundieron los animales a través de la aurícula derecha durante 8 minutos con solución fisiológica (NaCl 0,9%) a una presión constante de 120 mmHg (Figura 10). Los tejidos de interés fueron removidos, seccionados, pesados y congelados en nitrógeno líquido. Los tejidos estudiados fueron tumor, tejido premaligno, bolsa normal, hígado y

riñón. El procedimiento se realizó bajo anestesia Ketamina (140 mg/kg p.c.)-Xilazina (21 mg/kg p.c.) i.p.. Luego, para extraer el colorante retenido se homogeneizó cada muestra de tejido en 2 ml de ácido tricloroacético (50% masa/volumen) y se centrifugó a 10000 rpm por 20 minutos.

Los niveles de colorante se cuantificaron como µg EBD/100 mg tejido leyendo la absorbancia en un espectrofotómetro GBC UV/VIS 920, a una longitud de onda de 620 nm. La curva de calibración se realizó con las siguientes concentraciones de EBD en ácido tricloroacético (m/v): 0,00125%, 0,001%, 0,0005%, 0,00025% y 0,000125%.

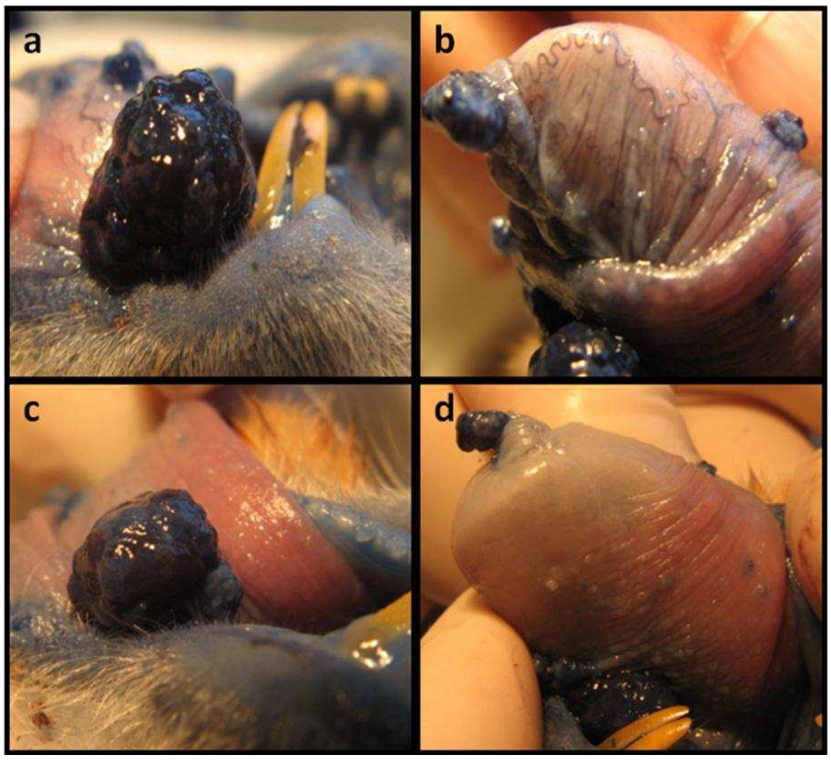


Figura 10 – a y b) Bolsas con tumor exibiendo el EBD en circulación. c y d) Mismas bolsas y tumores que en a y b, pero luego de haberlos perfundido con solución fisiológica por 8 min a 120 mmHg (ya no se observa al colorante en circulación).

7. Morfología de vasos sanguíneos

Como marcador de las paredes vasculares se utilizó la tinción inmunohistoquímica de Factor VIII en cortes de parafina de 12 µm de espesor. Según lo determinado por Aromando et al. (2009), de todos los marcadores estudiados, el Factor VIII fue el mejor para visualizar las secciones vasculares en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster.

La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada con H_2O_2 al 100% en metanol. Los cortes fueron transferidos a PBS pH 7,4. Después de desenmascarar el antígeno por la digestión de la proteasa con proteinasa K al 10% en PBS y permeabilización del tejido con acetona enfriada a -20° C durante 10 minutos (modificado de Tonar et al. 2008), los cortes fueron incubados en un anticuerpo vWF policlonal de conejo antihumano (Dako Cytomation, High Wycombe, Inglaterra) a una dilución de 1/4000 durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS-albúmina, los cortes fueron incubados con los anticuerpos secundarios y terciarios usando el kit de biotina-estreptavidina-peroxidasa (Kit Multilink; Biogenex). Las muestras fueron incubadas con 3,3-diaminobencidina (DAB, DAKO), coloreadas con hematoxilina y montadas. Se tomaron imágenes digitales de las secciones vasculares inmunomarcadas para Factor VIII. Los vasos se contaron manualmente empleando el software de análisis de imágenes ImageJ (ImageJ 1.42q Wayne Rasband NIH, EE.UU.. Http://rsb.info.nih.gov/ij Java 1.6.0_10 (32 bits) / Institutos Nacionales de Salud) según lo descripto por Padera TP et al. (2004) y Hagendoorn J et al. (2006).

La Relación de Aspecto (RA) - relación entre el diámetro máximo y el mínimo - de los vasos marcados se calculó como un indicador de la compresión vascular de acuerdo con Hagendoorn et al. (2006). Una RA de 1 representa un círculo perfecto. Cuanto mayor sea la RA, mayor será la compresión del vaso. La RA se midió en las secciones de los tumores de los animales tratados con talidomida (2 hámsteres cancerizados con un total de 4 tumores, n = 115 secciones vasculares). Los valores se compararon con datos de animales controles (que corresponden a animales cancerizados o no cancerizados no tratados con talidomida) obtenidos en el contexto de un estudio paralelo (Aromando RF et al., 2009), realizado

exactamente con la misma metodología que para los animales tratados con talidomida. Para tumor el n fue de 149 secciones vasculares y para el tejido normal (no cancerizado) el n fue de 98 secciones vasculares.

Durante la evaluación, se prestó especial atención a la posible presencia de proliferaciones microvasculares glomeruloideas (PMGs) que se han descripto en una variedad de tumores humanos (Nagy et al 2009) y en tumores de la bolsa de la mejilla del hámster (Aromando RF et al., 2009).

8. BNCT *in vivo*

Todas las irradiaciones fueron realizadas en una fuente de neutrones construida para aplicaciones biomédicas en BNCT por la Comisión Nacional de Energía Atómica en la facilidad del Reactor Nuclear de investigación y producción RA-3 situado en el Centro Atómico Ezeiza, provincia de Buenos Aires (Miller M et al., 2009). Un túnel que penetra la estructura de grafito de la columna térmica permite la inserción de las muestras dentro de la nube isotrópica de neutrones mientras el reactor se encuentra en normal funcionamiento para la producción de radioisótopos (Figura 11). El campo de neutrones está muy bien termalizado, haciendo que la componente de dosis de irradiación proveniente de la colisión de neutrones rápidos en hidrógeno sea insignificante. La temperatura en el sitio de irradiación en el túnel fue de aproximadamente 30ºC. Por los cortos tiempos de irradiación no fue necesario mantener húmedos los tumores.

Para proteger el cuerpo del animal del flujo de neutrones térmicos se construyó un blindaje que permite exponer la bolsa de la mejilla del hámster a ser irradiada. El recinto fue fabricado con láminas de acrílico rellenas de carbonato de litio enriquecido en un 95% en ^{6}Li (Figura 12).

El flujo promedio de neutrones térmicos en la bolsa de la mejilla del hámster fue de $9,1 \times 10^{9}$ n cm^{-2} s^{-1} en la posición más alejada del blindaje y de $7,7 \times 10^{9}$ n cm^{-2} s^{-1} en la posición central. El flujo de neutrones térmicos dentro del blindaje fue al menos un factor 20 veces menor que el flujo en la bolsa expuesta. La tasa de dosis de rayos γ en el aire en la posición de irradiación fue de $6,5 \pm 0,5$ Gy h^{-1}.

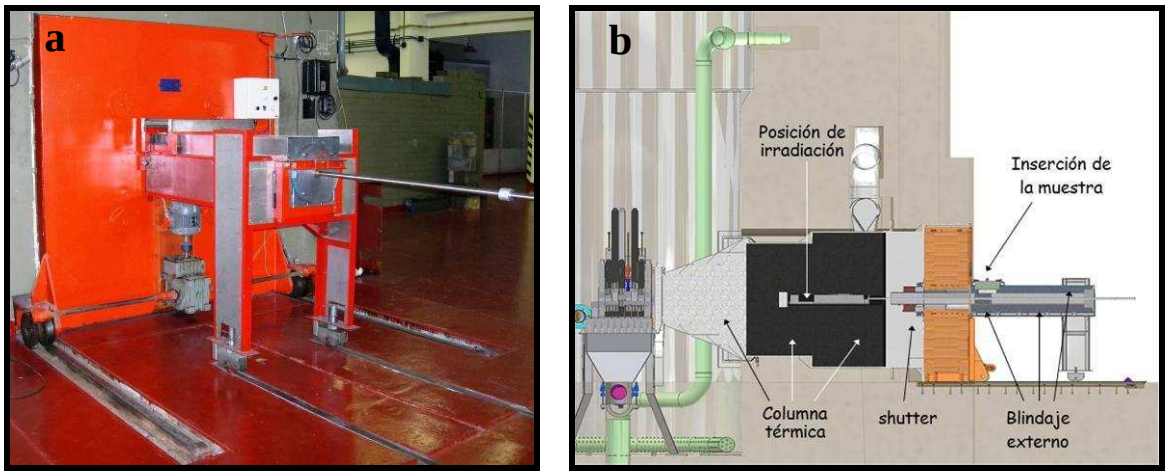


Figura 11 - (a) Fotografía de la facilidad de irradiación del RA-3 del Centro Atómico Ezeiza (Miller M et al., 2009). (b) Esquema de la columna térmica y facilidad del RA-3 (gentileza del personal de operación del RA-3).

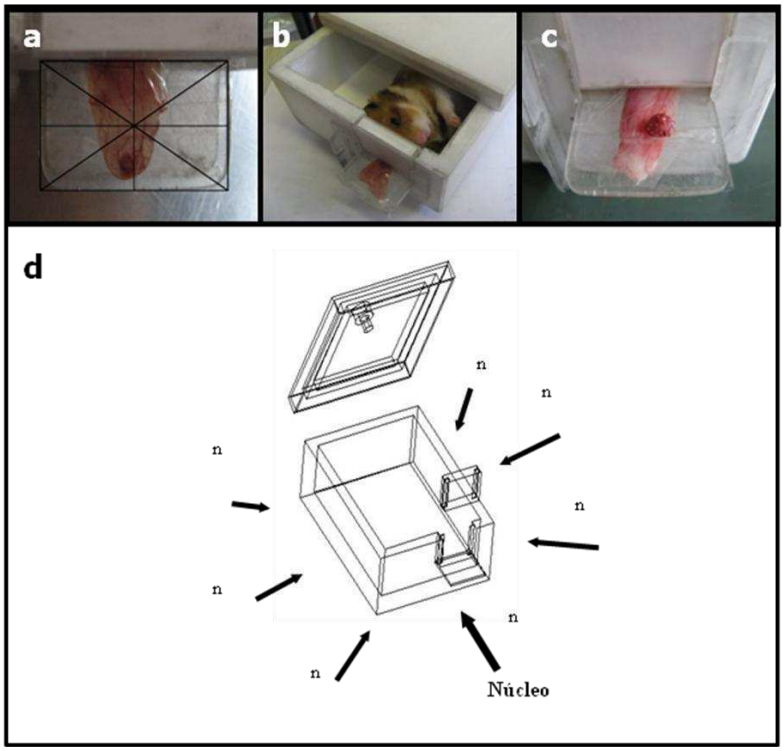


Figura 12 – a) Esquema que indica la posición central del trampolín al momento de la irradiación. b) Hámster dentro del blindaje. c) Bolsa con tumor lista para ser irradiada, con el cuerpo del hámster protegido por el blindaje. d) Esquema de uno de los blindajes utilizados en el RA-3 para la irradiación de las bolsas de los hámsteres.

Antes de cada irradiación, se calculó el volumen tumoral midiéndole a cada uno, con un calibre digital, los tres diámetros ortogonales mayores (d). Se expresó

en mm^3 como d_1 x d_2 x d_3 de acuerdo a trabajos previos (Kreimann EL et al., 2001; Trivillin VA et al., 2006). Arbitrariamente se establecieron 3 grupos de tamaño tumoral, chicos ($<10mm^3$), medianos ($10mm^3 < X > 100mm^3$) y grandes ($>100mm^3$), para evaluar una potencial respuesta diferencial de los tumores a la terapia en función de su tamaño en el momento de la irradiación. Para facilitar el seguimiento se fotografió y se realizó un diagrama de cada bolsa con la ubicación de todos sus tumores.

8.1 BNCT secuencial

Un grupo de hámsteres (n=8) con un total de 128 tumores fue tratado con BNCT mediado por BPA seguido de BNCT mediado por GB-10 24 hs más tarde (Sec-24hs-BNCT). Un segundo grupo de hámsteres (n=9) con un total de 92 tumores fue tratado con las mismas aplicaciones de BNCT, pero con 48 horas de diferencia (Sec-48hs-BNCT). La dosis absorbida total prescripta a tumor en ambos casos fue 9,93 Gy. La dosis absorbida real puede ser diferente de la dosis absorbida prescripta debido a las variaciones en el contenido de boro. Para BPA-BNCT, el BPA (0,14 M) fue administrado por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 15,5 mg ^{10}B/kg de peso corporal. El GB-10 fue administrado a una dosis de 50 mg ^{10}B/kg de peso corporal en bolo por inyección en la vena yugular expuesta quirúrgicamente bajo anestesia intraperitoneal con Ketamina (140 mg/kg pc)-Xilazina (21 mg/kg p.c.). Los animales fueron irradiados 3 horas después de la administración del compuesto borado correspondiente bajo anestesia i.p. con Ketamina (140 mg/kg p.c.)-Xilazina (21 mg/kg p.c.). Un tercer grupo de hámsteres (n=5) con un total de 35 tumores se irradió con 2 aplicaciones de Haz Sólo (HS) con un intervalo de 24 horas (Sec-24hs-HS). Finalmente, un cuarto grupo de hámsteres (n=2) con un total de 31 tumores se trató con 2 aplicaciones de Haz Sólo pero con las irradiaciones separadas por 48 horas, (Sec-48hs-HS). Un quinto grupo de animales (n=5) con un total de 76 tumores fue tratado con una sola aplicación de BNCT mediado por la combinación de GB-10 y BPA [(BPA+GB-10)-BNCT]. La dosis absorbida total prescripta a tumor se hizo coincidir con la dosis total prescripta a tumor en los protocolos de Sec-BNCT (9,93 Gy) y fue superior a la dosis utilizada en estudios previos (Trivillin VA et al., 2006). Para el

protocolo (BPA+GB-10)-BNCT, el BPA (0,14 M) fue administrado i.p. a una dosis de 15,5 mg ^{10}B/kg de peso corporal y el GB-10 fue administrado por vía intravenosa (i.v.) a una dosis de 50 mg ^{10}B/kg de peso corporal inmediatamente después. Los animales fueron irradiados 3 horas después de la administración de los compuestos borados. Un sexto grupo de animales (n=5) con un total de 35 tumores se trató con una única irradiación de Haz Sólo. Todas las irradiaciones de Haz Sólo se realizaron para evaluar el efecto de la dosis de fondo (rayos gamma y protones inducidos) de los tratamientos de BNCT. Para ello las irradiaciones de Haz Sólo se hicieron a la misma fluencia neutrónica que la empleada en el tratamiento de BNCT correspondiente.

La bolsa normal de animales no cancerizados también fue tratada con cada protocolo para evaluar la potencial radiotoxicidad sobre el tejido normal (n=5/protocolo).

Por estudios previos de biodistribución se vio que la concentración de boro en sangre y tejidos luego de 24 horas de administrado el BPA es insignificante (Heber EM et al., 2004). Por ello, para los protocolos de Sec-BNCT se consideró que el BPA no contribuye a los niveles de boro al momento de la administración del GB-10. Adicionalmente, se realizaron estudios para evaluar la potencial influencia de BPA-BNCT sobre la captación de GB-10 en tumor y tejido premaligno luego de 24 ó 48 hs de irradiados. Estas mediciones de boro se realizaron por los 3 métodos descriptos anteriormente en la sección 4 (valoración de boro).

8.2 "Normalización" de vasos sanguíneos tumorales en BNCT

Se irradiaron 6 grupos de animales en diferentes condiciones. El primero (7 hámsteres con un total de 116 tumores) fue tratado con talidomida (según punto 5 de éste capítulo) seguido de BNCT mediado por BPA 48 horas después de la primera dosis de talidomida (Ta+ BPA-BNCT). El segundo (5 hámsteres con un total de 100 tumores) fue tratado sólo con BNCT mediado por BPA (Ta- BPA-BNCT). Se prescribió una dosis total de 4 Gy a tumor. El tercero (6 hámsteres con un total de 54 tumores) fue tratado con talidomida seguido de Haz Sólo después de 48 horas de la primera dosis de talidomida (Ta+ HS). El cuarto grupo (6 hámsteres con un total de 50 tumores) se trató exclusivamente con Haz Sólo (Ta-

HS). La irradiación con neutrones se realizó 48 horas después de la primera dosis de talidomida en los animales Ta+, el tiempo previamente establecido como la ventana de la normalización de los vasos sanguíneos tumorales. La irradiación de Haz Sólo (irradiación con neutrones térmicos sin la administración previa de un compuesto borado) se realizó para evaluar el efecto de la dosis de fondo (es decir, rayos gamma y protones inducidos) de los tratamientos BNCT y fueron igualados a la fluencia de neutrones térmicos de los tratamientos de BNCT correspondientes, resultando en una dosis total absorbida en tumor de 0,89±0,02 Gy. De esta manera, todos los animales (del primero al cuarto grupo) fueron expuestos a la misma fluencia de neutrones térmicos ($1,9 \times 10^{12}$ n cm^{-2}). Para los protocolos de BPA-BNCT, el BPA (0,14 M), se administró por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 15,5 mg ^{10}B/kg de peso corporal (p.c.). Los animales fueron irradiados tres horas después de la administración del BPA bajo anestesia [ketamina i.p. (140 mg/kg de peso corporal)-xilazina (21 mg/kg de peso corporal)]. La dosis y el tiempo después de la administración del BPA a utilizar para la irradiación fueron seleccionados sobre la base de estudios previos (Kreimann EL et al., 2001a).

Se incluyeron otros dos grupos de animales irradiados con Haz Sólo a mayor dosis (alta dosis de Haz Solo ó adHS) únicamente para explorar el potencial efecto de la talidomida como protectora de la mucositis inducida por radiación (independientemente de su potencial acción sobre la entrega de BPA) en un escenario de mayor toxicidad. Este quinto grupo (6 hámsteres con un total de 48 tumores) fue tratado con talidomida seguido por Haz Sólo a una dosis absorbida total de 5,6±0,5 Gy en tumor (Ta+ adHS) y el sexto (6 hámsteres con un total de 53 tumores) fue tratado de forma similar, pero sin tratamiento previo con talidomida (Ta- adHS).

Los cálculos dosimétricos para los protocolos de BPA-BNCT se basaron en estudios de biodistribución de boro, con mediciones realizadas por ICP-MS.

8.3 "Normalización" de vasos sanguíneos tumorales + BNCT Secuencial

Un grupo de hámsteres (n=8) con un total de 78 tumores fue tratado con talidomida (según punto 5 de éste capítulo) y luego de 48 horas de la primera inyección se le aplicó BNCT secuencial con un intervalo de 48 horas entre el BNCT mediado por BPA y el BNCT mediado por GB-10 (Ta+ Sec-BNCT). La dosis absorbida total prescrita a tumor fue 9,93 Gy, de igual manera que para Sec-BNCT sin tratamiento previo con talidomida (ver 8.1 de esta sección). La dosis real absorbida puede ser diferente de la dosis prescripta absorbida debido a las variaciones en el contenido de boro. Para BPA-BNCT, el BPA (0,14 M) fue administrado por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 15,5 mg ^{10}B/kg de peso corporal. El GB-10 fue administrado a una dosis de 50 mg ^{10}B/kg de peso corporal en bolo por inyección en la vena yugular expuesta quirúrgicamente bajo anestesia intraperitoneal con Ketamina (140 mg/kg p.c.)-Xilazina (21 mg/kg p.c.). Los animales fueron irradiados 3 horas después de la administración del compuesto borado correspondiente bajo anestesia i.p. con Ketamina (140 mg/kg p.c.)-Xilazina (21 mg/kg p.c.). Un segundo grupo de hámsteres (n=4) con un total de 33 tumores fue tratado con talidomida (según punto 5 de éste capítulo) e irradiado con Haz Sólo (HS) con un intervalo de 48 horas, (Ta+ Sec-HS). Las irradiaciones de Haz Sólo se hicieron a la misma fluencia neutrónica que la empleada en el tratamiento de BNCT.

El control tumoral de Ta+ Sec-BNCT fue comparado con el de Sec-48hs-BNCT (modalidad descripta en 8.1 de esta misma sección). Asimismo, los resultados obtenidos para Ta+ Sec-HS fueron comparados con los de Sec-48hs-HS (también descripto en 8.1 de esta misma sección).

9. Seguimiento post BNCT

La respuesta tumoral fue evaluada por inspección visual, toma de imágenes y determinación del volumen tumoral a 1, 7, 14, 21 y 28 días post-irradiación. El volumen tumoral fue determinado por la medición externa con calibre digital de los tres diámetros ortogonales mayores (d) y expresado en mm^3 como $d_1 \times d_2 \times d_3$

de acuerdo a trabajos previos (Kreimann EL et al., 2001b; Trivillin VA et al., 2006). La respuesta tumoral se clasificó como respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), respuesta tumoral total (RTT), o progresión tumoral (Pr). La respuesta completa fue definida como la desaparición del tumor según la inspección visual y la ausencia de evidencia de tumor en el análisis histológico cuando fue posible evaluarlo. La respuesta parcial fue definida como una reducción en el tamaño tumoral respecto al volumen inicial antes del tratamiento. La respuesta tumoral total es la suma de la respuesta parcial y la respuesta completa. La progresión tumoral se definió como crecimiento tumoral y se interpretó como una falta de efecto terapéutico. Además, se determinaron la respuesta parcial a menos del 50% del volumen tumoral inicial ($RP_{0,5}$) y la $RTT_{0,5}$ (como la suma de la $RP_{0,5}$ y de la RC).

Una vez finalizado el seguimiento, los animales fueron eutanasiados bajo anestesia [Ketamina (140 mg/kg pc)-Xilazina (21 mg/kg pc)] y se tomaron muestras de los tumores que no respondieron al tratamiento o solamente lo hicieron parcialmente. También se tomaron muestras del tejido premaligno y de la bolsa sin cancerizar. Todos los tejidos fueron fijados en formol 10%, incluidos en parafina, cortados por micrótomo y coloreados con hematoxilina y eosina para su análisis histológico.

Para evaluar la toxicidad fueron monitoreados periódicamente a lo largo de todo el período de seguimiento el estado clínico de los animales y sus pesos corporales. También se evaluó la respuesta del tejido premaligno y el tejido normal. En los hámsteres normales irradiados de cada protocolo, el seguimiento fue en los mismos tiempos en que se evaluaron los tumores, y luego, una vez por semana hasta los 6 meses post tratamiento.

9.1 Evolución natural de la enfermedad

A modo de control se evaluó la evolución natural de la enfermedad en un grupo de hámsteres con tumor (n=77 tumores). La evaluación se realizó del mismo modo que para los animales tratados con BNCT. Si bien se aplicará el término respuesta tumoral, se hará con fines comparativos, ya que en este caso no se aplica ningún tipo de tratamiento. Es decir que se interpretará como RTT a

los casos donde se observe una reducción espontánea del volumen de los tumores.

10. Evaluación de la mucositis

Se valoró semicuantitativamente la mucositis en el tejido premaligno y en la bolsa normal de acuerdo a una escala basada en características macroscópicas adaptada de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud para la mucositis oral humana (Lopez Castaño F et al., 2005) y de la escala elaborada para la bolsa normal de hámster de Sonis et al. (2000). Nuestra escala de valoración consta de seis grados: Grado 0: apariencia saludable, sin erosión o vasodilatación; Grado 1: eritema y/o edema y/o vasodilatación, sin evidencia de erosión; Grado 2: eritema y/o edema severo, vasodilatación y/o erosión; Grado 3: eritema y/o edema severo, vasodilatación y formación de úlceras < 2 mm de diámetro; Grado 4: eritema y/o edema severo, vasodilatación y formación de úlceras > 2 mm de diámetro; Grado 5: virtualmente ulceración completa. En la figura 13 se ilustran, a modo de ejemplo, diferentes grados de mucositis.

Se consideró que todas las bolsas cancerizadas comenzaron los tratamientos exhibiendo grado 1 de mucositis, mientras que las no cancerizadas lo hicieron desde grado 0.

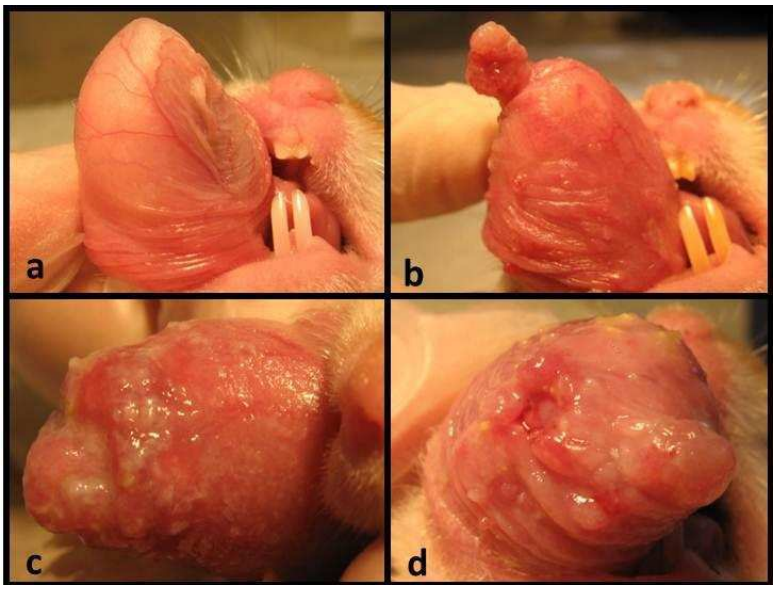


Figura 13 – Ejemplos de diferentes grados de mucositis. a) Bolsa exhibiendo Grado 0 de mucositis; b) Bolsa exhibiendo Grado 1 de mucositis; c) Bolsa exhibiendo Gado 2 de mucositis; d) Bolsa exhibiendo Grado 4 de mucositis (con úlcera > 2 mm de diámetro).

11. Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias entre los animales tratados con talidomida y los animales control fue determinada por el test *t* de Student (para el ensayo de permeabilidad vascular) o ANOVA (para el análisis morfológico de la vasculatura).

La significancia estadística de las diferencias en los contenidos de boro fue evaluada por el test *t* de Student. El análisis estadístico de las diferencias en la respuesta tumoral y la mucositis en el tejido premaligno fueron evaluadas por un test de Fisher. En todos los casos la significancia estadística fue establecida a $p = 0{,}05$.

Para el cálculo del error estándar (EE) se utilizó la siguiente fórmula:

$$SE_p = \sqrt{\frac{p \times (1 - p)}{n}} \times 100$$

donde p es la proporción muestral y n es el número muestral.

CAPÍTULO 1

BNCT SECUENCIAL

1. Introducción

Como ya se explicó en el capítulo introductorio, BNCT es una modalidad binaria en la cual un compuesto rico en el isótopo ^{10}B se acumula en forma preferencial en células malignas y se irradia con un flujo de neutrones térmicos. El corto alcance de las partículas letales que se generan, en la reacción de captura, limita el daño a las células que contienen el ^{10}B sin causar daño significativo al tejido normal. Para garantizar el éxito terapéutico se debe alcanzar una importante diferencia de concentración de los compuestos transportadores de ^{10}B entre las células normales y las tumorales, y una concentración absoluta de ^{10}B suficientemente alta en tumor.

Hasta el momento, los resultados de los ensayos clínicos de BNCT en el mundo han mostrado una posible, aunque no concluyente, ventaja terapéutica para esta técnica. Para las facilidades de BNCT basadas en reactores no se necesita desarrollar nueva tecnología. Ya se ha demostrado que las facilidades de irradiación basadas en reactores de alta intensidad son adecuadas para un alto rendimiento clínico del BNCT (Harling OK, 2009). Además, están siendo desarrolladas fuentes de neutrones basadas en aceleradores que podrán, eventualmente, proveer otra opción diferente a los reactores de fisión (Barth RF et al., 2012). Por este motivo es que la entrega de los compuestos borados debe ser optimizada para aumentar la captación dentro del tumor y mejorar la microdistribución celular, especialmente en las diferentes subpoblaciones celulares tumorales (Barth RF et al., 2005). Basado en datos experimentales con animales, un incremento en la dosis o la optimización de la entrega de estas drogas podría tener un impacto significativo en la captación del tumor y la distribución espacial (por ejemplo Barth RF et al., 2004).

La relevancia clínica de buscar nuevas estrategias terapéuticas para los carcinomas de células escamosas (SCC) de cabeza y cuello radica en la relativamente pobre tasa de sobrevida de 5 años, y en los grandes defectos tisulares producidos por las extensas cirugías. El uso del modelo de cáncer bucal

de la bolsa de la mejilla del hámster ha sido propuesto previamente y validado por nuestro grupo para explorar nuevas aplicaciones de BNCT, estudiar su radiobiología y aumentar la eficacia terapéutica (Kreimann EL et al., 2001b). El modelo de la bolsa de la mejilla del hámster está ampliamente aceptado como modelo de cáncer bucal (Salley JJ, 1954). El protocolo de carcinogénesis induce cambios que se asemejan al proceso de transformación maligna que ocurre espontáneamente en la mucosa oral humana. Así, este modelo de carcinogénesis provee tumores rodeados de tejido premaligno (también denominado potencialmente maligno o precanceroso), que tiene relevancia clínica por ser el limitante de dosis. Si bien este modelo posee la ventaja de asemejarse al proceso que tiene lugar en el cáncer bucal humano, sin embargo, presenta limitaciones sobre los criterios finales de valoración que pueden ser usados a la hora de evaluar la respuesta del BNCT, como la aparición de nuevos tumores primarios en el tejido premaligno.

Los primeros estudios de nuestro laboratorio han demostrado que el BPA entrega cantidades terapéuticamente útiles de ^{10}B a los SCC en la bolsa de la mejilla del hámster (Kreimann EL et al., 2001a) y mostraron el éxito terapéutico del BNCT mediado por BPA para tratar los tumores de ese modelo sin toxicidad sobre el tejido normal (Kreimann EL et al., 2001b). Sin embargo, se han propuesto diferentes estrategias para optimizar las ventajas terapéuticas del BNCT y sortear los potenciales problemas. Como la llegada a todas las poblaciones celulares del tumor (en tumores heterogéneos) es crítica para el éxito terapéutico del BNCT, se ha postulado que la administración combinada de diferentes compuestos borados, con diferentes propiedades y mecanismos de captación complementarios, debería aumentar la eficacia terapéutica del BNCT (Ono K et al., 1999; Trivillin VA et al., 2006).

GB-10 forma el anión $[B_{10}H_{10}]^{2-}$ en solución acuosa y es un compuesto difusivo. Inicialmente fue propuesto para el tratamiento de tumores cerebrales. Dado que no atraviesa la membrana hematoencefálica (BHE) intacta, la selectividad dependería de la interrupción de la BHE en el tumor (Sweet WH, 1997). En el modelo del hámster, el GB-10 fue capaz de entregar cantidades terapéuticamente útiles de boro, aunque no selectivamente (Heber EM et al.,

2004). En oposición al paradigma convencional del BNCT que propone que el daño selectivo al tumor está dado por la captación diferencial del compuesto borado, estudios previos demostraron que el BNCT mediado por GB-10 actúa selectivamente en el tumor dañando los vasos sanguíneos tumorales sin causar daño en los de otros tejidos (Trivillin VA et al., 2004; Trivillin VA et al., 2006). La estructura y función de los vasos angiogénicos del tumor están alteradas (Carmeliet P y Jain RK, 2000), haciéndolos más sensibles al BNCT que los del tejido normal y premaligno. Asimismo, las altas concentraciones de boro en sangre contribuirían a este efecto proveyendo un mecanismo de acción selectivo para un compuesto borado difusivo. En contraste, el BPA es incorporado selectivamente en el tumor, con lo cual, el BPA-BNCT actuaría directamente en las células tumorales, mientras que el GB-10-BNCT lo haría indirectamente a través del daño a los vasos sanguíneos tumorales. El BNCT mediado por la combinación de BPA y GB-10 combinaría el direccionamiento celular y vascular para alcanzar mayores respuestas tumorales sin toxicidad en el tejido normal y una mucositis reversible, pero potencialmente limitante de dosis, en el tejido premaligno (Pozzi ECC et al., 2009). El GB-10-BNCT pareciera inducir la muerte de las células tumorales por daño a las células endoteliales, generando una isquemia tisular similar a la producida por la terapia fotodinámica (Trivillin VA et al., 2006).

Estudios previos de BNCT en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster en la columna térmica del reactor nuclear RA-3 mostraron una marcada eficacia terapéutica, sin embargo, sería deseable incrementarla (Pozzi ECC et al., 2009). El escalamiento de dosis está limitado por la mucositis producida en el tejido premaligno limitante de dosis. A pesar de las diferencias entre los estudios clínicos en cáncer de cabeza y cuello y los estudios en el modelo del hámster, los hallazgos experimentales podrían contribuir a entender y dar solución a los posibles problemas que pudieran encontrarse en los protocolos clínicos de BNCT. La mucositis oral es un efecto secundario muy frecuente durante la radioterapia convencional para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello (Coderre JA y Morris GM, 1999; Sonis ST, 2004), que afecta aproximadamente al 80% de los pacientes (Sonis ST et al., 1999). Hasta el momento, no existe ninguna manera efectiva de tratar o prevenir la mucositis (Sonis ST, 2009). La

mucositis oral también es limitante de dosis en BNCT para tumores de cabeza y cuello (Kankaanranta L et al., 2007). Por lo tanto, los protocolos de BNCT que minimicen la mucositis tendrán mayor probabilidad de entregar dosis terapéuticas al tumor sin exceder la tolerancia del resto de los tejidos.

Aquí, nuestro objetivo fue evaluar la respuesta tumoral y la potencial radiotoxicidad de un nuevo protocolo de BNCT denominado "BNCT Secuencial", basado en la aplicación de BPA-BNCT seguida de GB-10-BNCT con un intervalo de 24 ó 48 horas entre ambos tratamientos. Nuestra hipótesis fue que esta estrategia incrementaría la eficacia terapéutica (llegando a las poblaciones celulares refractarias al primer tratamiento), sin causar daño significativo al tejido normal o al tejido premaligno limitante de dosis.

2. Resultados

Para este estudio se utilizaron 6 grupos de animales, en tres de ellos se aplicaron los protocolos de BNCT propiamente dichos, mientras que en los otros tres se estudiaron los efectos de dosis de fondo (protocolos de Haz Sólo). La descripción detallada de todos estos grupos se encuentra en Materiales y Métodos, sección 8.1 (BNCT secuencial). Brevemente, Grupo I: Sec-24hs-BNCT (animales con tumor tratados con BNCT mediado por BPA, seguido de BNCT mediado por GB-10 luego de 24 horas); Grupo II: Sec-48hs-BNCT (idem Grupo I, pero con un intervalo de 48 horas entre ambas irradiaciones); Grupo III: (BPA + GB-10)-BNCT (animales con tumor tratados por una única aplicación de BNCT mediado por la combinación simultánea de BPA y GB-10); Grupo IV: Sec-24hs-HS (animales con tumor irradiados con Haz Sólo con un intervalo de 24 horas); Grupo V: Sec-48hs-HS (idem Grupo IV, con un intervalo 48 horas entre irradiaciones); Grupo VI: HS (animales con tumor irradiados con una única aplicación de Haz Sólo). En la figura 14 se muestra un esquema de los tres protocolos de BNCT y de los tres protocolos de Haz Sólo estudiados en este capítulo.

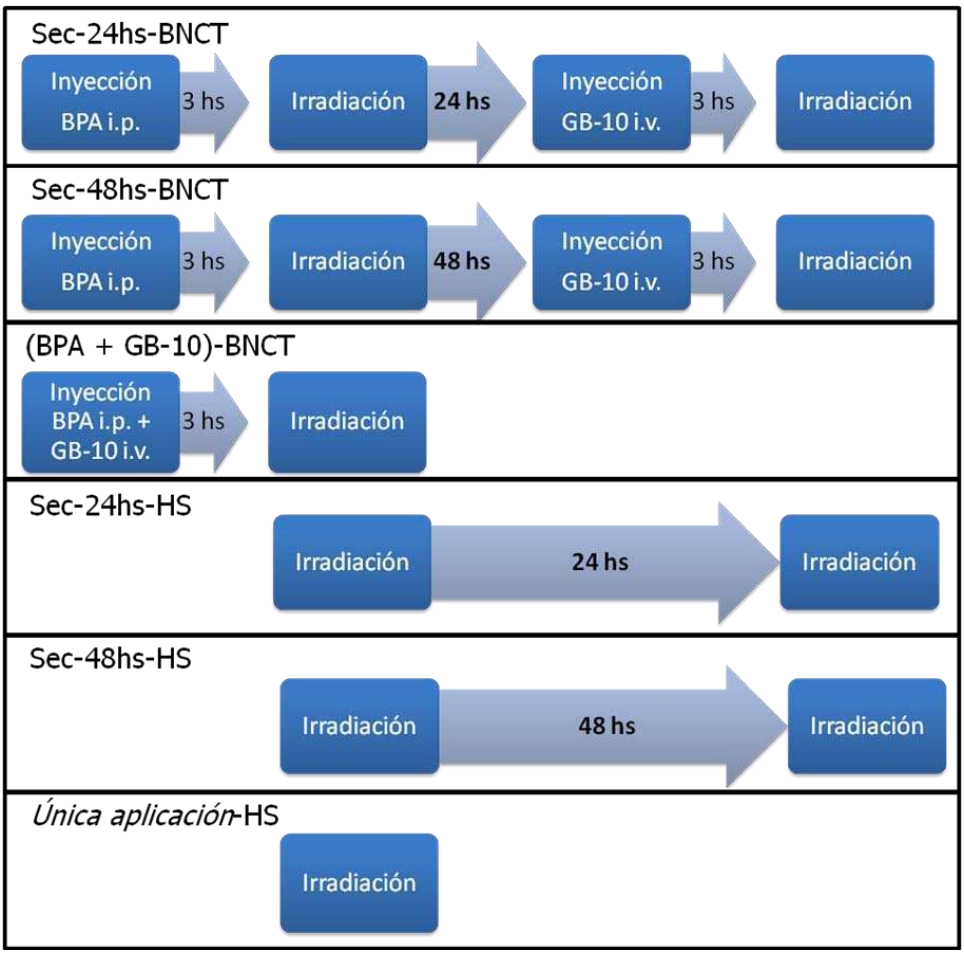


Figura 14 – Esquema de los 3 protocolos de BNCT y de los 3 protocolos de Haz Sólo aplicados en este capítulo.

En la tabla 1 se muestran las concentraciones de boro, medidas por ICP-OES, en los tejidos relevantes para este estudio (tumor, tejido premaligno, bolsa normal y sangre). Los valores de boro en tumor caen dentro del rango terapéuticamente útil, y las relaciones tumor:sangre fueron de 3:1 para BPA y 1:1 para GB-10. Estas determinaciones no formaron parte de esta tesis, sino que se utilizaron los valores ya publicados por nuestro grupo de trabajo con anterioridad (Heber EM et al., 2004; Pozzi ECC et al., 2009). Sin embargo, dentro del marco de esta tesis, se realizaron estudios para evaluar la potencial influencia del BPA-BNCT sobre la captación del GB-10 luego de 24 ó 48 hs. Los tres métodos utilizados (ICP-OES, ICP-MS y autorradiografía neutrónica) arrojaron resultados consistentes y no revelaron cambios terapéuticamente relevantes en la captación de GB-10 en

animales previamente tratados con BPA-BNCT. El análisis autorradiográfico se desarrollará en el capítulo 4 en profundidad.

	BPA*	GB-10†	BPA * + GB-10 †
Tumor	33 ± 17	32 ± 21	43 ± 9
Tejido premaligno	20 ± 6	34 ± 17	50 ± 10
Bolsa normal	14 ± 5	22 ± 7	42 ± 7
Sangre	12 ± 4	32 ± 6	41 ± 11

Tabla 1 - Concentración de boro (media ± DE) (ppm) determinada por ICP-OES para los diferentes protocolos de administración utilizados en este capítulo.
* 3 hs post 15,5 mg ^{10}B /kg peso corporal en bolo i.p.; † 3 hs post 50 mg ^{10}B /kg peso corporal en bolo i.v..

La tabla 2 presenta las dosis absorbidas prescriptas para las diferentes componentes de radiación y los correspondientes tiempos de irradiación para los diferentes protocolos de tratamiento; y en la tabla 3 se muestran las correspondientes dosis absorbidas totales prescriptas. Las dosis para BPA-BNCT y GB-10-BNCT se presentan separadamente, pero cuando se suman dan por resultado la dosis absorbida total prescripta para BNCT secuencial (10 Gy). La dosis a tumor para BNCT secuencial fue igual a la dosis absorbida total a tumor prescripta para (BPA + GB-10)-BNCT. Todos los grupos de animales tratados con Haz Sólo se emplearon para evaluar el efecto de la dosis de fondo (rayos gamma y protones inducidos por la reacción de captura en ^{14}N), y fueron igualados por fluencia de neutrones con los correspondientes tratamientos de BNCT. La dosis total de Haz Sólo a tumor fue de 1,62 Gy para los protocolos secuenciales y de 1,28 Gy para el de única aplicación.

	Rayos Gamma	Boro* (tumor)	Boro* (tejido normal)	Protones Inducidos
BNCT mediado por BPA*				
(Tiempo de irradiación: 3,13 min)				
Bolsa	0,35 ± 0,04	0,099 ± 0,009	0,099 ± 0,009	0,28 ± 0,02
Cuerpo	0,35 ± 0,04		0,004 ± 0,000	0,01 ± 0,00
BNCT mediado por GB-10†				
(Tiempo de irradiación: 4,96 min)				
Bolsa	0,55 ± 0,07	0,157 ± 0,013	0,157 ± 0,013	0,44 ± 0,04
Cuerpo	0,55 ± 0,07		0,006 ± 0,001	0,02 ± 0,00
BNCT mediado por BPA * + GB-10 †				
(Tiempo de irradiación: 6,42 min)				
Bolsa	0,71 ± 0,08	0,203 ± 0,017	0,203 ± 0,017	0,57 ± 0,05
Cuerpo	0,71 ± 0,08		0,008 ± 0,001	0,02 ± 0,00

Tabla 2 - Dosis absorbidas prescriptas (Gy) para los diferentes protocolos experimentales. * 3 hs post 15,5 mg ^{10}B /kg peso corporal en bolo i.p.; † 3 hs post 50 mg ^{10}B /kg peso corporal en bolo i.v..
* Las componentes de boro se indican por ppm de boro.

	BPA-BNCT	GB-10-BNCT	(GB-10 + BPA)-BNCT
Tumor	3,92 ± 1,75	6,00 ± 3,39	9,93 ± 1,91
Tejido premaligno	2,57 ± 0,60	6,37 ± 2,69	11,30 ± 2,14
Bolsa normal	2,05 ± 0,50	4,38 ± 1,14	9,76 ± 1,58
Cuerpo	0,41 ± 0,05	0,73 ± 0,14	1,03 ± 0,17

Tabla3 - Dosis absorbida total prescripta (Gy). Para los protocolos de Sec-BNCT la dosis absorbida total resulta ser la suma de BPA-BNCT y GB-10-BNCT.

La respuesta tumoral correspondiente a todos los protocolos de BNCT, a los 28 días después del tratamiento, se presenta en la tabla 4 y figura 15. Como se detalla en Materiales y Métodos (sección 8), para categorizar los tumores por tamaño, se dividieron arbitrariamente en tres grupos: chicos (<10 mm^3), medianos (10-100 mm^3), y grandes (>100 mm^3). Esta clasificación se estableció al momento de la irradiación y se evaluó la respuesta en base a su variación al final del tratamiento. Los protocolos Sec-24hs-BNCT y Sec-48hs-BNCT indujeron una respuesta tumoral total (RTT) similar y sin diferencias significativas, mientras que la RTT después de una única aplicación de (BPA+GB-10)-BNCT fue significativamente menor que para ambos protocolos secuenciales.

Tumores	n	RC (% ± EE)	RP (% ± EE)	$RP_{0,5}$ (% ± EE)	Pr (% ± EE)	RTT (% ± EE)
Sec-24hs-BNCT						
Total	128	76 ± 4	19 ± 3	18 ± 3	5 ± 2	95 ± 2
Grandes > 100 mm^3	11	9 ± 9	82 ± 12	73 ± 13	9 ± 9	91 ± 9
Medianos 10-100 mm^3	27	70 ± 9	26 ± 8	26 ± 8	4 ± 4	96 ± 4
Chicos < 10 mm^3	90	87 ± 4	9 ± 3	9 ± 3	4 ± 2	96 ± 2
Sec-48hs-BNCT						
Total	92	68 ± 5	23 ± 5	20 ± 4	9 ± 3	91 ± 3
Grandes > 100 mm^3	8	25 ± 15	63 ± 17	63 ± 17	13 ± 11	88 ± 11
Medianos 10-100 mm^3	21	52 ± 11	43 ± 11	33 ± 10	5 ± 5	95 ± 5
Chicos < 10 mm^3	63	79 ± 5	11 ± 4	10 ± 4	10 ± 4	90 ± 4
(BPA + GB-10)- BNCT						
Total	76	50 ± 6	25 ± 4	17 ± 4	25 ± 5	75 ± 5
Grandes > 100 mm^3	7	43 ± 19	43 ± 19	43 ± 19	14 ± 13	86 ± 13
Medianos 10-100 mm^3	13	39 ± 14	38 ± 10	15 ± 10	23 ± 12	77 ± 12
Chicos < 10 mm^3	56	53 ± 7	20 ± 5	14 ± 5	27 ± 6	73 ± 6

Tabla 4 – Respuesta tumoral para los protocolos de BNCT (%± EE).
RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. $RP_{0,5}$: respuesta parcial a menos del 50% del volumen inicial. Pr: Progresión tumoral. RTT: Respuesta tumoral total (RC+ RP).

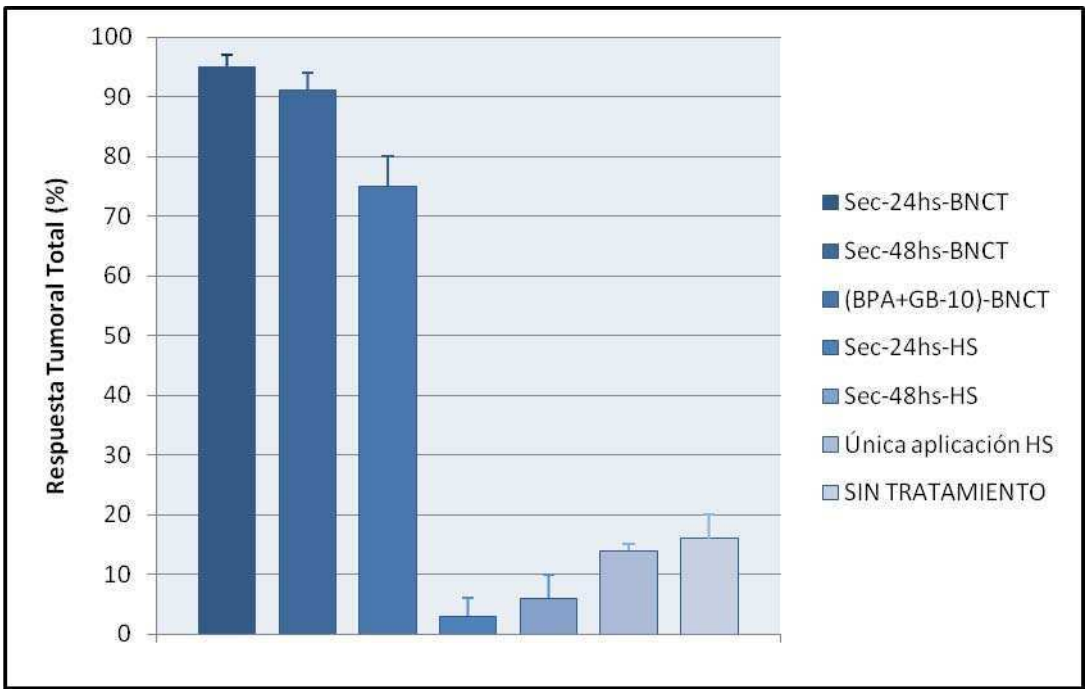


Figura 15 – Porcentajes de respuesta tumoral total (RTT) para todos los protocolos analizados (%± EE).

Como grupo control, se evaluó el crecimiento tumoral y el peso corporal de un grupo de animales sin ningún tipo de tratamiento terapéutico. A este grupo de animales se lo utilizó para estudiar la evolución natural de la enfermedad durante un período de 28 días. La evaluación se realizó del mismo modo que para los animales tratados (ver materiales y métodos). Si bien en este caso aplicaremos el término "respuesta tumoral", lo haremos con fines comparativos, ya que estrictamente será el desarrollo del tumor sin tratamiento. Los resultados de la respuesta tumoral se muestran en la tabla 5 y figura 15. En este grupo se encontraron algunos casos de reducción de volumen tumoral espontáneo (respuesta parcial).

Tumores	**n**	**RC (% ± EE)**	**RP (% ± EE)**	**$RP_{0,5}$ (% ± EE)**	**Pr (% ± EE)**	**RTT (% ± EE)**
SIN TRATAMIENTO						
Total	77	0 ± 0	16 ± 4	8 ± 3	84 ± 4	16 ± 4
Grandes > 100 mm^3	5	0 ± 0	20 ± 18	20 ± 18	80 ± 18	20 ± 18
Medianos 10-100 mm^3	21	0 ± 0	33 ± 10	14 ± 8	67 ± 10	33 ± 10
Chicos < 10 mm^3	51	0 ± 0	8 ± 4	4 ± 3	92 ± 4	8 ± 4

Tabla 5 - Respuesta tumoral para los animales cancerizados sin tratamiento (% ± EE). RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. $RP_{0,5}$: respuesta parcial a menos del 50% del volumen inicial. Pr: Progresión tumoral. RTT: Respuesta tumoral total (RC+RP).

Para ambos protocolos de BNCT secuencial, la incidencia de respuesta completa (RC) fue significativamente mayor para los tumores chicos que para los medianos y grandes (p=0,0001 para Sec-24hs-BNCT y p=0,0015 para Sec-48hs-BNCT). Estos resultados se resumen en la figura 16. En el caso de la única aplicación de BNCT, la diferencia en la RC de los tumores chicos, medianos y grandes no fue estadísticamente significativa. La RC de los tumores grandes fue mayor para la única aplicación de BNCT que para los protocolos de BNCT secuencial (24 y 48 hs). Sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa en ninguno de los dos casos (Figura 16).

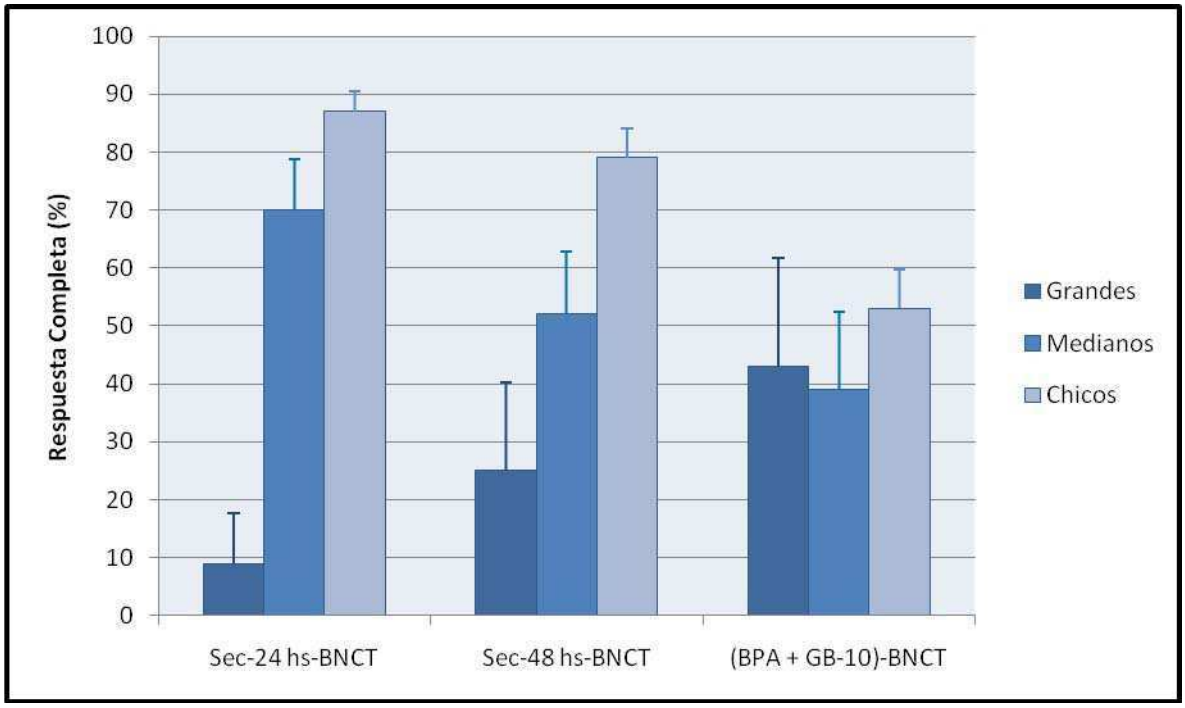


Figura 16 – Respuesta completa (RC) de los tumores grandes (> 100 mm^3), medianos (10-100 mm^3) y chicos (< 10 mm^3) para los 3 protocolos de BNCT analizados (%± EE).

Los protocolos de Haz Sólo secuenciales no produjeron respuestas completas (Tabla 6). Por su parte, las respuestas parciales de Sec-24hs-HS y Sec-48hs-HS fueron similares entre sí. La respuesta tumoral total no mostró diferencias significativas entre los protocolos secuenciales de Haz Sólo. El protocolo de única aplicación de HS indujo una RTT ligeramente mayor (pero no estadísticamente significativa), y no produjo respuestas completas (Tabla 6).

Un análisis por microscopía óptica de la histología de los pocos tumores que quedaron presentes 28 días después de los tratamientos de BNCT secuencial y de los tumores presentes luego de la única aplicación de (BPA + GB-10)-BNCT, reveló diferencias consistentes. Debe recordarse que sólo los tumores que respondieron pobremente al tratamiento estuvieron disponibles para la evaluación histológica a los 28 días de realizado el tratamiento. Los tumores que persistieron luego de Sec-BNCT fueron predominantemente menos infiltrantes y más diferenciados que los tumores que permanecieron luego de 28 días después de una única aplicación de BNCT. Además, exhibieron menos atipia, mayor proporción de estroma, mostraron mayores áreas de fibrosis intercaladas entre áreas de células tumorales viables, y fueron globalmente menos agresivos (Figura 17).

Tumores	n	RC (% ± EE)	RP (% ± EE)	$RP_{0,5}$ (% ± EE)	Pr (% ± EE)	RTT (% ± EE)
Sec-24hs-HS						
Total	34	0 ± 0	3 ± 3	0 ± 0	97 ± 3	3 ± 3
Grandes > 100 mm^3	2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 21	0 ± 0
Medianos 10-100 mm^3	7	0 ± 0	14 ± 13	0 ± 0	86 ± 13	14 ± 13
Chicos < 10 mm^3	25	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 6	0 ± 0
Sec-48hs-HS						
Total	31	0 ± 0	6 ± 4	6 ± 4	94 ± 4	6 ± 4
Grandes > 100 mm^3	1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 30	0 ± 0
Medianos 10-100 mm^3	4	0 ± 0	25 ± 22	25 ± 22	75 ± 22	25 ± 22
Chicos < 10 mm^3	26	0 ± 0	4 ± 4	4 ± 4	96 ± 4	4 ± 4
***Única aplicación*-HS**						
Total	35	0 ± 0	14 ± 6	11 ± 5	86 ± 6	14 ± 6
Grandes > 100 mm^3	1	0 ± 0	100 ± 30	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 30
Medianos 10-100 mm^3	10	0 ± 0	30 ± 14	30 ± 14	70 ± 14	30 ± 14
Chicos < 10 mm^3	24	0 ± 0	4 ± 10	4 ± 10	96 ± 10	4 ± 10

Tabla 6 – Respuesta tumoral para los protocolos de Haz Sólo (%±EE).
RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. $RP_{0,5}$: respuesta parcial a menos del 50% del volumen inicial. Pr: Progresión tumoral. RTT: Respuesta tumoral total (RC+RP).

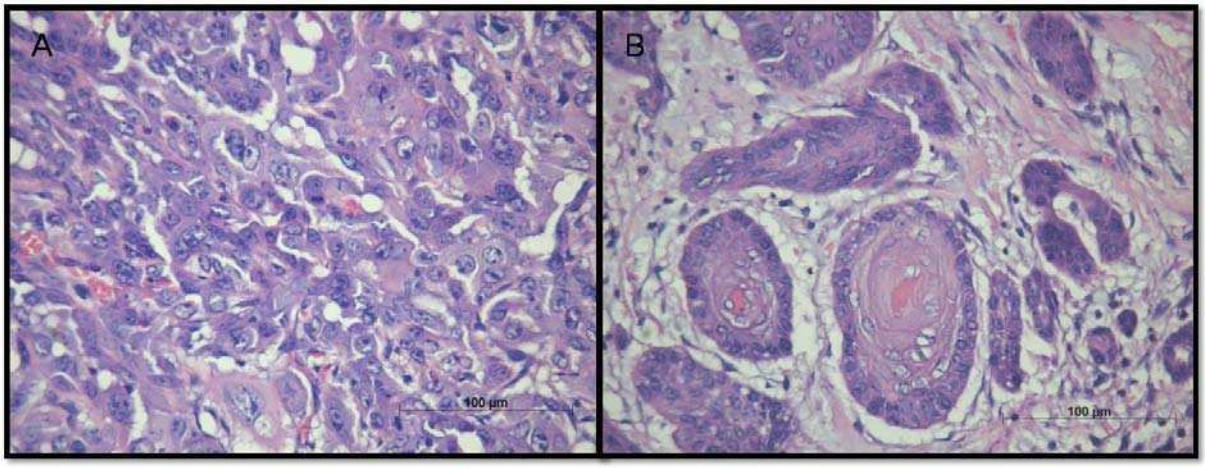


Figura 17 – Imágenes de microscopía óptica (40x), coloreadas con hematoxilina y eosina, características de carcinomas que persistieron 28 días después del tratamiento. A) Única aplicación de (BPA + GB-10)-BNCT. El tumor es muy agresivo e indiferenciado, y exhibe cordones infiltrantes, múltiples características de atipia y estroma escaso. B) BNCT secuencial (Sec-24hs-BNCT). El tumor es diferenciado y exhibe pocos cordones con abundante estroma.

También se realizó una estimación subjetiva y semi-cuantitativa del número de tumores que se ajustan a la descripción de "más diferenciados" para cada protocolo de BNCT y arrojó las siguientes relaciones: 68% para Sec-24hs-BNCT, 83% para Sec-48hs-BNCT, 74% tomando los dos protocolos de BNCT secuencial juntos, y 40% para la única aplicación de BNCT. Debido al pequeño número de tumores analizados histológicamente (n=5) para el protocolo de (BPA + GB-10)-BNCT, estos hallazgos son descriptos sólo como una tendencia.

Los protocolos Sec-BNCT y (BPA + GB-10)-BNCT inducen mucositis reversible en el tejido premaligno limitante de dosis alrededor de los tumores tratados. El mayor pico de mucositis se encontró a los 14 días después del tratamiento y se resolvió entre los 21 y 28 días post-tratamiento. No sólo la inspección ocular, sino el análisis histológico del tejido premaligno 28 días después de los tratamientos también indicó que la mucositis fue resuelta para ese tiempo. La mucositis alrededor de los tumores alcanzó grado 3 ó 4 en 47±12% de los animales tratados con los dos protocolos de BNCT secuencial (entre los cuales no se observaron diferencias significativas) y en 60±22% de los animales tratados con una única aplicación de BNCT (Figura 18). Si bien estas diferencias de mucositis en el tejido premaligno entre Sec-BNCT y (BPA + GB-10)-BNCT no fueron estadísticamente significativas, se vio que los protocolos de Sec-BNCT no exacerban la toxicidad observada con una única aplicación. Ninguno de los protocolos de haz solo causó mucositis mayor que grado 2.

En la figura 19 se muestran, a modo de ejemplo, dos bolsas cancerizadas antes del tratamiento con BNCT secuencial, y al finalizar el mismo. Además de la remisión completa de algunos tumores iniciales, puede observarse que la mucositis alcanzada principalmente a los 14 días después del tratamiento revirtió completamente.

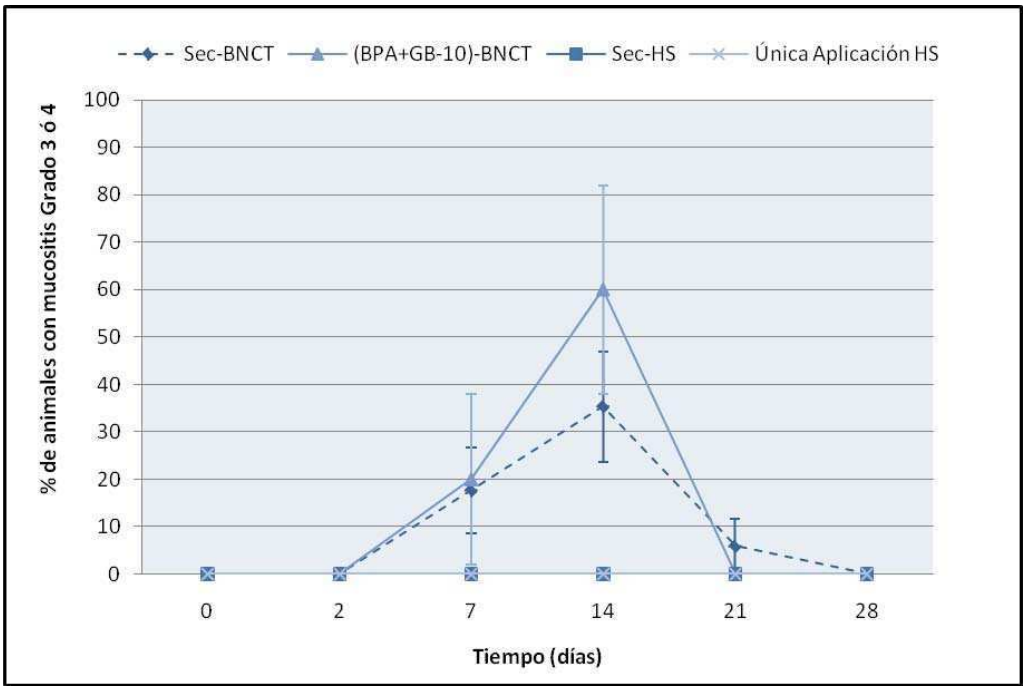


Figura 18 - Gráfico de porcentaje (%±EE) de animales que alcanzaron grado 3 ó 4 de mucositis para los protocolos de BNCT secuencial (Sec-24hs-BNCT y Sec-48hs-BNCT juntos), única aplicación de BNCT, Haz Sólo secuencial (Sec-24hs-HS y Sec-48hs-HS juntos) y única aplicación de Haz Sólo en función del tiempo.

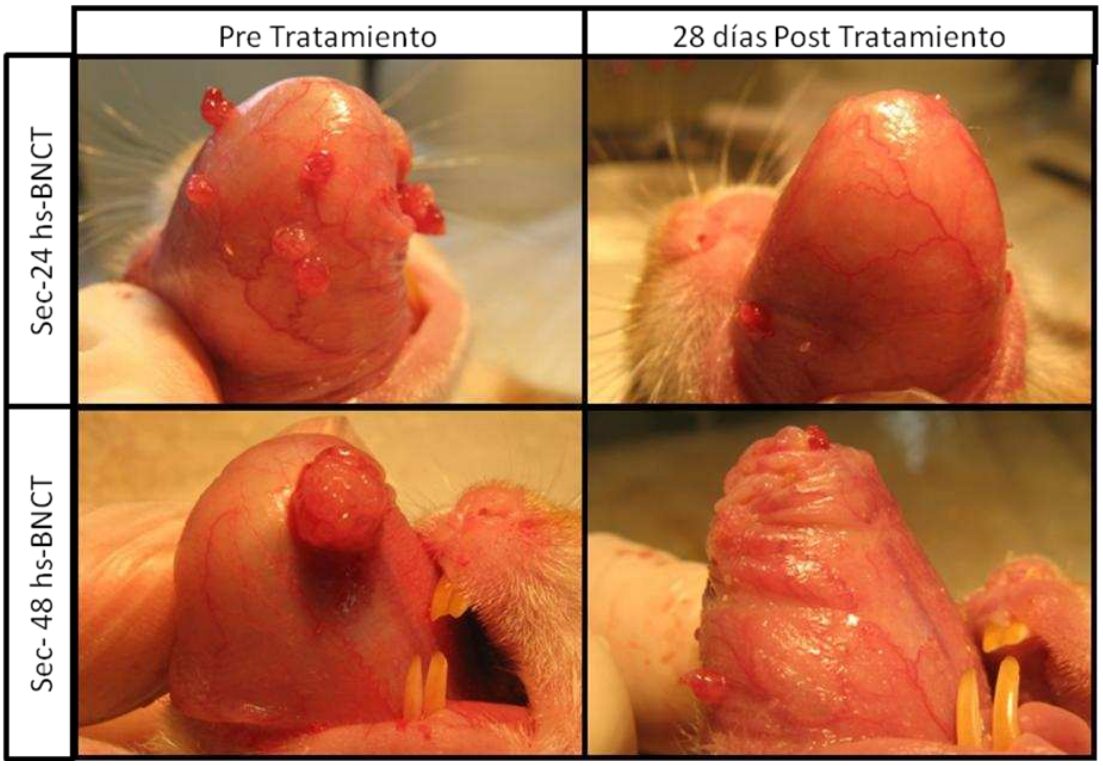


Figura 19 – Ejemplos de bolsas cancerizadas, con tumor, y tratadas con Sec-24hs-BNCT y Sec-48hs-BNCT; antes de comenzar el tratamiento y al finalizarlo.

En las bolsas normales (sin cancerizar), expuestas a cualquiera de los tratamientos, no se observaron efectos macroscópicos sobre la mucosa 28 días después, ni hasta 6 meses luego de haber finalizado el tratamiento (Figura 20). Tampoco se observaron signos de toxicidad a nivel macroscópico o microscópico en las bolsas normales contralaterales blindadas durante la irradiación para cualquiera de los protocolos utilizados.

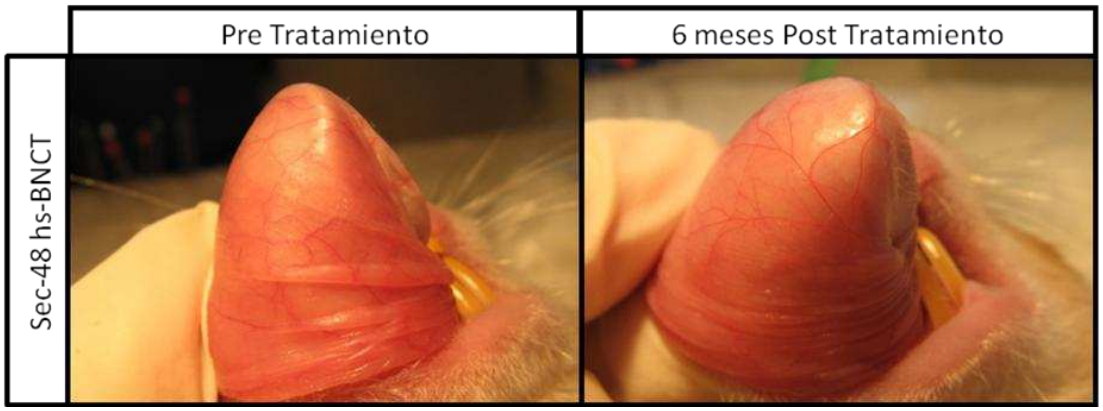


Figura 20 – Ejemplo de una bolsa normal (sin cancerizar) antes y 6 meses después de realizar el tratamiento con BNCT secuencial**.**

En todos los casos se realizó un seguimiento clínico del estado general de salud de los animales tratados (con BNCT ó Ház Sólo). No se observaron signos de caída de pelo, ni trastornos digestivos. El peso corporal de los hámsteres osciló levemente durante el período posterior al tratamiento, con variaciones (de ganancia o pérdida) en promedio de un 10% del peso inicial (Figura 21).

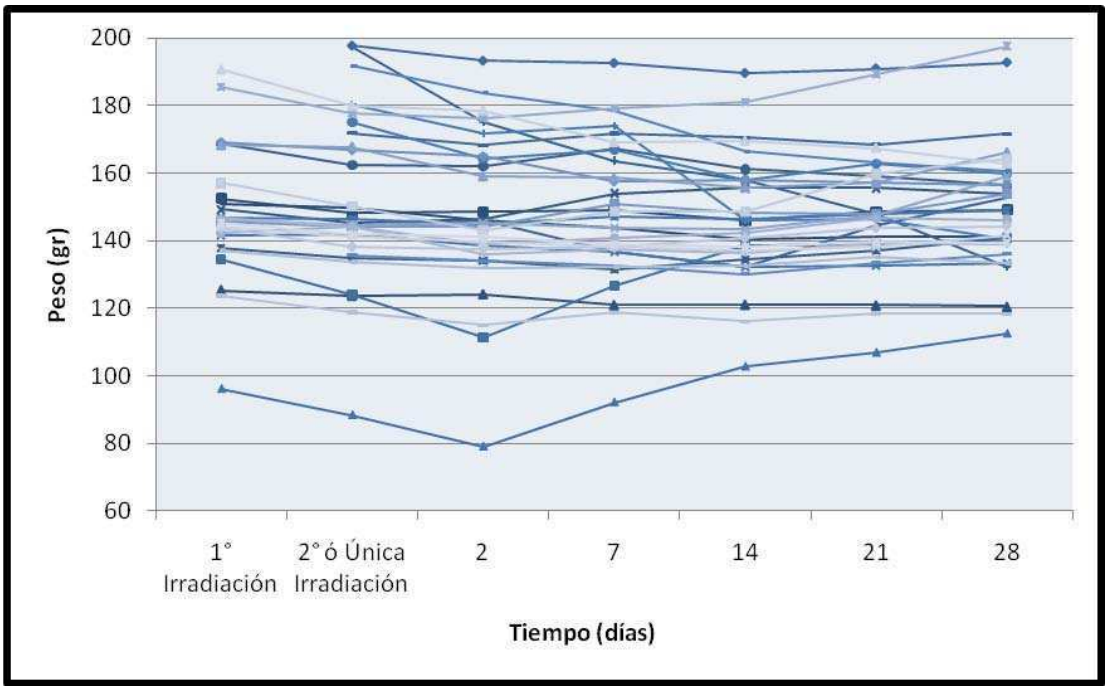


Figura 21 – Curvas de peso de cada uno de los hámsteres tratados con BNCT y Haz Sólo en función del tiempo.

3. Discusión

Habiendo demostrado la eficacia terapéutica de BPA-BNCT, GB-10-BNCT y (BPA + GB-10)-BNCT en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster sin toxicidad en tejido normal, pero con mucositis potencialmente limitante de dosis en el tejido premaligno (Kreimann EL et al., 2001b; Trivillin VA et al., 2006; Pozzi ECC et al., 2009), ideamos el BNCT secuencial como un nuevo enfoque del BNCT, a fin de optimizar la respuesta tumoral sin exceder la tolerancia del tejido premaligno. Se ha considerado que el tejido precanceroso tolera el tratamiento si la mucositis se resuelve dentro de los 28 días de seguimiento. El BNCT secuencial involucra la aplicación de BNCT mediado por BPA seguida de BNCT mediado por GB-10 luego de 24 ó 48 horas. Este estudio demostró, inequívocamente, una ventaja terapéutica de BNCT secuencial sobre una única aplicación de BNCT mediada por la combinación de BPA y GB-10 (con dosis absorbidas totales a tumor igualadas), produciendo un aumento en la respuesta tumoral sin causar mucositis adicional en el tejido limitante de dosis que rodea a los tumores.

Los protocolos secuenciales y la única aplicación de BNCT, en este estudio, fueron igualados en términos de dosis absorbida total prescripta a tumor. Sin embargo, la dosis efectiva podría haber sido diferente, ya que la concentración de boro en tumor es variable y heterogénea. Los protocolos de Sec-BNCT y única aplicación difirieron en la dosis total de rayos gamma (0,90±0,11 Gy y 0,71±0,06 Gy respectivamente) y en la dosis de protones inducidos (0,72±0,08 Gy y 0,57±0,05 Gy respectivamente). Las dosis biológicamente efectivas dependerán de la efectividad biológica relativa (RBE) y la efectividad biológica del compuesto (CBE) (Coderre JA y Morris GM, 1999) para las diferentes componentes de dosis en este modelo, que están siendo actualmente determinadas en nuestro laboratorio.

Ambos protocolos secuenciales de BNCT mostraron una respuesta tumoral total similar de 91-95%, mientras que la RTT inducida por la única aplicación de (BPA + GB-10)-BNCT fue significativamente menor (75%). La tasa de respuesta completa también fue significativamente mayor para los Sec-BNCT que para la única aplicación. Además, todos los protocolos indujeron mucositis reversible en el tejido premaligno, y la incidencia de mucositis grado 3 ó 4 no difirió significativamente. En términos de toxicidad, no hubo potenciación de efectos adversos asociados con el incremento en la respuesta tumoral de los protocolos secuenciales.

La ventaja terapéutica del BNCT secuencial podría ser atribuida a factores tales como los que se describen a continuación. BNCT secuencial involucra el uso de dos agentes borados con diferentes propiedades y mecanismos de acción complementarios, contribuyendo posiblemente a una mayor homogeneidad en la distribución de boro en las diferentes poblaciones celulares del tumor. El pequeño intervalo entre aplicaciones favorecería la captación de GB-10. Es sabido que la presión de fluido intersticial (IFP) es elevada en la mayoría de los tumores (Jain RK, 1987), principalmente como resultado de una angiogénesis desregulada. Los vasos sanguíneos hiper-permeables conducen a un flujo de salida de los fluidos hacia el espacio intersticial del tumor. Como los tumores sólidos generalmente carecen de vasos linfáticos funcionales capaces de mantener la homeostasis, las presiones hidrostática y oncótica se vuelven iguales en el espacio intra y

extravascular, dificultando el transporte de los fluidos. Además, la elevada IFP es parcialmente responsable de la pobre distribución de los agentes terapéuticos transportados por la sangre (Yeo SG et al., 2009; Znati CA et al., 1996). Ha sido reportado que, poco tiempo después de una irradiación, se produce un descenso en la IFP [ej., 1-2 días después de una única dosis o dosis fraccionadas mayores a 10 Gy de fotones (Znati CA et al., 1996)]. Así, una reducción en la IFP incrementa la captación de agentes terapéuticos (e.j., Buchegger F et al., 1995). Además, el espacio vacío generado por la muerte de células tumorales aumenta la entrega intratumoral de agentes terapéuticos (Nagano S et al., 2008). Entonces, el efecto terapéutico de la primera aplicación de BPA-BNCT a una dosis total a tumor de aproximadamente 4 Gy podría reducir considerablemente la IFP, además de inducir la muerte de las células cancerígenas, favoreciendo la penetración y distribución del GB-10. Por eso, el GB-10 tendría una mejor oportunidad de alcanzar el tumor cuando es administrado como parte de un protocolo de Sec-BNCT que cuando es administrado conjuntamente con BPA en el protocolo de única aplicación. Los cambios en el microambiente tumoral luego del primer ciclo de la terapia podrían conducir a cambios en la microdistribución del boro en el segundo ciclo. Los posibles cambios en la distribución espacial no pudieron ser detectados por la medición global de boro mediante ICP-OES o ICP-MS. Para evaluar la existencia de estos cambios, se llevó a cabo un estudio exhaustivo por autorradiografía neutrónica realizado en colaboración con el grupo de imagenología del boro a cargo de las Dras. Saint Martin y Portu de nuestra misma institución. Este tema se desarrollará en profundidad en el capítulo 4.

Para los protocolos de BNCT secuencial, la incidencia de respuesta completa fue mayor para los tumores chicos que para los medianos o grandes. Este hallazgo podría atribuirse a que la IFP aumenta con el tamaño del tumor (Jain RK, 1987), dificultando posiblemente en mayor grado, la distribución de los compuestos borados en los tumores más grandes. Entonces, el beneficio terapéutico del BNCT secuencial sería menos robusto para los tumores de mayor tamaño que para los pequeños. Asimismo, si bien se determinó una mayor respuesta completa de los tumores grandes para la única aplicación de BNCT, esta diferencia no fue

estadísticamente significativa. Es importante tener en cuenta que el número de tumores grandes (>100 mm^3) al inicio del tratamiento suele ser muy bajo.

Por otra parte, la prolongación del tratamiento a lo largo del tiempo reduce la toxicidad en el tejido normal cuando se utiliza radioterapia convencional, pero reduce la probabilidad de control tumoral (Dörr W et al., 2005). En el caso del BNCT, donde la dosis de irradiación está compuesta por una combinación de componentes de alto y bajo-LET, el intervalo corto (1 o 2 días) entre tratamientos produciría una pequeña variación en la reparación del daño subletal. Sin embargo, este intervalo, que es suficientemente corto para no permitir una repoblación celular (Hopewell JW et al., 2003), podría favorecer la llegada del compuesto a las células tumorales que fueron refractarias a la primera aplicación. Si bien el intervalo de 24 hs parece ser ligeramente más efectivo que el de 48 hs en cuanto a respuesta tumoral, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

La aplicación secuencial de BPA-BNCT seguida de GB-10-BNCT, a diferencia de una única aplicación de (BPA + GB-10)-BNCT, permitiría la modulación de cada aplicación con métodos apropiados diseñados para cada transportador de boro. Una ventaja adicional del BNCT secuencial es que emplea BPA y GB-10, y ambos están aprobados para el uso humano. Además, dada la similitud entre GB-10 y BSH en términos de biodistribución y falta de selectividad por el tumor en tejidos no protegidos por la BHE, y el interés clínico del BSH sólo o combinado con BPA (e.j. Kato I et al., 2009), sería de interés explorar la eficacia terapéutica del BNCT secuencial utilizando BSH en lugar de GB-10.

En el contexto de los ensayos clínicos recientes (en curso) de BNCT para cáncer recurrente de cabeza y cuello que mostraron controles tumorales alentadores pero asociados a mucositis limitante de dosis (Kankaanranta L et al., 2007; Kankaanranta L et al., 2012), la búsqueda de una nueva estrategia para BNCT que incremente el control tumoral sin costos extras en términos de mucositis es particularmente relevante. Podemos concluir basados en las observaciones reportadas aquí que el BNCT secuencial podría ser una modalidad clínica prometedora para cáncer de cabeza y cuello, ya que aumenta la respuesta tumoral sin incrementar la toxicidad en el tejido premaligno limitante de dosis y de este modo se vuelve digno de investigaciones futuras.

CAPÍTULO 2

NORMALIZACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS TUMORALES

1. Introducción

Las células de mamíferos requieren oxígeno y nutrientes para su supervivencia y por eso están localizadas a 200-300 µm de los vasos sanguíneos, límite de difusión del oxígeno. Para que los organismos multicelulares puedan crecer más allá de ese tamaño deben reclutar nuevos vasos sanguíneos por vasculogénesis y angiogénesis (Carmeliet P y Jain RK, 2000). La vasculogénesis es la etapa más temprana del desarrollo vascular e incluye la diferenciación, expansión y fusión de los precursores de las células endoteliales para formar la red vascular inicial. Ese plexo primario que se forma por vasculogénesis es remodelado por un proceso denominado angiogénesis, el cual involucra el brote, ramificación y crecimiento diferencial de los vasos sanguíneos para formar un patrón vascular de apariencia más madura, como el que se encuentra en los organismos adultos (Yancopoulos GD et al., 1998). La angiogénesis, además, involucra el reclutamiento diferencial de las células de soporte asociadas, tales como células de músculo liso y pericitos. La asociación de estas células a los nuevos vasos regula la proliferación de las células endoteliales, la migración, la ramificación vascular, el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular (Carmeliet P, 2003).

El proceso de reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos está regulado por un balance entre moléculas pro- y anti-angiogénicas (Carmeliet P y Jain RK, 2000). Cuando el crecimiento de los vasos sanguíneos está desregulado, tiene un gran impacto en la salud y contribuye a la patogénesis de muchas enfermedades. Existe una larga lista de males que se caracterizan o están causados por una angiogénesis excesiva. Históricamente, los más conocidos son el cáncer, la psoriasis y la artritis, pero existen muchos otros como la obesidad, la ateroesclerosis y el sarcoma de Kaposi en pacientes con VIH, entre otros (Carmeliet P, 2003). Además, el crecimiento insuficiente o la regresión anormal de los vasos no sólo causa isquemia cerebral, sino que también conduce a neurodegeneración, hipertensión, y osteoporosis entre otros desórdenes

(Carmeliet P, 2003). En los tejidos normales, la acción colectiva de las moléculas pro-angiogénicas (por ejemplo el factor de crecimiento vascular endotelial ó VEGF) está contrabalanceada por la acción de factores anti-angiogénicos como la trombospondina-1 (Duda DG et al., 2007). Este balance se inclina a favor de los estimuladores tanto en la angiogénesis fisiológica como en la patológica (Figura 22). Sin embargo, en la patológica el desbalance es persistente (Duda DG et al., 2007). La inducción de la angiogénesis y su consecuente neovascularización preceden la formación del tumor y se correlacionan con la transición de hiperplasia a neoplasia (Folkman J et al., 1989). Está ampliamente aceptado que el "switch angiogénico" está apagado cuando el efecto de las moléculas inductoras de la angiogénesis está balanceado por las inhibidoras, y está encendido cuando el balance total está inclinado a favor de las estimuladoras (Hanahan D y Weinberg RA, 2000).

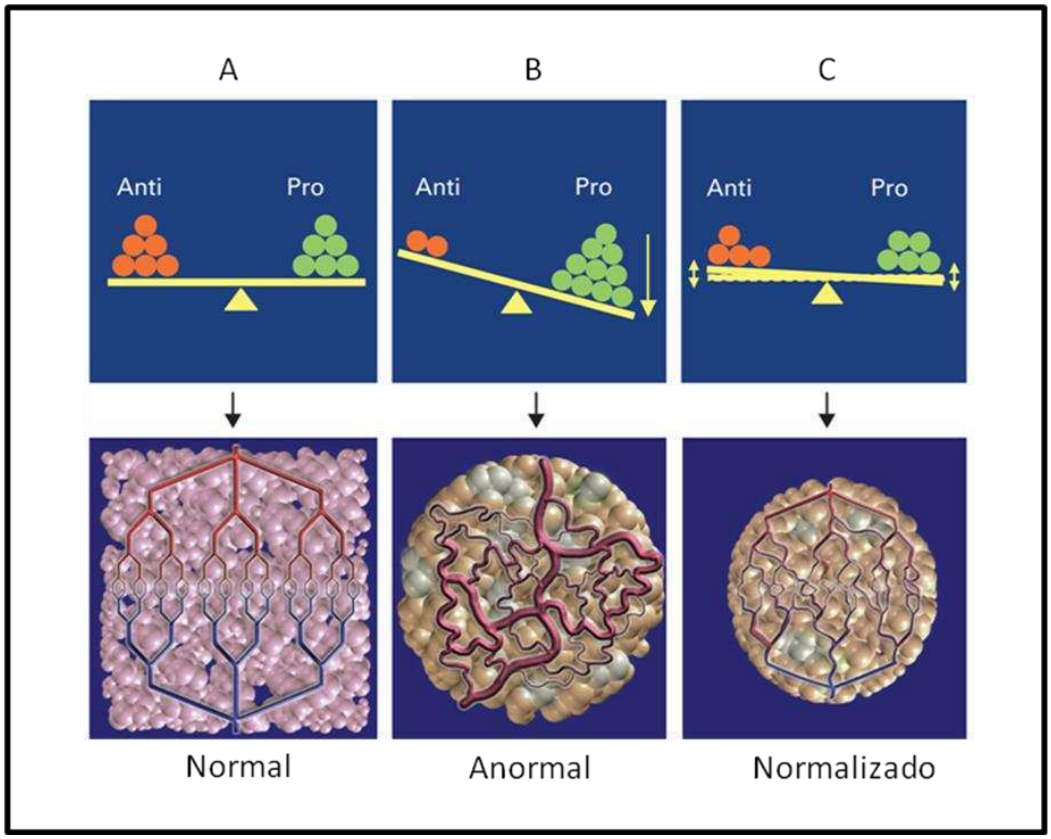


Figura 22 – A) En tejido normal existe un balance entre los factores pro y anti-angiogénicos. B) en tumor predominan las señales pro-angiogénicas conduciendo a una vasculatura anormal; (C) vasos tumorales normalizados (se restablece parcial y transitoriamente el balance de factores pro y anti-angiogénicos).

Se sabe que los tumores no pueden crecer o metastatizar a otro órgano sin el aporte de los vasos sanguíneos, por eso el crecimiento tumoral es imposible sin la proliferación endotelial (una componente clave de la angiogénesis). Existen muchas señales que disparan el "switch angiogénico", entre las que se incluyen el estrés metabólico (por ejemplo baja presión de oxígeno y bajo pH), el estrés mecánico (como la presión generada por las células en proliferación), y las mutaciones genéticas (por ejemplo la activación de oncogenes o deleción de genes supresores de tumores que controlan la producción de reguladores de la angiogénesis) (Carmeliet P y Jain RK, 2000). Un estímulo importante para esa expansión vascular es la hipoxia. Inicialmente, las células son oxigenadas por simple difusión, pero cuando el tejido crece más allá de los límites de la difusión del oxígeno, la hipoxia dispara el crecimiento vascular por medio de la señalización a través de factores de transcripción inducibles por hipoxia (Carmeliet P, 2003). La hipoxia regula positivamente muchos factores de crecimiento angiogénico, entre los que se incluyen el VEGF, la angiopoyetina-2, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, y la interleuquina-8 entre otros (Fukumura D y Jain RK, 2007). El VEGF pareciera ser la molécula pro-angiogénica más crítica en cáncer (Duda DG et al., 2009). El VEGF promueve la sobrevida y proliferación de las células endoteliales e incrementa la permeabilidad vascular.

La vasculatura tumoral no es simplemente una línea proveedora de nutrientes para los tumores, sino que gobierna la fisio-patología de los tumores sólidos, es decir su crecimiento, invasión, metástasis y respuesta a diferentes terapias (Fukumura D y Jain RK, 2007). Además, es ampliamente sabido que los vasos sanguíneos tumorales son heterogéneos con respecto a su organización, función y estructura (Nagy JA et al., 2009). Mientras que la vasculatura normal está dispuesta en una jerarquía de arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas con una arquitectura bien organizada, regulada y funcional, la vasculatura tumoral tiene una distribución muy poco uniforme y caótica (Figura 23, Fukumura D y Jain RK, 2007) (Nagy JA et al., 2009). Los vasos tumorales generalmente exhiben un curso serpenteante, ramificaciones irregulares y forman anastomosis arterio-venosas. El flujo sanguíneo a través de los tumores no sigue un camino constante y unidireccional (Nagy JA et al., 2009). Asimismo, la estructura de las paredes

vasculares también es anormal dentro de los tumores, las células endoteliales tienen morfología aberrante, los pericitos están poco unidos o ausentes, y la membrana basal es inusualmente gruesa en algunas partes y está completamente ausente en otras (Jain RK, 2005).

Todas estas anormalidades contribuyen a un flujo sanguíneo heterogéneo, a una hipertensión intersticial (elevada presión hidrostática fuera de los vasos sanguíneos), hipoxia y acidosis. El suministro de sangre defectuoso y la elevada presión de fluido intersticial dificultan el transporte efectivo de los fluidos y resulta en una distribución pobre de los agentes terapéuticos transportados por torrente sanguíneo (Jain RK, 2005; Duda DG et al., 2007).

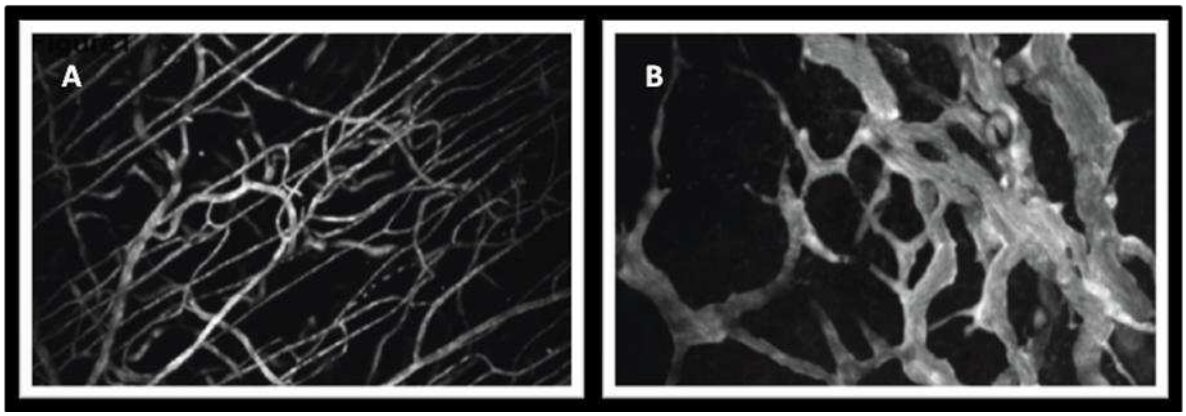


Figura 23 – Microscopía multifotónica. A) Vasculatura normal. B) Vasos tumorales. Fukumura D y Jain RK, 2007.

El campo de la investigación de la angiogénesis se originó en 1971 cuando Judah Folkman publicó la hipótesis que el crecimiento tumoral es dependiente de la angiogénesis (Folkman J, 2006). En ese mismo trabajo enfatizó la posibilidad de descubrir inhibidores de la angiogénesis que pudieran ser empleados como terapia contra el cáncer, y desde ese momento los vasos sanguíneos tumorales se convirtieron en un blanco atractivo como estrategia anti-cancerígena. Desafortunadamente, docenas de ensayos clínicos de fase III que usaban inhibidores no específicos de la angiogénesis fracasaron en mostrar una ventaja en la sobrevida (Duda DG et al., 2009). Sin embargo, la combinación de un anticuerpo anti-VEGF con quimioterapia produjo un incremento en la sobrevida sin

precedentes (5 meses) en pacientes con cáncer de colon (Hurwitz H et al., 2004). Este resultado es paradójico, ya que uno esperaría que al destruir la vasculatura se comprometiera la entrega de oxígeno y drogas al tumor. Rakesh Jain resolvió esa paradoja hipotetizando que la aplicación juiciosa de un agente antiangiogénico puede "normalizar" la vasculatura tumoral anormal, resultando en una entrega de drogas y oxígeno mucho más eficiente a las células del tumor (Jain RK, 2005). El incremento de la penetración de las drogas dentro del tumor aumentarían el éxito de la quimioterapia, y el incremento de los niveles de oxígeno aumentaría el éxito de la radioterapia. Por lo tanto, si se supiera cómo corregir la estructura y función de los vasos tumorales, existiría la posibilidad de normalizar el microambiente tumoral y potenciar la eficacia de los tratamientos contra el cáncer.

Como se expuso anteriormente, una producción excesiva de agentes pro-angiogénicos y/o una disminución en la producción de anti-angiogénicos causa anormalidades en los vasos sanguíneos y en el microambiente tumoral resultando en una entrega insuficiente de drogas y oxígeno, que, a su vez, van en detrimento de la eficacia terapéutica (Figura 22). Pero, si se puede restablecer el balance de los factores pro- y anti-angiogénicos, la vasculatura revertirá a un estado más normal (Figura 22) (Jain RK, 2005). Esta vasculatura normalizada se caracteriza por ser menos fenestrada, menos dilatada, y menos tortuosa, con una membrana basal más normal y mejor cubierta por las células perivasculares. Estos cambios morfológicos son acompañados por cambios funcionales como un descenso en la presión de fluido intersticial, un incremento en la oxigenación del tumor y una mejor penetración de drogas en el tumor (Duda DG et al., 2009).

Las terapias de normalización de los vasos sanguíneos no necesariamente incrementan la cantidad de droga captada por el tumor, sino que distribuyen esas moléculas a una mayor fracción de células tumorales mediante la reparación del mecanismo de entrega de los compuestos (Jain RK, 2005). Sin embargo, si al equilibrio restablecido durante la normalización se lo continúa inclinando hacia el lado de los anti-angiogénicos, será contraproducente ya que se comprometerá la entrega de las drogas y el oxígeno. Esta necesidad de un balance delicado entre la normalización y una regresión excesiva enfatiza el requerimiento de una selección cuidadosa de la droga anti-angiogénica y del protocolo de administración (Jain RK,

2005). Además, el esquema óptimo de normalización combinada con quimioterapia y/o radioterapia también requiere el conocimiento de la ventana de tiempo durante la cual los vasos comienzan a normalizarse, así como también la noción de cuánto tiempo permanecen en ese estado. Estos parámetros de la normalización dependen del tipo de agente utilizado, del tipo de tumor y del sitio de su crecimiento (Fukumura D y Jain RK, 2007).

Existen diferentes tipos de agentes anti-angiogénicos. La mayoría de los estudios que demostraron normalización vascular han utilizado inhibidores farmacológicos directos de la angiogénesis tumoral, como por ejemplo agentes que inhiben moléculas pro-angiogénicas. Casi todos esos estudios emplearon anticuerpos monoclonales dirigidos al camino de señalización de VEGF (Goel S et al., 2011). Entre estos compuestos se encuentran principalmente los anticuerpos anti-VEGF (como el Bevacizumab), los anti-VEGFR y los inhibidores de receptores de tirosina quinasa entre otros. Además, otros agentes farmacológicos pueden afectar indirectamente la vasculatura tumoral, modificando la producción de factores pro-angiogénicos secretados por células tumorales. Estos compuestos son denominados "accidentales" o "indirectos" porque no fueron desarrollados específicamente como anti-angiogénicos. En muchos casos, estos agentes están dirigidos hacia los oncogenes que se encuentran río arriba de la producción de factores angiogénicos, como por ejemplo Trastuzumab que tiene como blanco a HER2. Otras drogas incluyen a las utilizadas en terapias endócrinas contra tumores dependientes de hormonas, bajas dosis de quimioterapéuticos que apuntan a destruir la vasculatura más que a matar las células tumorales, y muchos otros agentes que tienen mecanismos de acción desconocidos (Goel S et al., 2011). Dentro del grupo de agentes indirectos se destacan el dexrazoxane, la metil-selenocisteina y la talidomida. La talidomida puede reducir la densidad de los vasos tumorales y la presión de fluido intersticial, mientras que mejora la perfusión y la oxigenación en modelos pre-clínicos (Goel S et al., 2011). La ventana de mejoramiento de la oxigenación típicamente dura desde el día 2 al 4 del tratamiento, y se observa un efecto sinérgico sobre el encogimiento del tumor si la terapia con talidomida precede a la radioterapia o quimioterapia por 48 horas (Ansiaux R et al., 2005; Segers J et al., 2006). Si bien todos los anti-angiogénicos

indirectos que inducen la normalización vascular provienen exclusivamente de estudios pre-clínicos, la talidomida es actualmente utilizada clínicamente en el tratamiento de mieloma múltiple (Folkman J, 2006; Goel S et al., 2011).

Janice Nagy y colaboradores clasificaron los vasos sanguíneos tumorales en seis tipos diferentes según sus propiedades anatómicas y funcionales (Nagy JA et al., 2009). Entre ellos se encuentran las proliferaciones microvasculares glomeruloides (GMPs) que consisten en pequeños vasos enmarañados inmersos en una compleja mezcla de pericitos ordenados irregularmente y una membrana basal extensa multilaminada (Nagy JA et al., 2009). Los GMPs fueron encontrados en una amplia variedad de tumores humanos, particularmente en glioblastoma multiforme, pero también en cáncer de estómago y mama, donde están asociados a un pronóstico desfavorable (Sungberg C et al., 2001). Los GMPs son hiper-permeables, pero están pobremente perfundidos, y al igual que los vasos madre son susceptibles de ser normalizados (Nagy JA et al., 2009).

A pesar del notable éxito de los protocolos de BNCT empleados anteriormente, y dentro del marco de esta tesis, en estudios experimentales en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster (65 a 95% de control tumoral sin radiotoxicidad en el tejido normal) (Kreimann EL et al., 2001b; Trivillin VA et al., 2006; Pozzi ECC et al., 2009), hay posibilidad de incrementarlo. En particular, un desafío que todavía no está resuelto radica en la captación homogénea del compuesto borado por todas las células tumorales. En este contexto, una mejora en la eficiencia del flujo sanguíneo dentro del tumor contribuiría considerablemente.

El contenido de boro y su distribución dentro del tumor son cruciales para el éxito del BNCT, por eso las áreas tumorales que están pobremente cargadas con boro serán refractarias a la terapia. Consecuentemente, creemos que la normalización reversible de los vasos sanguíneos del tumor antes de la entrega del agente cargado con ^{10}B favorecería la captación homogénea del boro en tumor y la eficacia terapéutica del BNCT. Pero, sabiendo que los anticuerpos monoclonales antiangiogénicos empleados en humanos, ratas y ratones (ej. Goel S et al., 2011) no pueden ser usados en hámster debido a la falta de cruce antigénico, desarrollamos una técnica para normalizar los vasos tumorales aberrantes en el

modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster empleando talidomida como agente antiangiogénico. El haber desarrollado ésta técnica permite estudiar el efecto de la normalización de vasos tumorales aberrantes en el modelo de cáncer bucal en hamster para distintas aplicaciones. Dentro de este capítulo estudiamos el efecto de la normalización de los vasos sanguíneos tumorales sobre la eficacia terapéutica y toxicidad de BNCT mediado por BPA.

2. Resultados

2.1 Estudios de toxicidad

En general, el tratamiento con talidomida ejerce un efecto sedante reversible sobre los animales que fueron anestesiados. Los animales cancerizados fueron más sensibles a este efecto que los hámsteres no cancerizados. Uno de los ocho (13%) animales con tumor tratados con talidomida murió durante el período experimental, mientras que ninguno de los cinco animales no cancerizados tratados con talidomida murió durante el tratamiento. Dos de los nueve animales con tumor (22%) tratados con talidomida y anestesiados murieron durante el período experimental, mientras que ninguno de los cinco animales no cancerizados pero tratados con talidomida y anestesiados murió durante ese período. Otros estudios realizados por nuestro grupo revelaron un porcentaje de muertes (no relacionadas a tratamientos específicos) de aproximadamente un 5% en animales cancerizados y un 7% en hámsteres cancerizados y sometidos a anestesia. En el caso de los animales no cancerizados, solo se observaron muertes ocasionales (entre 1 y 2%), independientemente de la administración de anestesia. A pesar que no se observaron muertes en animales no cancerizados y tratados con talidomida, el tamaño de la muestra es pequeño para poder detectar las muertes ocasionales observadas en estudios previos.

El tratamiento con talidomida induce una pérdida de peso corporal temporario de aproximadamente del 3 al 9% en los primeros 3 días después del tratamiento tanto en los animales cancerizados como en los no cancerizados. Los animales cancerizados tratados con DMSO sólo, mostraron una pérdida similar de

peso entre 3 y 5%. El uso de anestesia aumenta este efecto de pérdida de peso en un 5 a 11%. Estas pérdidas de peso corporal se asemejan a las observadas en estudios previos (3 al 10%) descriptos previamente para animales con tumor y animales no cancerizados, no tratados con talidomida pero sometidos a anestesia.

2.2 Examinación macroscópica y microscópica de la bolsa

Tanto la examinación a ojo desnudo como la examinación microscópica de la bolsa evertida por transparencia revelaron un angostamiento y enderezamiento progresivo de los vasos sanguíneos y una reducción cualitativa de la densidad de los mismos en el tejido con alteraciones potencialmente malignas (PMD) en los animales tratados con talidomida, pareciéndose más a una vasculatura normal (Figuras 24 y 25).

El efecto fue máximo a las 48 horas después de la primera dosis de talidomida y revirtió progresivamente, regresando al fenotipo inicial seis días después de interrumpido el tratamiento. No se observó ningún cambio en la bolsa contralateral (no cancerizada) de los animales tratados con talidomida. El tratamiento con DMSO sólo no induce ningún cambio visible en la vasculatura aberrante de las bolsas cancerizadas.

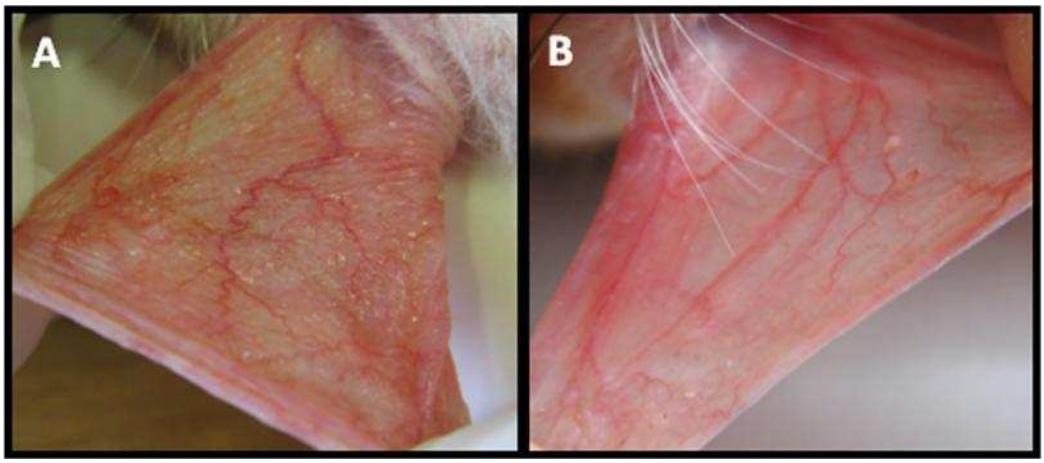


Figura 24 – Vasos sanguíneos *in vivo* por transparencia en el tejido con PMD. A) Antes del tratamiento con talidomida. B) 48 hs después del tratamiento.

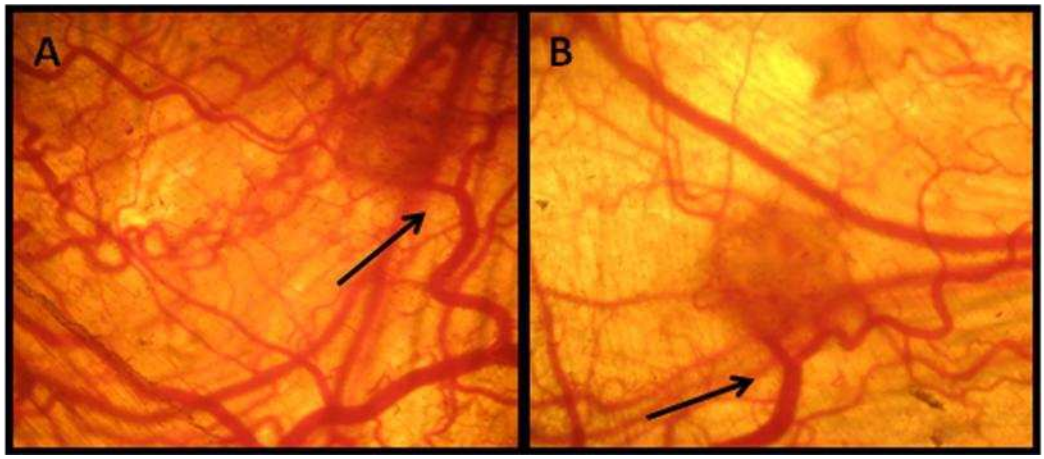


Figura 25 – Vasos sanguíneos *in vivo,* vistos bajo microscopio a 2,5x en el tejido premaligno. A) Antes del tratamiento con talidomida. B) 48 horas después del tratamiento. Las flechas indican la posición del mismo vaso antes y después del tratamiento. La sombra entre los vasos sanguíneos corresponde a un tumor exofítico observable a ojo desnudo.

2.3 Ensayo de permeabilidad vascular

La figura 26 muestra los valores (media± SD) correspondientes al Azul de Evans (EBD) extravasado en tumor, tejido premaligno, bolsa normal, hígado y riñón, en animales tratados con talidomida, animales control (sin tratameinto), y animales tratados con DMSO sólo. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa (p= 0,0008) entre la permeabilidad de los tumores tratados con talidomida (3,7± 2,6 µg EBD/ 100 mg tejido) y los controles (6,7± 1,1 µg EBD/ 100 mg tejido). La reducción en la extravasación de EBD en los tumores tratados con talidomida indicaría una reducción en las fenestraciones, y el establecimiento de un flujo más eficiente favoreciendo la entrega de drogas (Cerniglia GJ et al., 2009). El resto de los tejidos analizados no mostró diferencias significativas en la permeabilidad atribuibles al tratamiento con talidomida. Adicionalmente, para poner a prueba el efecto de la talidomida, se analizó el posible cambio que pudiera generar del DMSO sólo (ya que se utiliza como vehículo de la droga). La permeabilidad del tumor para el grupo tratado con DMSO fue 7,3± 4,1 µg EBD/ 100 mg tejido, similar a la observada en el grupo control (6,7± 1,1 µg EBD/ 100 mg tejido). Esta diferencia no fue estadísticamente significativa (p= 0,63).

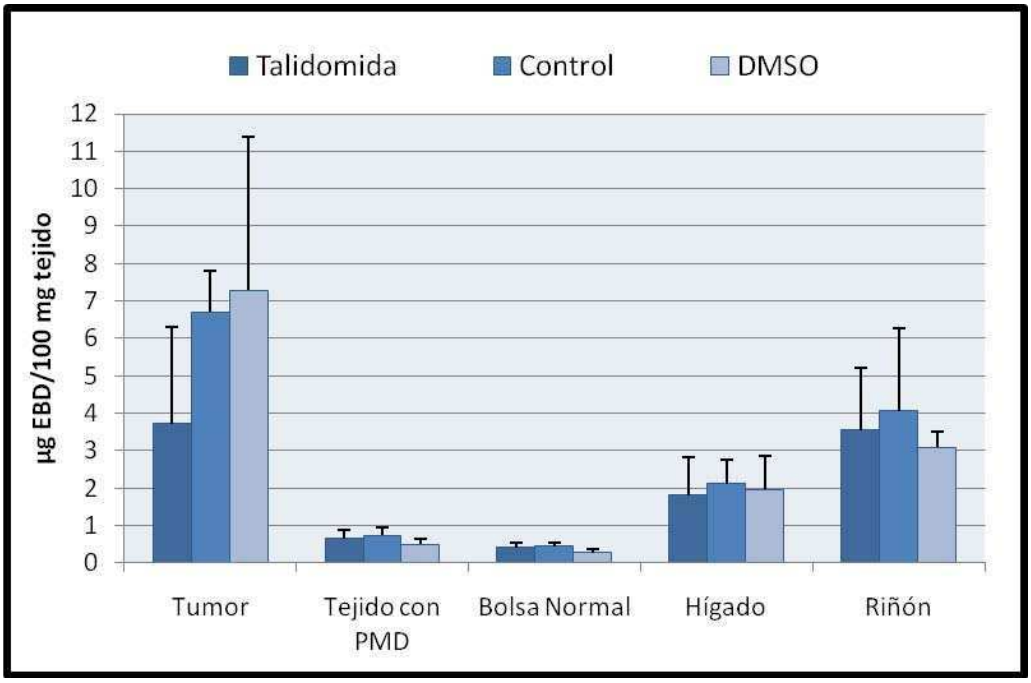


Figura 26 - Azul de Evans (EBD) extravasado en tumor, tejido con PMD, bolsa normal, hígado y riñón en animales tratados con talidomida, animales control y animales tratados con DMSO sólo. Sólo en tumor se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados con talidomida y los animales control.

2.4 Morfología de los vasos sanguíneos

El estudio de la relación de aspecto (RA) de los vasos sanguíneos se realizó comparando los datos obtenidos en este estudio (grupo de animales con tumor tratados con talidomida) con los obtenidos por Aromando y colaboradores en un estudio previo (animales con tumor no tratados con talidomida y animales sin cancerizar) (Aromando RF et al., 2009). La relación de aspecto de los vasos sanguíneos tumorales de los animales no tratados con talidomida fue significativamente mayor ($p<0,001$) que la de los animales tratados con talidomida (Tabla 7). No hubo diferencias significativas en la RA entre los vasos sanguíneos tumorales de animales tratados con talidomida y los de las bolsas normales. Estos hallazgos están ilustrados en la figura 27 y muestran que el tratamiento con talidomida induce una reducción en la compresión de los vasos sanguíneos tumorales, alcanzando valores similares a los de una bolsa normal.

Vasos sanguíneos	Talidomida	n	Media±DE
Tumor	+	115	1,60 ± 0,58
	-	149	2,48 ± 1,35 [a]
Bolsa normal	-	98	1,56 ± 0,47 [a]

Tabla 7 - Relación de aspecto de secciones de vasos sanguíneos en tumor (con y sin tratamiento de talidomida) y bolsa normal. [a] Aromando RF et al., 2009.

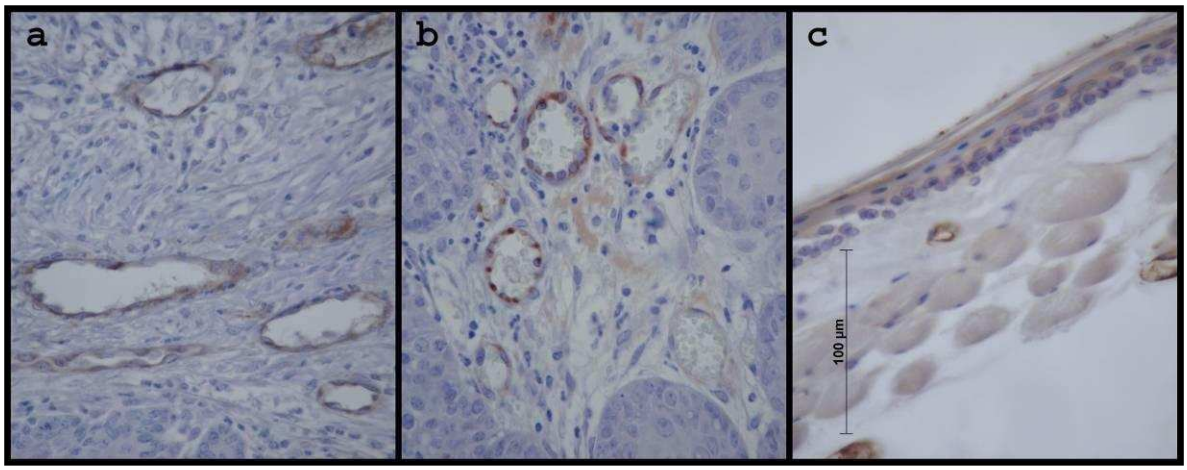


Figura 27- Reacción inmunohistoquimica del Factor VIII para marcación de paredes vasculares. a) tumor de un hámster sin tratamiento. b) tumor de un hámster tratado con talidomida. c) bolsa normal de un hámster sin tratamiento.

En los cortes con reacción inmunohistoquímica de Factor VIII de los tumores no tratados con talidomida, se reportó la presencia de 4±5 GMPs (proliferaciones microvasculares glomeruloideas) por sección de tumor (Aromando RF et al., 2009). Sin embargo, ningún GMP fue observado en las secciones de tumores de animales tratados con talidomida.

2.5 BNCT *in vivo*

Habiendo desarrollado, por primera vez, una técnica de normalización de los vasos sanguíneos en el modelo de cáncer bucal de la mejilla del hámster, la utilizamos para evaluar la eficacia terapéutica y potencial radiotoxicidad del BNCT mediado por BPA luego de la aplicación de la misma. En la figura 28 se resumen los diferentes protocolos aplicados en esta etapa del estudio.

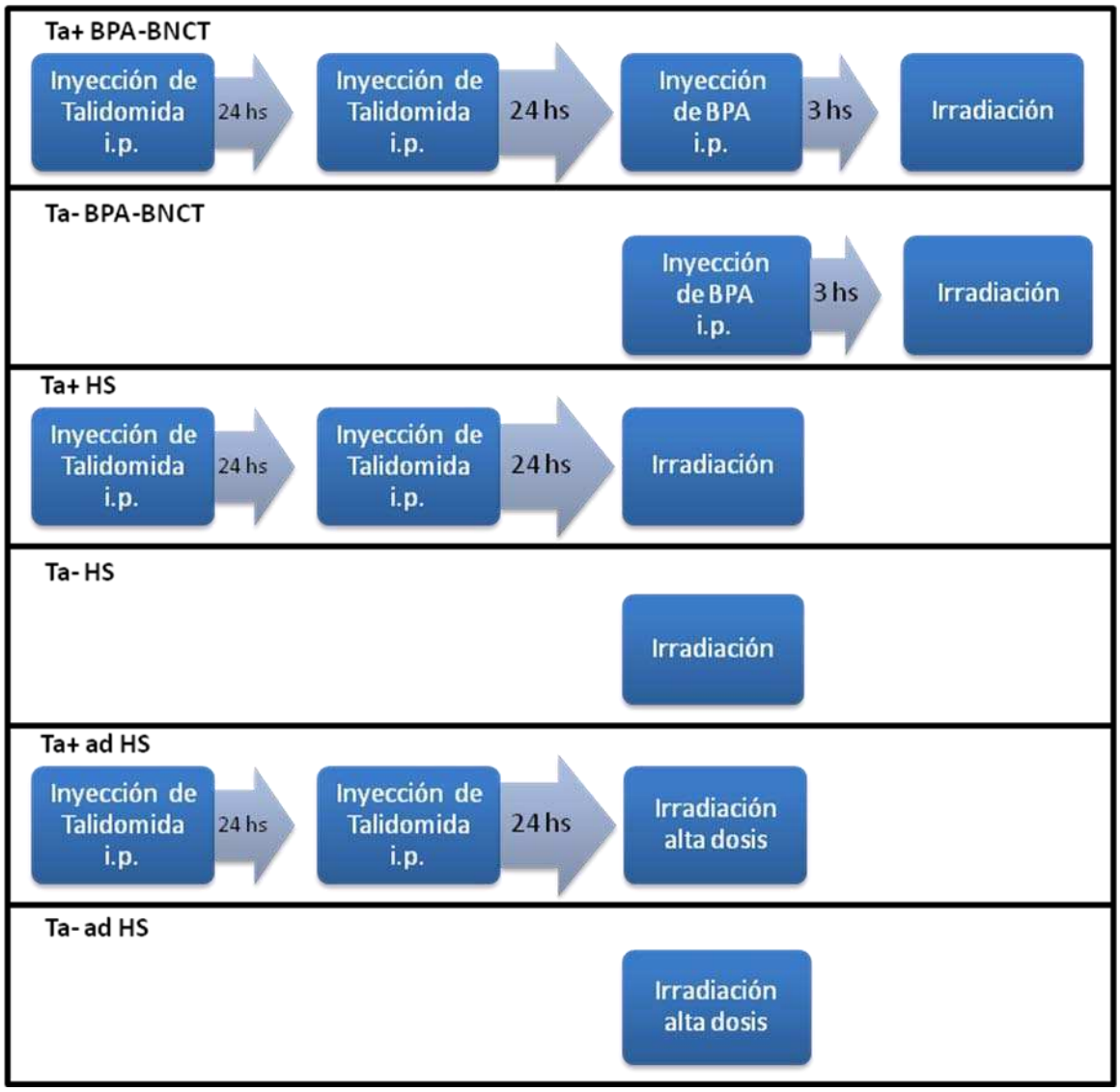


Figura 28 - Esquema de los protocolos utilizados, en este capítulo, para el estudio de BNCT *in vivo*. BPA-BNCT con tratamiento previo de talidomida (Ta+ BPA-BNCT), BPA-BNCT sin tratamiento con talidomida (Ta- BPA-BNCT), tratamientos de Haz Sólo con y sin normalización por talidomida (Ta+ HS y Ta- HS), y tratamientos de Haz Sólo con y sin normalización por talidomida a una dosis mayor (Ta+ adHS y Ta- adHS).

Los valores de concentración de boro, medidos por ICP-MS, están resumidos en la tabla 8. El contenido de boro dentro de los tumores está dentro del rango terapéutico. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de boro en animales tratados con talidomida (Ta+) y los de los animales no tratados con talidomida (Ta-).

	Ta+ n	Ta+ ppm*			Ta- n	Ta- ppm*		
Tumor	7	20	±	8	8	24	±	6
Tejido premaligno	3	14	±	14	4	13	±	2
Bolsa normal	3	15	±	15	4	15	±	1
Hígado	3	7	±	7	4	8	±	1
Sangre	5	5	±	5	4	9	±	1

Tabla 8 – Concentración de boro (media ± DE) determinada por ICP-MS.
*3 h después de la administración de BPA (15,5 mg ^{10}B /kg de peso corporal, en bolo i.p.) en animales tratados con talidomida previamente (Ta+) o en animales sin tratamiento previo (Ta-).

La tabla 9 presenta las dosis absorbidas prescriptas para las diferentes componentes, los correspondientes tiempos de irradiación y la fluencia de neutrones. Además, se puede observar la dosis total absorbida prescripta para los diferentes protocolos.

Protocolo	Tejido	Tiempo [min]	Fluencia [n cm^{-2}]	Gamma [Gy]	Protones (N^{14}) [Gy]	Dosis Boro [Gy]	Dosis Total [Gy]
Ta+ BPA-BNCT	Tumor	4,1 ± 0,2	(1,9 ± 0,4) E+12	0,49 ± 0,01	0,40 ± 0,09	3 ± 1	4 ± 1
	Premaligno	4,1 ± 0,2	(1,9 ± 0,4) E+12	0,49 ± 0,01	0,40 ± 0,09	2,0 ± 0,5	2,9 ± 0,5
	Bolsa normal	4,1 ± 0,2	(1,9 ± 0,4) E+12	0,49 ± 0,01	0,40 ± 0,09	2,1 ± 0,6	3,0 ± 0,6
Ta- BPA-BNCT	Tumor	4,2 ± 0,3	(1,9 ± 0,4) E+12	0,49 ± 0,01	0,40 ± 0,09	3,4 ± 0,9	4,3 ± 0,9
	Premaligno	4,2 ± 0,3	(1,9 ± 0,4) E+12	0,49 ± 0,01	0,40 ± 0,09	1,8 ± 0,3	2,7 ± 0,3
	Bolsa normal	4,2 ± 0,3	(1,9 ± 0,4) E+12	0,49 ± 0,01	0,40 ± 0,09	2,1 ± 0,2	3,0 ± 0,2
HAZ SOLO (Ta+ y Ta-)	Tumor	4,1 ± 0,3	(1,9 ± 0,4) E+12	0,44 ± 0,01	0,40 ± 0,09	0,0 ± 0,0*	0,8 ± 0,0
adHS (Ta+ y Ta-)	Tumor	29,0 ± 0,2	(1,3 ± 0,3) E+13	2,89 ± 0,06	2,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0*	5,6 ± 0,0

Tabla 9 – Dosis absorbidas (Gy) para los diferentes protocolos estudiados.
* La concentración de boro en tejidos de animales no inyectados con BPA fue generalmente menor al límite de detección. El mayor valor obtenido fue de 0,4±0,1 ppm. Aún en este caso la variación en la dosis total caería dentro de la incertidumbre de la determinación de la dosis.

La respuesta tumoral fue evaluada 28 días después del tratamiento considerando tres tamaños arbitrarios de tumores (chicos: <10 mm^3, medianos:

10-100 mm^3, y grandes: >100 mm^3) definidos para categorizar el tamaño al momento de la irradiación y evaluar una respuesta potencialmente diferente dependiendo del tamaño (Kato I et al., 2004). Las respuestas tumorales para el grupo Ta+ BPA-BNCT y el Ta- BPA-BNCT se presentan en la tabla 10. La respuesta tumoral total (RTT) para todos los tamaños de tumores juntos fue significativamente mayor para los animales tratados con talidomida antes del BNCT mediado por BPA que para los animales tratados con BPA-BNCT sólo, 84±3% comparado con 67±5% (p=0,006). Considerando la estratificación por tamaño tumoral al momento de la irradiación, la RTT fue mayor en los animales Ta+ BPA-BNCT que en los Ta- BPA-BNCT para los tumores grandes (71±17% y 50±25%, respectivamente), los tumores medianos (84±6% y 71±11, respectivamente), y los tumores chicos (86±4% y 67±5%, respectivamente). Estas diferencias alcanzaron significancia estadística en el caso de los tumores chicos (p=0,008). La respuesta completa para todos los tamaños de tumores juntos, también fue mayor para los animales tratados con talidomida que para los animales no tratados con talidomida (56±5% y 43±5%, respectivamente). La RC alcanzó una diferencia significativa, a favor de los animales tratados con talidomida, para los tumores chicos (p=0,003). Es digno de mencionar que no se encontraron diferencias significativas entre la respuesta parcial (RP) y la respuesta parcial como reducción a menos de un 50% del volumen inical ($RP_{0,5}$). La incidencia de respuesta completa fue mayor para los tumores chicos que para los medianos y grandes en el Ta+ BPA-BNCT y en Ta- BPA-BNCT. Esta diferencia alcanzó significancia estadística en el caso de Ta+ BPA-BNCT ($p \leq 0,004$). La respuesta completa en tumores grandes es característicamente difícil de alcanzar (Kato I et al., 2004; Trivillin VA et al., 2004). Sin embargo, la escasez de tumores grandes (> 100 mm^3) en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hamster complica el análisis de la respuesta en este grupo particular de tumores.

Las respuestas tumorales para el grupo Ta+ HS y el Ta- HS se presentan en la tabla 11. No se observaron diferencias significativas en la respuesta tumoral como resultado del tratamiento previo con talidomida en los animales irradiados con Haz Sólo.

Independientemente del tratamiento previo con talidomida, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta tumoral total entre los grupos tratados con BPA-BNCT y los tratados con Haz Sólo (Tablas 10 y 11), por ejemplo el grupo Ta+ BPA-BNCT (84±3%) comparado con Ta+ HS (15±5%), p=0,0012; y el grupo Ta- BPA-BNCT (67±5%) comparado con el grupo Ta- HS (18±5%), p=0,0001.

Tumores	n	RC (% ± EE)	RP (% ± EE)	$RP_{0,5}$ (% ± EE)	Pr (% ± EE)	RTT (% ± EE)
Ta+ BPA-BNCT						
Total	116	56 ± 5	28 ± 4	20 ± 4	16 ± 3	84 ± 3
Grandes > 100 mm^3	7	14 ± 13	57 ± 19	43 ± 19	29 ± 17	71 ± 17
Medianos 10-100 mm^3	32	25 ± 8	59 ± 9	41 ± 9	16 ± 6	84 ± 6
Chicos < 10 mm^3	77	73 ± 5	13 ± 4	9 ± 3	14 ± 4	86 ± 4
Ta- BPA-BNCT						
Total	100	43 ± 5	24 ± 4	13 ± 3	33 ± 5	67 ± 5
Grandes > 100 mm^3	4	0 ± 0	50 ± 25	25 ± 22	50 ± 25	50 ± 25
Medianos 10-100 mm^3	17	24 ± 10	47 ± 12	35 ± 12	29 ± 11	71 ± 11
Chicos < 10 mm^3	79	49 ± 6	18 ± 4	8 ± 3	33 ± 5	67 ± 5

Tabla 10 – Respuesta tumoral para los protocolos de BNCT (%±EE).
RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. $RP_{0,5}$: respuesta parcial a menos del 50% del volumen inicial. Pr: Progresión tumoral. RTT: Respuesta tumoral total (RC+RP).

Tumores	n	RC (% ± EE)	RP (% ± EE)	$RP_{0,5}$ (% ± EE)	Pr (% ± EE)	RTT (% ± EE)
Ta+ HS						
Total	54	0 ± 0	15 ± 5	4 ± 3	85 ± 5	15 ± 5
Grandes > 100 mm^3	2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
Medianos 10-100 mm^3	9	0 ± 0	22 ± 14	0 ± 0	78 ± 14	22 ± 14
Chicos < 10 mm^3	43	0 ± 0	14 ± 5	5 ± 3	86 ± 5	14 ± 5
Ta- HS						
Total	50	0 ± 0	18 ± 5	6 ± 3	82 ± 5	18 ± 5
Grandes > 100 mm^3	2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
Medianos 10-100 mm^3	10	0 ± 0	20 ± 13	0 ± 0	80 ± 13	20 ± 13
Chicos < 10 mm^3	38	0 ± 0	18 ± 6	8 ± 4	82 ± 6	18 ± 6

Tabla 11 – Respuesta tumoral para los protocolos de Haz Sólo (%±EE).
RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. $RP_{0,5}$: respuesta parcial a menos del 50% del volumen inicial. Pr: Progresión tumoral. RTT: Respuesta tumoral total (RC+RP).

Adicionalmente, se estudió la evolución natural de la enfermedad durante un período de 28 días. A este grupo control, que es el mismo utilizado en el Capítulo 1, no se le aplicó ningún tipo de terapia, pero se le evaluó el crecimiento tumoral y el peso corporal del mismo modo que a los animales tratados (ver materiales y métodos). Los resultados de la respuesta tumoral se muestran en la tabla 12. En este caso la "respuesta tumoral" se refiere al desarrollo del tumor sin tratamiento pero se preserva el mismo término a fines comparativos. Como se muestra en la tabla 12, en este grupo se encontraron algunos casos de reducción de volumen tumoral espontáneo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con Haz Sólo (Ta+ HS y Ta- HS) y los animales que no recibieron tratamiento. Sin embargo, la respuesta tumoral total alcanzó diferencias significativas tanto entre los animales Ta+ BPA-BNCT y los animales sin tratamiento, como entre los Ta- BPA-BNCT y los animales sin tratamiento (p= 0,001 en ambos casos).

Tumores	**n**	**RC (% ± EE)**	**RP (% ± EE)**	**$RP_{0,5}$ (% ± EE)**	**Pr (% ± EE)**	**RTT (% ± EE)**
SIN TRATAMIENTO						
Total	77	0 ± 0	16 ± 4	8 ± 3	84 ± 4	16 ± 4
Grandes > 100 mm^3	5	0 ± 0	20 ± 18	20 ± 18	80 ± 18	20 ± 18
Medianos 10-100 mm^3	21	0 ± 0	33 ± 10	14 ± 8	67 ± 10	33 ± 10
Chicos < 10 mm^3	51	0 ± 0	8 ± 4	4 ± 3	92 ± 4	8 ± 4

Tabla 12 - Respuesta tumoral para los animales cancerizados sin tratamiento (% ± EE). RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. $RP_{0,5}$: respuesta parcial a menos del 50% del volumen inicial. Pr: Progresión tumoral. RTT: Respuesta tumoral total (RC+ RP).

A modo de resumen, en la figura 29 pueden observarse gráficamente los resultados de las RTT para los diferentes grupos de tratamiento y la significancia estadística de las diferencias entre grupos.

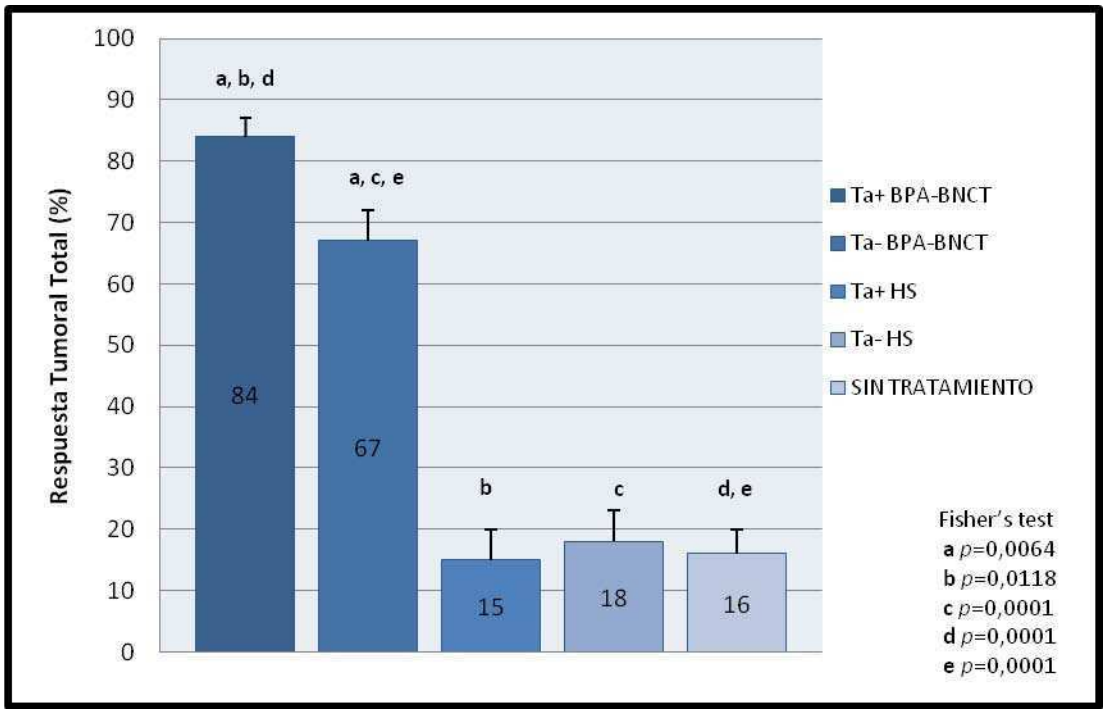


Figura 29 - Respuesta tumoral total (% ± EE) para los diferentes protocolos estudiados en este capítulo, y sus significancias estadísticas.

La mucositis en el tejido premaligno alcanzó el pico máximo entre los 7 y 10 días después del BPA-BNCT y revirtió entre la segunda y tercera semana después del tratamiento. Teniendo en cuenta la ocurrencia de mucositis durante todo el período de estudio, el tratamiento previo con talidomida redujo la incidencia de Grado 3-4 de mucositis de 80±18% en el grupo Ta- BPA-BNCT a 0±0% en los animales tratados con Ta+ BPA-BNCT (Tabla 13). En los animales tratados con Haz Sólo (Ta- HS) la mucositis no excedió el Grado 2. El tratamiento previo al Haz Sólo con talidomida (Ta+ HS) reduce la incidencia de Grado 2 de mucositis de 17±15% a 0±0%. Este hallazgo sugiere un efecto protector de la talidomida sobre la mucositis generada en el tejido premaligno. En los animales tratados con Haz Sólo, el efecto observado de la talidomida fue directo, independientemente de la potencial acción sobre el BPA entregado, ya que en esta modalidad no se entrega el compuesto borado. Sin embargo, como la mucositis generada en animales tratados con Haz Sólo (a la misma fluencia de neutrones que los tratados con BPA-BNCT, tabla 9) es muy suave, decidimos explorar este efecto a una dosis

mayor de Haz Sólo que pudiera exacerbar la mucositis en el tejido con desórdenes potencialmente malignos como se describió en materiales y métodos.

Protocolo	Grado 2	Grado 3	Grado 4	Grado 3-4
Ta+ BPA-BNCT	86 ± 13	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ta- BPA-BNCT	80 ± 18	60 ± 22	20 ± 18	80 ± 18
Ta+ HS	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ta- HS	17 ± 15	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ta+ ad HS	100 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Ta- ad HS	67 ± 19	83 ± 15	0 ± 0	83 ± 15

Tabla 13 – Severidad de mucositis en el tejido premaligno: %± EE de incidencia de mucositis Grado 2 a Grado 4 considerando el período completo de estudio. Los valores indican el porcentaje de animales que exhibió el grado de mucositis mostrado en cada columna en uno o más momentos del tratamiento (todos los animales mostraron Grado 1 de mucositis en algún momento del tratamiento).

Las respuestas tumorales de los grupos Ta+ ad HS y Ta- ad HS se presentan en la tabla 14. El tratamiento previo con talidomida no induce una diferencia significativa en la RTT (Ta+ adHS: 27±6% comparado con Ta- adHS: 13±6%). Sin embargo, el tratamiento con talidomida induce un marcado efecto protector de la mucositis en el tejido premaligno. Mientras que el 83±15% de los animales Ta- adHS exhibieron Grado 3, ninguno de los animales Ta+ adHS ancanzó el Grado 3 de mucositis (Tabla 13).

Respecto al estado de salud de los animales tratados, no se observaron más cambios que los mismos vistos en el estudio de toxicidad cuando los animales fueron tratados con talidomida. El peso corporal de los hámsteres osciló levemente durante el período posterior al tratamiento, con variaciones (de ganancia o pérdida) en promedio de un 12% del peso inicial (Figura 30).

Tumores	n	RC (% ± EE)	RP (% ± EE)	$RP_{0,5}$ (% ± EE)	Pr (% ± EE)	RTT (% ± EE)
Ta+ adHS						
Total	48	27 ± 6	33 ± 7	17 ± 5	40 ± 7	60 ± 7
Grandes > 100 mm^3	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Medianos 10-100 mm^3	7	14 ± 13	71 ± 17	71 ± 17	14 ± 13	86 ± 13
Chicos < 10 mm^3	41	29 ± 8	27 ± 7	7 ± 4	44 ± 8	56 ± 8
Ta- adHS						
Total	53	13 ± 6	34 ± 9	17 ± 5	53 ± 10	47 ± 10
Grandes > 100 mm^3	2	0 ± 0	50 ± 35	50 ± 35	50 ± 35	50 ± 35
Medianos 10-100 mm^3	11	0 ± 0	45 ± 22	27 ± 13	55 ± 22	45 ± 22
Chicos < 10 mm^3	40	18 ± 9	30 ± 10	13 ± 5	52 ± 11	48 ± 11

Tabla 14 - Respuesta tumoral para los protocolos de alta dosis de Haz Sólo (%± EE). RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. $RP_{0,5}$: respuesta parcial a menos del 50% del volumen inicial. Pr: Progresión tumoral. RTT: Respuesta tumoral total (RC+ RP).

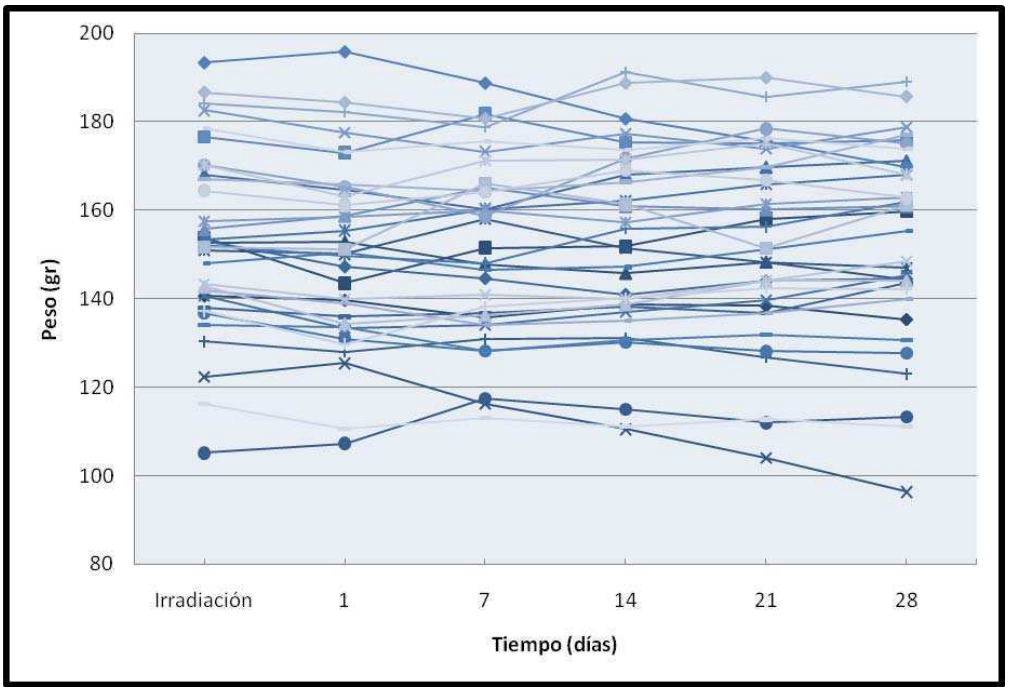


Figura 30 – Curvas de peso de cada uno de los hámsteres tratados con BNCT y Haz Sólo, a lo largo de este capítulo, en función del tiempo.

3. Discusión

Los vasos tumorales resultantes de la angiogénesis y vasculogénesis están funcional y estructuralmente alterados. Son tortuosos y dilatados, sus paredes exhiben fenestraciones, vesículas y orificios transcelulares, uniones endoteliales ensanchadas y falta o discontinuidad de la membrana basal (Carmeliet P y Jain RK, 2000). Estas alteraciones vasculares conducen a una hipertensión intersticial y a un suministro de sangre heterogéneo, interfiriendo seriamente con la entrega de drogas terapéuticas y oxígeno a los tumores. Está ampliamente difundido que las drogas anti-angiogénicas para la terapia contra el cáncer destruyen la vasculatura tumoral y privan a las células cancerosas del oxígeno y nutrientes. Sin embargo, cuando se administran como únicos agentes, las drogas antiangiogénicas han producido efectos terapéuticos muy modestos (Quesada AR et al., 2006). Ha sido reportado (Jain RK, 2005) que la aplicación, diseñada a medida, de agentes antiangiogénicos puede normalizar la vasculatura anormal de los tumores para entregar más eficientemente drogas y oxígeno a las células tumorales, incrementando considerablemente el efecto de la quimioterapia y radioterapia. Nuestros estudios de BNCT en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster han mostrado la importancia que tiene en el éxito terapéutico la homogeneidad en la distribución del boro en las células tumorales (Heber EM et al., 2006). Asimismo, otros autores han reportado hallazgos similares en otros modelos experimentales (ej. Ono K et al., 1999). En este contexto, y dado que la vasculatura de los hámsteres no se puede tratar con los anticuerpos monoclonales que se utilizan para normalizar los vasos tumorales en humanos, ratas y ratones (Goel S et al., 2011), nosotros establecimos, por primera vez, una técnica de normalización de los vasos sanguíneos tumorales en el modelo de la bolsa del hámster con el objetivo de utilizarlo en el estudio de BNCT particularmente.

A la talidomida se la ha descripto como una droga inmuomoduladora, anti-inflamatoria y antiangiogénica. Su acción como inhibidor de la angiogénesis está asociada a su capacidad de inhibir el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (D'amato RJ et al., 1994; Von Moos R et al., 2003; Yang Y et al., 2009). Tras la trágica retirada del

mercado de la talidomida debido a sus efectos teratogénicos, fue aprobada en 1997 por la FDA para combatir una variedad de enfermedades dermatológicas (von Moos R et al., 2003). Además, es una droga prometedora como candidata para la prevención y tratamiento contra el cáncer. Yang y colaboradores (Yang Y et al., 2009) mostraron el efecto inhibitorio de la talidomida contra la transformación maligna en el modelo de cáncer bucal de la mejilla del hámster, al ser administrada durante el período de topicación con DMBA. En este contexto, y basándonos en estudios pilotos, seleccionamos un protocolo de administración de la talidomida que induciría la normalización de los vasos sanguíneos en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster. Apoyándonos en un análisis cualitativo de la morfología de los vasos sanguíneos en el tejido con alteraciones potencialmente malignas (PMD) *in situ*, establecimos una ventana tentativa de normalización a las 48 horas de iniciado el tratamiento, que empleamos en los experimentos subsiguientes. Macroscópicamente, la observación de angostamiento y enderezamiento de los vasos sanguíneos en el tejido con PMD fue máximo a las 48 horas de la primera inyección de talidomida. Este hallazgo fue interpretado como potencial normalización de los vasos sanguíneos en la bolsa cancerizada que fue confirmado por dos análisis adicionales.

Una reducción estadísticamente significativa en la permeabilidad de los vasos sanguíneos al azul de Evans (EBD) en los tumores de los animales tratados con talidomida indicó una reducción en la hiperpermeabilidad característica de los vasos sanguíneos aberrantes dentro de los tumores que compromete el flujo sanguíneo y consecuentemente impide la entrega eficiente de drogas. Por eso, la reducción en la extravasación del EBD fue interpretada como un signo de normalización de los vasos sanguíneos (Cerniglia GJ et al., 2009). Los vasos sanguíneos de la bolsa normal, hígado y riñón no mostraron cambios como resultado del tratamiento con talidomida. Sólo los vasos anormales serían sensibles a la normalización. En este sentido, los vasos sanguíneos del tejido con PMD son aberrantes comparados con los de la bolsa normal, pero están menos alterados funcional y estructuralmente que los del tumor. En este contexto, el pequeño grado de normalización que pueden alcanzar los vasos del tejido con PMD no sería suficiente para ser demostrada inequívocamente. Las observaciones

cualitativas al microscopio indicando la presencia de menos tortuosidad, y vasos sanguíneos más angostos en el tejido con PMD de hámsteres tratados con talidomida, fueron usadas como guía para establecer la ventana de normalización en los tumores pero no se pretendió usarlas como evidencia cuantitativa de la normalización en el tejido con PMD.

A pesar que existen trabajos donde se publica que el DMSO inhibe la proliferación de células endoteliales de los vasos coroideos en bovinos (Eter N y Spitznas M, 2002), en este estudio no observamos cambios en los vasos sanguíneos tumorales en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster inducidos por DMSO. Estos hallazgos están de acuerdo con los de otros autores quienes no encontraron efectos inhibitorios del DMSO en la proliferación endotelial en ratas y humanos (Bauer KS et al., 1998; Moreira AL et al., 1999).

Los valores de relación de aspecto mostraron que el tratamiento con talidomida reduce significativamente la compresión de los vasos sanguíneos tumorales a niveles que se asemejan a los de la vasculatura normal. Las fuerzas de compresión pueden causar el colapso del lumen vascular y restringir el flujo sanguíneo. La normalización de los vasos sanguíneos reduciría la hiperpermeabilidad vascular y la presión de fluido intersticial (Hagendoorn J et al., 2006), reduciendo las fuerzas compresivas y contribuyendo a una adecuada entrega de los agentes terapéuticos dentro del tumor (Jain RK, 1998). Dado que los GMPs han sido descriptos en una variedad de tumores humanos (Nagy JA et al., 2009) y en tumores de la bolsa de la mejilla del hámster (Aromando RF et al., 2009), la ausencia de GMPs en los animales tratados con talidomida fue interpretada como un signo adicional de normalización de los vasos sanguíneos y podría ser atribuido al efecto inhibitorio de la talidomida sobre el VEGF (D'amato RJ et al., 1994).

Aquí hemos desarrollado, por primera vez, un modelo de normalización de los vasos sanguíneos tumorales en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, adecuado para examinar el efecto de la normalización en terapias contra el cáncer de cabeza y cuello en general, y BNCT en particular. La normalización "hecha a medida" de la vasculatura aberrante incrementaría

considerablemente la entrega de oxígeno y drogas, contribuyendo a un éxito terapéutico.

Asimismo, en este capítulo demostramos que la normalización de los vasos sanguíneos antes de la administración del BPA aumentó la respuesta tumoral del BNCT mediado por BPA. El hallazgo que el tratamiento previo con talidomida no induce un cambio significativo en la respuesta tumoral en animales tratados con Haz Sólo sugeriría que el incremento en la respuesta tumoral estaría relacionado a un efecto sobre la entrega del BPA. El incremento en el flujo sanguíneo y entrega de drogas por la restitución temporaria de las funciones vasculares tumorales descriptas previamente (ej. Fukumura D y Jain RK, 2007) nos condujo a esperar un incremento en el contenido absoluto de boro en los tumores de los animales tratados con talidomida antes de la administración del BPA. Sin embargo, las mediciones de boro por ICP-MS no revelaron diferencias estadísticamente significativas en los valores del contenido neto de boro entre los animales Ta+ y Ta-. La reducción en la permeabilidad vascular medida en términos del descenso de extravasación de EBD en tumores con vasos sanguíneos normalizados previamente descripta (Cerniglia GJ et al., 2009) parecería ser contraria a lo que indica la intuición. Sin embargo, es sabido que la hiperpermeabilidad y las perforaciones de los vasos anormales de los tumores conducen a una hipertensión intersticial y a un flujo sanguíneo temporalmente y espacialmente heterogéneo. En este sentido las drogas se acumularán en áreas que ya tienen una cantidad suficiente mientras que las regiones inaccesibles continuarán siendo inaccesibles (Jain RK, 1999). Por eso, los valores globales de boro nos dicen poco acerca de la aptitud y utilidad terapéutica de la biodistribución del boro, a pesar que esos valores son útiles para los cálculos dosimétricos (ej. Coderre JA y Morris GM, 1999). De hecho, el principal objetivo de la normalización de los vasos sanguíneos tumorales no es aumentar la captación total de droga y oxígeno. En cambio, busca distribuir las drogas y el oxígeno eficientemente a una mayor proporción de células tumorales reparando el sistema de entrega defectuoso (Jain RK, 2005). Por lo expuesto, no es sorprendente que los valores globales del contenido de boro dentro del tumor no muestren diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con talidomida y los no tratados previamente con talidomida.

Estudios preliminares de α espectrometría y autorradiografía neutrónica realizados en colaboración con el grupo del Dr Altieri de la Universidad de Pavía (ver capítulo 4) en tumores de la mejilla del hámster de animales Ta+ y Ta- mostraron que el pre tratamiento con talidomida no incrementa los valores absolutos de boro pero incrementa la homogeneidad de la captación (Bortolussi S et al., 2010). En el contexto del presente estudio, estos hallazgos sugieren que el incremento en la respuesta tumoral provocada por la normalización de los vasos aberrantes antes de la entrega del BPA podría ser atribuida, al menos parcialmente, a una distribución más homogénea del BPA dentro del tumor.

El incremento de la oxigenación como resultado de la normalización de los vasos tumorales podría jugar un rol considerable incrementando la sensibilidad de los tumores a la componente de baja transferencia lineal de energía (LET) en BNCT. Sin embargo, el hecho que no se hayan encontrado diferencias significativas en la respuesta tumoral entre los grupos Ta+ y Ta- de animales tratados con Haz Sólo sugeriría que el beneficio principal de la normalización de los vasos sanguíneos estaría asociado al direccionamiento incrementado del boro. En ese sentido, la mejora en la oxigenación de las células tumorales redundaría en una mayor incorporación de BPA (Masunaga S et al., 2012). Además, el hecho de no haber encontrado cambios estadísticamente significativos en la respuesta tumoral inducidos por la administración de talidomida antes del tratamiento con Haz Sólo descartaría un efecto directo de la talidomida en la remisión tumoral.

El hallazgo que el tratamiento previo con talidomida provoca un efecto protector sobre la mucositis generada en el tejido premaligno limitante de dosis nos impulsó a explorar este tema en mayor profundidad. La comparación de los grupos Ta+ HS y Ta- HS en términos de la toxicidad en el tejido con PMD mostró un leve beneficio por el tratamiento previo con talidomida. Sin embargo, como la dosis total absorbida del Haz Sólo fue baja porque los grupos Ta+ HS y Ta- HS fueron diseñados para explorar el efecto de la dosis de fondo y fueron igualados a la fluencia neutrónica de los grupos Ta+ BPA-BNCT y Ta- BPA-BNCT, la mucositis fue extremadamente leve. Entonces diseñamos los grupos Ta+ adHS y Ta- adHS a una dosis mayor de Haz Sólo para exacerbar la mucositis en el tejido premaligno (sin exceder los niveles aceptables) y analizar el efecto de la talidomida en la

mucositis inducida por radiación, sin tener en cuenta sus efectos sobre la entrega del BPA. Este estudio demostró un efecto protector directo de la talidomida sobre la mucositis, aparentemente no relacionado a los cambios en la entrega del boro. Estos hallazgos concuerdan con el efecto protector de la talidomida sobre la mucositis experimental descripto previamente (Lima V et al., 2005). Dado que las citoquinas están involucradas en la patogénesis de la mucositis oral (Sonis ST, 1998), este efecto fue asociado a la actividad inhibitoria de citoquinas de la talidomida. En particular, se ha especulado que el efecto anti-inflamatorio sería parcialmente atribuido a la reducción del TNF-α (Lima V et al., 2005). Sin embargo, no se pueden hacer comparaciones directas entre este estudio y el de Lima y colaboradores (Lima V et al., 2005), porque existen diferencias entre los protocolos de administración cuando la talidomida es utilizada como droga antiangiogénica en períodos cortos para inducir una ventana de normalización vascular y cuando se utiliza como droga anti-inflamatoria.

Por los conocidos efectos teratogénicos de la talidomida (Tseng S et al., 1996) y a pesar que se ha autorizado su uso en humanos, la normalización de los vasos sanguíneos tumorales con esta droga antes del BPA-BNCT para optimizar la respuesta tumoral y reducir la toxicidad en el tejido premaligno limitante de dosis justificaría un análisis cauteloso en un escenario clínico. Asimismo, en el caso de pacientes, se podría recurrir a otras técnicas para la normalización de los vasos sanguíneos tumorales previo a la administración de BPA (Folkman J, 2006; Goel S et al., 2011). Así, hemos demostrado que las técnicas de normalización de los vasos sanguíneos en general también ameritan ser investigadas como un camino para optimizar las ventajas del BNCT en los pacientes.

CAPÍTULO 3

COMBINACIÓN DE LA NORMALIZACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS CON BNCT SECUENCIAL

1. Introducción

El BNCT (como se ha mencionado en los capítulos anteriores) es una radioterapia bioquímicamente dirigida que se basa en la captura nuclear y reacciones de fisión que ocurren cuando el ^{10}B se irradia con neutrones térmicos. Si bien, en ensayos clínicos a lo largo del mundo, se han obtenido resultados prometedores para pacientes con glioma, melanoma primario o metastásico y tumores recurrentes de cabeza y cuello, los temas críticos que deben ser abordados incluyen el desarrollo de nuevos agentes borados y la optimización de su entrega al tumor (Barth RF et al., 2012; Menéndez PR et al., 2009).

Con el objetivo de maximizar los posibles efectos terapéuticos del BNCT, y dentro del marco de esta tesis, desarrollamos nuevas estrategias para el tratamiento de tumores bucales en el modelo de la bolsa de la mejilla del hámster. En el Capítulo 1 demostramos el éxito terapéutico de la nueva modalidad de BNCT denominada secuencial sin exceder los límites de radiotolerancia. Este protocolo consiste en la aplicación de BPA-BNCT seguido de GB-10-BNCT luego de 24 ó 48 hs. La estrategia de esta modalidad es alcanzar las poblaciones de células tumorales que fueron refractarias al primer tratamiento sin exceder el tiempo necesario para que ocurra el repoblamiento tumoral. Además, desarrollamos una técnica de normalización de los vasos sanguíneos tumorales del modelo de hámster utilizando talidomida, con el que demostramos un incremento en la respuesta tumoral minimizando los efectos de la mucositis en el tejido premaligno limitante de dosis (Capítulo 2). En esta oportunidad tomamos el concepto de normalización propuesto por Rakesh Jain, que postula que se puede lograr que la entrega de drogas y oxígeno a las células del tumor sea mucho más eficiente disminuyendo la IFP, aumentando la presión de oxígeno y reduciendo la hiperpermeabilidad vascular (Jain RK, 2005). La vasculatura revertirá a un estado más normal si se puede restablecer el balance de los factores pro- y anti-angiogénicos, que se encuentra desequilibrado en los tumores (Jain RK, 2005).

Finalmente, la normalización mejoraría la perfusión y entrega de drogas aumentando el éxito de la quimioterapia y/o radioterapia, ya que se ha demostrado que la administración de los agentes antiangiogénicos por períodos cortos podría reducir los brotes vasculares ineficientes (Tong RT et al., 2004), dando paso a un flujo más eficiente. En nuestro caso en particular, la normalización de los vasos sanguíneos aberrantes del tumor favorecería la llegada, distribución e incorporación de los compuestos borados a las células tumorales.

Si bien los resultados obtenidos hasta el momento han sido sumamente alentadores, aún existe la posibilidad de mejorar tanto el control tumoral como los efectos adversos de la terapia por BNCT. Por este motivo, decidimos estudiar el éxito terapéutico y la potencial radiotoxicidad de la combinación de ambas modalidades (normalización vascular + BNCT secuencial). Está descripto que el BPA es transportado activamente a través de la membrana de las células tumorales y se incorpora selectivamente a las células tumorales metabólicamente más activas (ej. Wittig A et al., 2000). El GB-10 es un compuesto difusivo que no se incorpora selectivamente a las células del tumor (ej. Heber EM et al., 2004). Asimismo, estudios previos realizados en nuestro laboratorio plantearon la posibilidad que el BNCT mediado por GB-10 podría actuar mediante un mecanismo dirigido a los vasos tumorales aberrantes (Trivillin VA et al., 2006). De este modo, nuestra hipótesis de trabajo fue que se podría incrementar el éxito terapéutico del BNCT modulando la entrega del BPA a través de la normalización de los vasos sanguíneos (tal como se demostró en el Capítulo 2), y luego de 2 días (cuando comienza a revertir el proceso) entregar el GB-10 que alcanzaría a las poblaciones celulares que fueron refractarias a la primera irradiación.

2. Resultados

En este estudio se trataron 2 grupos de animales. En uno de ellos se aplicó el protocolo de BNCT propiamente dicho, mientras que en el otro se estudiaron los efectos de dosis de fondo (Haz Sólo). Si bien la descripción detallada de los grupos se encuentra en Materiales y Métodos, sección 8.3, en la figura 31 se

esquematiza la metodología utilizada en este nuevo ensayo. Brevemente, el grupo Ta+ Sec-BNCT fueron animales con tumor tratados con talidomida y luego con BNCT mediado por BPA, seguido de BNCT mediado por GB-10 después de 48 horas; mientras que el grupo Ta+ Sec-HS fueron animales con tumor tratados con talidomida e irradiados con 2 aplicaciones de Haz Sólo con un intervalo de 48 horas.

Los resultados se compararon con los obtenidos en el Capítulo 1, que corresponden a la misma metodología pero sin la previa normalización de los vasos sanguíneos (Figura 31). El grupo Ta- Sec-BNCT corresponde a los animales con tumor tratados con BNCT mediado por BPA, seguido de BNCT mediado por GB-10 luego de 48 horas. El grupo Ta- Sec-HS fueron animales con tumor irradiados con 2 aplicaciones de Haz Sólo con un intervalo de 48 horas.

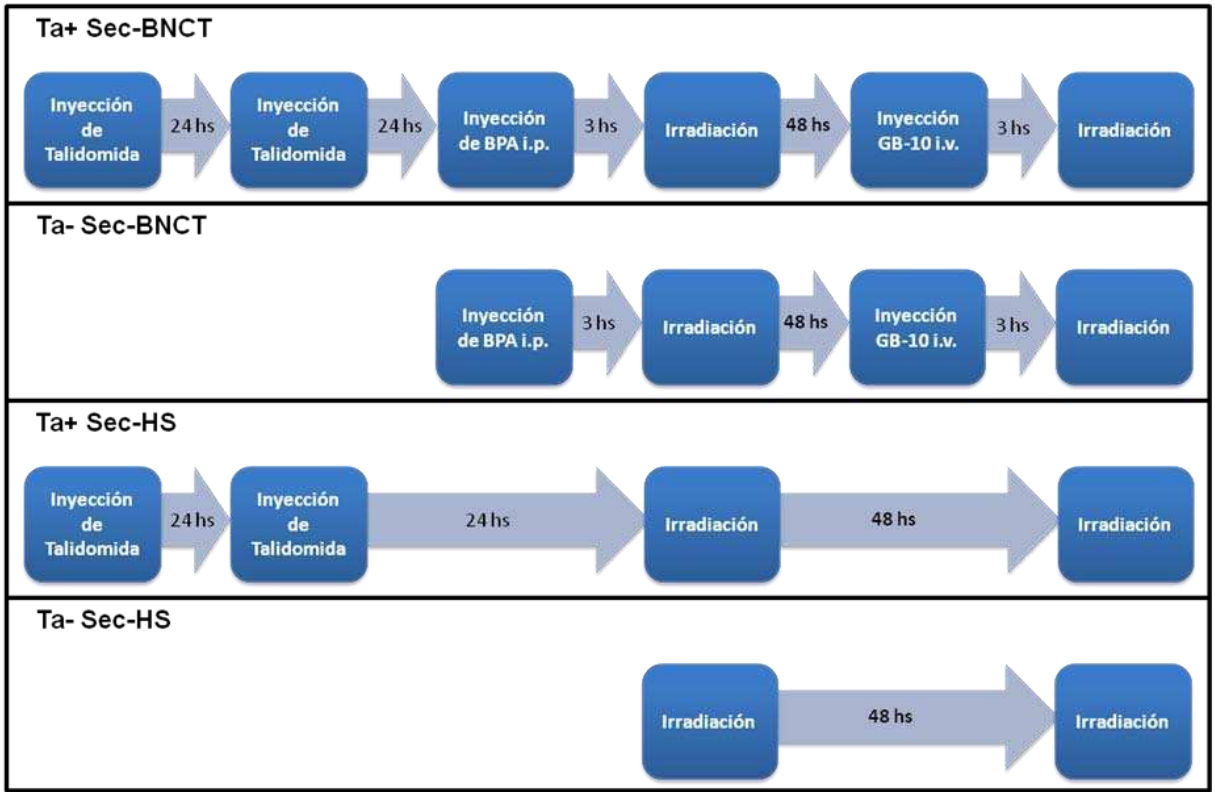


Figura 31 - Esquema de los protocolos utilizados, en este capítulo, para el estudio de BNCT *in vivo*. Para facilitar la comparación se incluyen los protocolos Ta- Sec-BNCT y Ta- Sec-HS ya presentados en el Capítulo 1 como Sec-48hs-BNCT y Sec-48hs-HS, respectivamente.

En esta oportunidad, al igual que en el capítulo 2, trabajamos igualando la fluencia prescripta a tumor para que ambos tratamientos (con y sin normalización de los vasos sanguíneos) sean comparables. La tabla 15 presenta las dosis absorbidas prescriptas a tumor para las diferentes componentes de radiación para los dos protocolos que integran el tratamiento secuencial (con y sin normalización de los vasos sanguíneos tumorales) y para los protocolos de Haz Sólo. Las dosis para BPA-BNCT y GB-10-BNCT se presentan separadamente, pero cuando se suman dan por resultado la dosis absorbida total prescripta a tumor para BNCT secuencial (Tabla 16). Aquí, se tiene en cuenta que la concentración de BPA luego del tratamiento con talidomida (Ta+ BPA-BNCT) es menor a la utilizada en el cálculo de la dosis prescripta para Ta- BPA-BNCT (20±8 ppm vs. 33±17 ppm). Por lo tanto, a igual fluencia neutrónica, las dosis boro y total absorbidas para Ta+ Sec-BNCT también resultan menores que para Ta- Sec-BNCT (Tabla 15). Como puede observarse en la tabla 15, la dosis absorbida prescripta para GB-10-BNCT es única, ya que (como se describe luego) la concentración de boro no se ve afectada por el tratamiento con talidomida y posterior irradiación con BPA.

Protocolo	Gamma [Gy]	Fluencia [n cm^{-2}]	Protones (N^{14}) [Gy]	Dosis Boro [Gy]	Dosis Total [Gy]
Ta- BPA-BNCT	0,35 ± 0,03	1,33E+12 ± 2,85E+11	0,28 ± 0,06	3,29 ± 1,82	3,91 ± 1,82
Ta+ BPA-BNCT	0,35 ± 0,03	1,33E+12 ± 2,85E+11	0,28 ± 0,06	1,98 ± 0,69	2,60 ± 0,70
GB-10-BNCT	0,55 ± 0,06	2,10E+12 ± 4,52E+11	0,44 ± 0,09	5,00 ± 3,46	5,99 ± 2,28
(Ta+ y Ta-) 1er HS	0,35 ± 0,03	1,33E+12 ± 2,85E+11	0,28 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,63 ± 0,07
2do HS	0,55 ± 0,06	2,10E+12 ± 4,52E+11	0,44 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,99 ± 0,11

Tabla 15 - Dosis absorbidas prescriptas a tumor para las diferentes componentes de dosis (Gy) para todos los protocolos experimentales utilizados en este capítulo.

Los animales tratados con Haz Sólo se emplearon para evaluar el efecto de la dosis de fondo (rayos gamma y protones inducidos por la reacción de captura en ^{14}N), y fueron igualados por fluencia de neutrones con los correspondientes tratamientos de BNCT (Tabla 15). En el caso de los animales tratados con Haz

Sólo, la dosis prescripta y la dosis absorbida real son la misma, ya que la dosis boro es nula.

Protocolo	Dosis Boro (Gy)	Dosis Total (Gy)
Ta- Sec-BNCT	8 ± 5	10 ± 4
Ta+ Sec-BNCT	7 ± 4	9 ± 3

Tabla 16 - Dosis boro y total prescriptas a tumor (Gy) para los dos protocolos de BNCT con y sin tratamiento con talidomida. Son las resultantes de la suma de (Ta+ y Ta-) BPA-BNCT y GB-10-BNCT.

Las determinaciones de la concentración de boro en los animales tratados con talidomida e inyectados con BPA se realizaron por ICP-MS y se describen en detalle en el Capítulo 2. Asimismo, con el objetivo de determinar los posibles cambios en la concentración y microlocalización del GB-10 luego del tratamiento con talidomida y posterior irradiación con BPA, realizamos mediciones por ICP-MS y un análisis cualitativo por autorradiografía neutrónica. En esta oportunidad los estudios de biodistribución realizados revelaron que los niveles globales de boro fueron similares tanto para los animales inyectados con GB-10 sólo, como para los animales inyectados con GB-10 luego del tratamiento con Ta+ BPA-BNCT (32±21 ppm vs. 31±4 ppm). Sin embargo, si bien las medidas globales de boro no varían por el tratamiento de normalización de los vasos tumorales y previa irradiación con BPA, el análisis de la microdistribución del GB-10 mostró cambios en la homogeneidad. Este hallazgo se describe en detalle en el Capítulo 4.

La respuesta tumoral de todos los protocolos de BNCT, a los 28 días después del tratamiento, se presenta en la tabla 17 y figura 32. Si bien el porcentaje de respuesta tumoral total (RTT) fue muy elevado para el tratamiento con Ta- Sec-BNCT (91±3%), en el caso de los animales tratados previamente con talidomida fue del 100±0%. La modalidad de Ta+ Sec-BNCT indujo una RTT significativamente mayor (p=0,0080) que la RTT del Ta- Sec-BNCT. Asimismo, la respuesta completa (RC) también alcanzó una diferencia estadísticamente

significativa a favor de Ta+ Sec-BNCT (p=0,0056), siendo de 87±4% para Ta+ Sec-BNCT vs. 68±5% para Ta- Sec-BNCT.

Tumores	n	RC (% ± EE)	RP (% ± EE)	$RP_{0,5}$ (% ± EE)	Pr (% ± EE)	RTT (% ± EE)
Ta- Sec-BNCT*						
Total	92	68 ± 5	23 ± 5	20 ± 4	9 ± 3	91 ± 3
Grandes > 100 mm^3	8	25 ± 15	63 ± 17	63 ± 17	12 ± 17	88 ± 11
Medianos 10-100 mm^3	21	52 ± 11	43 ± 11	33 ± 10	5 ± 6	95 ± 5
Chicos < 10 mm^3	63	79 ± 5	11 ± 4	10 ± 4	10 ± 4	90 ± 4
Ta+ Sec-BNCT						
Total	78	87 ± 4	13 ± 4	6 ± 6	0 ± 0	100 ± 0
Grandes > 100 mm^3	3	0 ± 0	100 ± 0	67 ± 27	0 ± 0	100 ± 0
Medianos 10-100 mm^3	20	75 ± 10	25 ± 10	15 ± 8	0 ± 0	100 ± 0
Chicos < 10 mm^3	55	96 ± 3	4 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 0

Tabla 17 - Respuesta tumoral para los protocolos de BNCT (%±EE).
RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. $RP_{0,5}$: respuesta parcial a menos del 50% del volumen inicial. Pr: Progresión tumoral. RTT: Respuesta tumoral total (RC+RP).
* Para facilitar la comparación se incluyen los datos reportados en la Tabla 4 del Capítulo 1 correspondientes a Sec-48hs-BNCT.

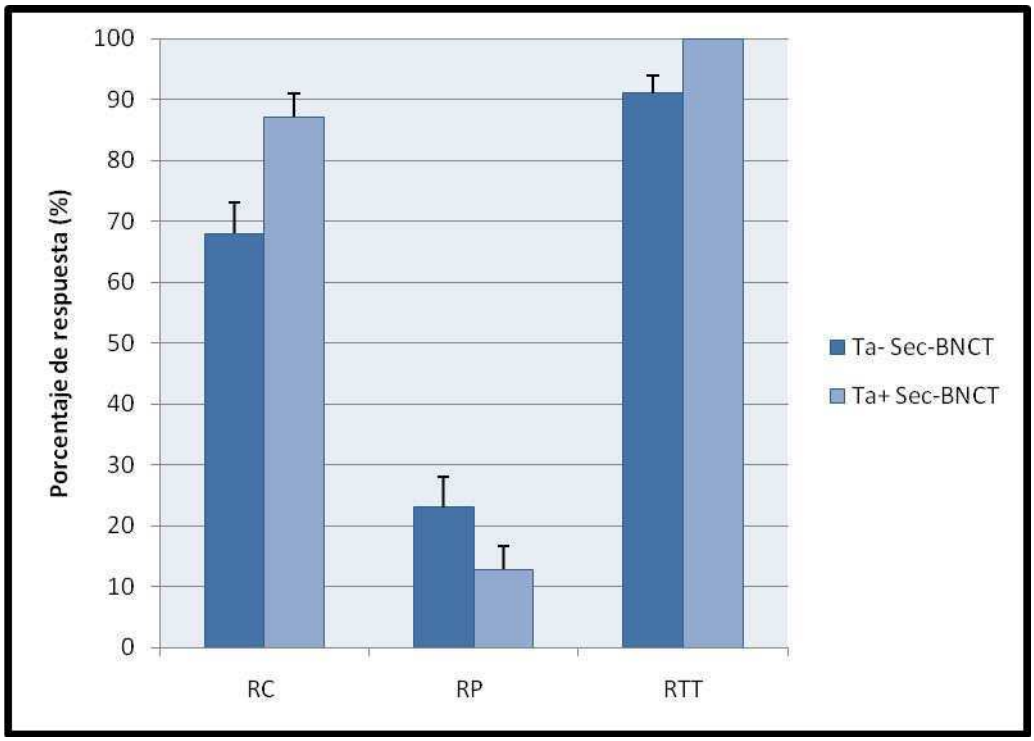


Figura 32 – Porcentajes de respuesta (%±EE) completa (RC), parcial (RP) y tumoral total (RTT) para los dos protocolos de BNCT analizados.

Para categorizar los tumores por tamaño, se dividieron arbitrariamente en tres grupos: chicos (<10 mm^3), medianos (10-100 mm^3), y grandes (>100 mm^3). Esta clasificación se estableció al momento de la irradiación y se evaluó la respuesta en base a su variación al final del tratamiento. La respuesta completa para los tumores chicos fue significativamente mayor (p=0,0058) para el grupo de animales tratado previamente con talidomida (96±3%) que para el grupo sin tratamiento previo (79±5%) (Figura 33). En el caso de los tumores medianos, la RC también fue mayor para Ta+ Sec-BNCT que para Ta- Sec-BNCT (75±10% vs. 52±11%). Sin embargo, esta diferencia no alcanzó significancia estadística. Para los tumores grandes, la RC de los Ta+ Sec-BNCT fue 0±0%, mientras que para los animales sin tratamiento previo con talidomida la RC fue del 25±15%. Si bien esta diferencia pareciera ser grande, no es estadísticamente significativa ya que el número de tumores grandes tratados fue pequeño (n=8 para Ta- Sec-BNCT vs. n=3 para Ta+ Sec-BNCT).

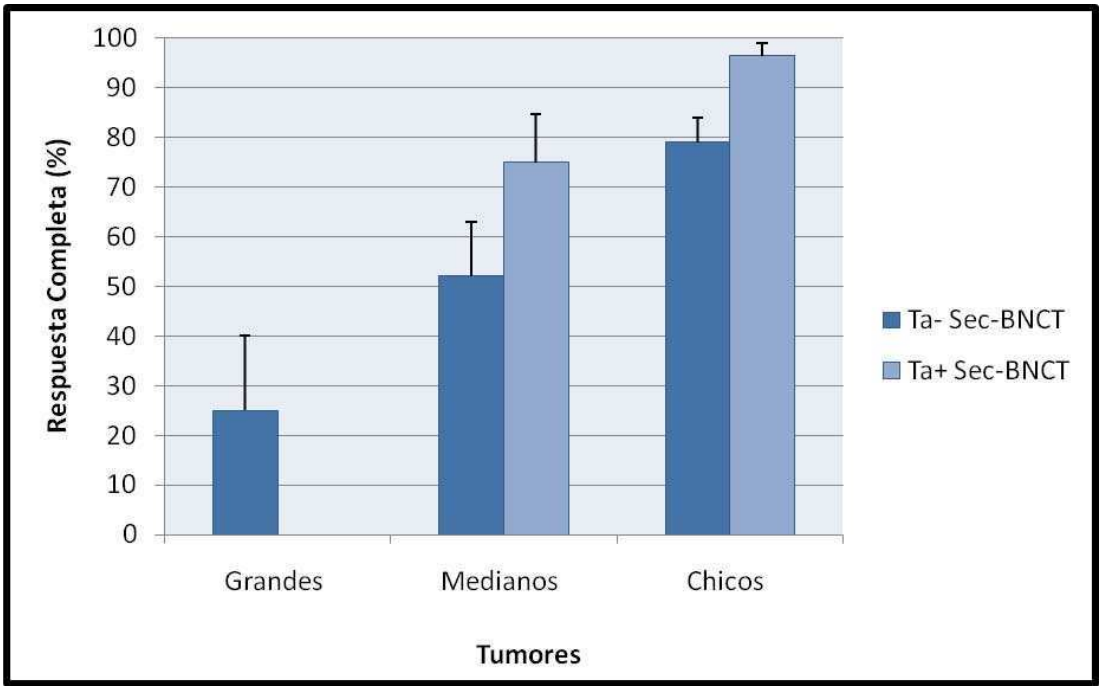


Figura 33 - Respuesta completa (%±EE) de los tumores grandes (> 100 mm^3), medianos (10-100 mm^3) y chicos (< 10 mm^3) para los 2 protocolos de BNCT analizados.

En la tabla 18 se muestran los valores de respuesta tumoral para ambas modalidades de Haz Sólo. Ninguno de los protocolos produjo respuestas completas. Por su parte, las respuestas parciales de Ta- Sec-HS y Ta+ Sec-HS fueron similares entre sí. Asimismo, la respuesta tumoral total fue la misma para ambas modalidades (6±4%).

Tumores	n	RC (% ± EE)	RP (% ± EE)	$RP_{0,5}$ (% ± EE)	Pr (% ± EE)	RTT (% ± EE)
Ta- Sec-HS*						
Total	31	0 ± 0	6 ± 4	6 ± 4	94 ± 4	6 ± 4
Grandes > 100 mm^3	1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	100 ± 30	0 ± 0
Medianos 10-100 mm^3	4	0 ± 0	25 ± 22	25 ± 22	75 ± 22	25 ± 22
Chicos < 10 mm^3	26	0 ± 0	4 ± 4	4 ± 4	96 ± 4	4 ± 4
Ta+ Sec-HS						
Total	33	0 ± 0	6 ± 4	0 ± 0	94 ± 4	6 ± 4
Grandes > 100 mm^3	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Medianos 10-100 mm^3	8	0 ± 0	13 ± 12	0 ± 0	88 ± 11	13 ± 12
Chicos < 10 mm^3	25	0 ± 0	4 ± 4	0 ± 0	96 ± 4	4 ± 4

Tabla 18 - Respuesta tumoral para los protocolos de Haz Sólo (%±EE).
RC: Respuesta completa. RP: Respuesta parcial. $RP_{0,5}$: respuesta parcial a menos del 50% del volumen inicial. Pr: Progresión tumoral. RTT: Respuesta tumoral total (RC+RP).
* Para facilitar la comparación se incluyen los datos reportados en la Tabla 6 del Capítulo 1 correspondientes a Sec-48hs-HS.

Independientemente del tratamiento previo con talidomida, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta tumoral total entre los grupos tratados con BNCT y los tratados con Haz Sólo (Figura 34). El grupo Ta+ Sec-BNCT mostró una RTT significativamente mayor que Ta+ Sec-HS (100±0% vs. 6±4%; p=0,0001). Del mismo modo Ta- Sec-BNCT alcanzó una RTT significativamente mayor que Ta- Sec-HS (91±3% vs. 6±4%; p=0,0001).

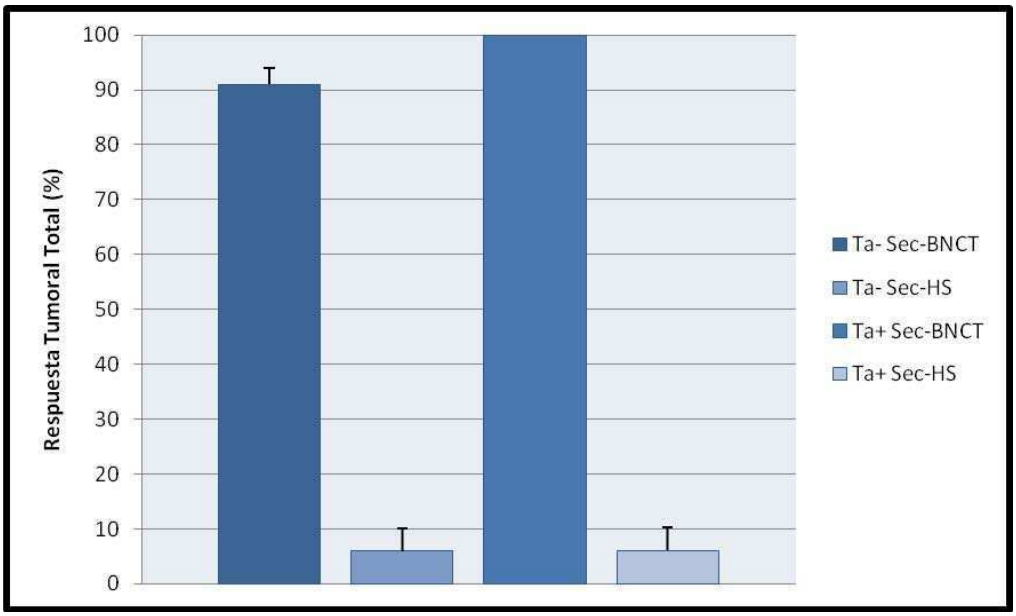


Figura 34 – Porcentajes de respuesta tumoral total (%±EE) para todos los protocolos analizados.

La mucositis en el tejido premaligno, circundante a los tumores, alcanzó el pico máximo entre los 7 y 14 días después del tratamiento con BNCT, independientemente de la utilización de la talidomida como normalizador de los vasos sanguíneos. Sin embargo, teniendo en cuenta la ocurrencia de mucositis durante todo el período de estudio, el tratamiento previo con talidomida redujo la incidencia de Grado 3-4 de mucositis del 44±17% en el grupo Ta- Sec-BNCT a un 38±17% en los animales tratados con Ta+ BPA-BNCT (Figura 35). Esta disminución no alcanzó significancia estadística. Cuando se analizaron los Grados 3 y 4 independientemente, se observó que si bien la incidencia de mucositis Grado 3 en los grupos Ta+ Sec-BNCT y Ta- Sec-BNCT fue similar (38±17% vs. 33±16%), el grupo Ta- Sec-BNCT tuvo una incidencia de un 22±14% de mucositis Grado 4, mientras que ninguno de los animales tratados con Ta+ Sec-BNCT desarrolló mucositis Grado 4 (0±0%). En todos los casos la mucositis revirtió antes del fin del período experimental.

Los animales tratados con Haz Sólo, sin tratamiento previo con talidomida, alcanzaron Grado 2 de muositis, mientras que los tratados con Ta+ Sec-HS no superaron el Grado 1.

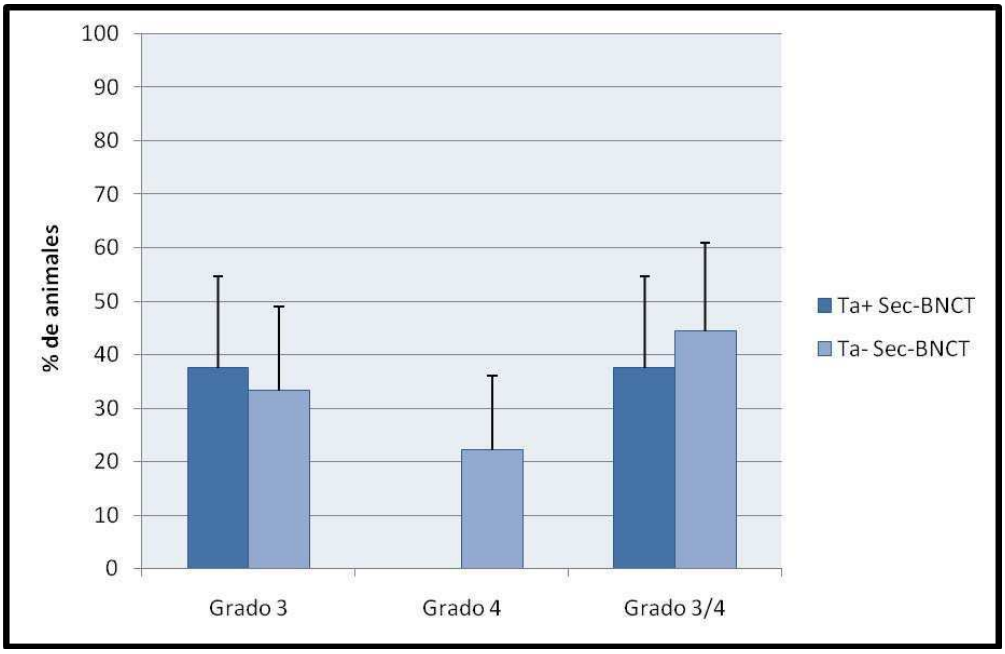


Figura 35 – Gráfico de porcentaje (%±EE) de animales que alcanzaron grado 3 ó 4 de mucositis para los protocolos de BNCT estudiados en este capítulo

En la figura 36 se muestra, a modo de ejemplo, una de las bolsas cancerizadas antes del tratamiento con Ta+ Sec-BNCT, y 28 días después del mismo. Además de la remisión completa de los tumores iniciales, puede observarse que la mucositis que alcanzó un pico a los 14 días después del tratamiento revirtió completamente al finalizar el período de seguimiento.

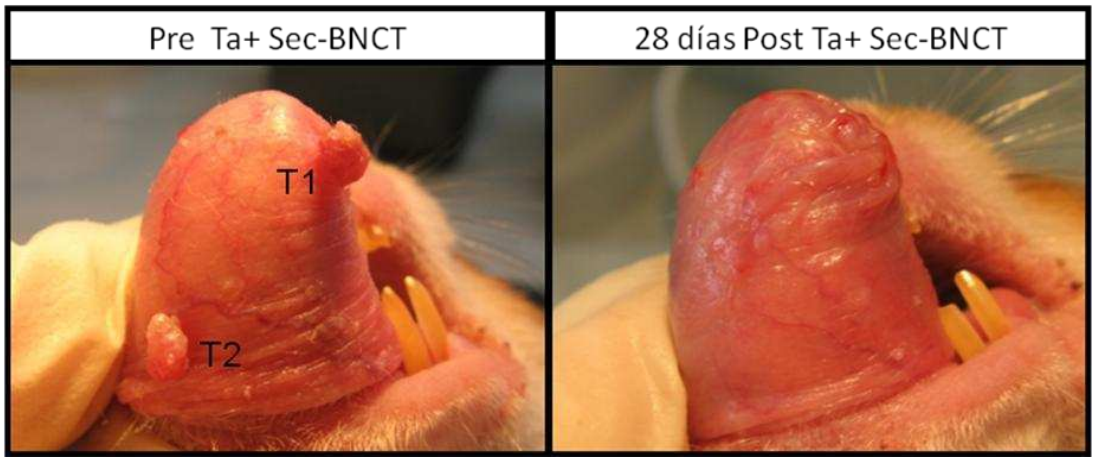


Figura 36 – Ejemplo de una bolsa cancerizada (exhibiendo 2 tumores) antes del tratamiento con Ta+ Sec-BNCT y al finalizarlo.

Conjuntamente, el análisis histológico de esa misma bolsa, a los 28 días después del tratamiento con Ta+ Sec-BNCT, reveló que en la región del tumor 1 (señalizado como T1 en la figura 36), que estaba cercano al fondo de la bolsa, queda solo como remanente una zona cicatrizal mostrando abundante tejido fibroso-hialino rodeado de tejido de granulación con abundante presencia de macrófagos fagocitando hemosiderina, que disocia los fascículos de la capa muscular (Figura 37). El epitelio es de características normales con algunas zonas hiperplásicas, pero sin presencia de células tumorales.

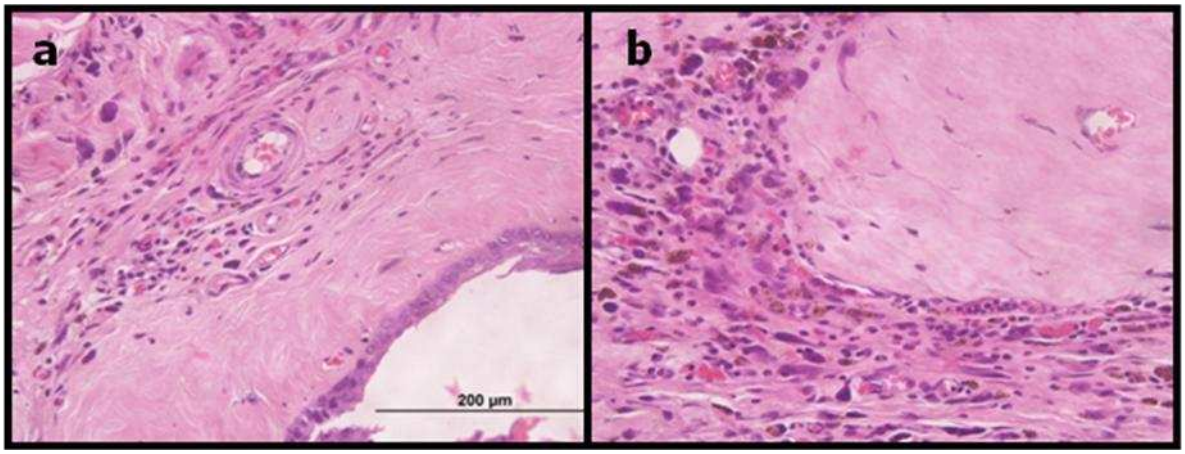


Figura 37 – Imágenes de microscopía óptica (40x), de cortes histológicos coloreados con hematoxilina y eosina, de una bolsa tratada con Ta+ Sec-BNCT luego de 28 días del tratamiento. a) zona en la que se observa abundante tejido fibroso-hialino por debajo del epitelio. b) la fibrosis se diferencia a partir de un tejido de granulación con abundante presencia de macrófagos fagocitando hemosiderina.

En otras zonas de la bolsa, más cercanas al tumor 2 (indicado como T2 en la figura 36) que se encontraba hacia la zona de la comisura, no se observó fibrohialinosis, y el epitelio presentó las características típicas del tejido potencialmente maligno (con zonas NUMF, y algunas hiperplasias) (Figura 38).

Figura 38 – Imagen de microscopía óptica (20x), de corte histológico coloreado con hematoxilina y eosina, de una bolsa tratada con Ta+ Sec-BNCT luego de 28 días del tratamiento. Epitelio con características típicas del tejido con PMD. Se observa transición entre NUMF e hiperplasia.

En las bolsas normales contralaterales, blindadas durante la irradiación, no se observaron signos de toxicidad a nivel macroscópico ni microscópico para cualquiera de los protocolos utilizados. Además, el estado de salud de todos los animales tratados, no presentó cambios relevantes a lo largo del seguimiento. El peso corporal de los hámsteres del grupo Ta+ Sec-BNCT y del grupo Ta+ Sec-HS, al igual que el de los grupos Ta- Sec-BNCT y Ta- Sec-HS (Capítulo 1), osciló levemente durante el período posterior al tratamiento. En los grupos tratados con talidomida las variaciones (de ganancia o pérdida) fueron, en promedio, de un 5% del peso inicial (Figura 39).

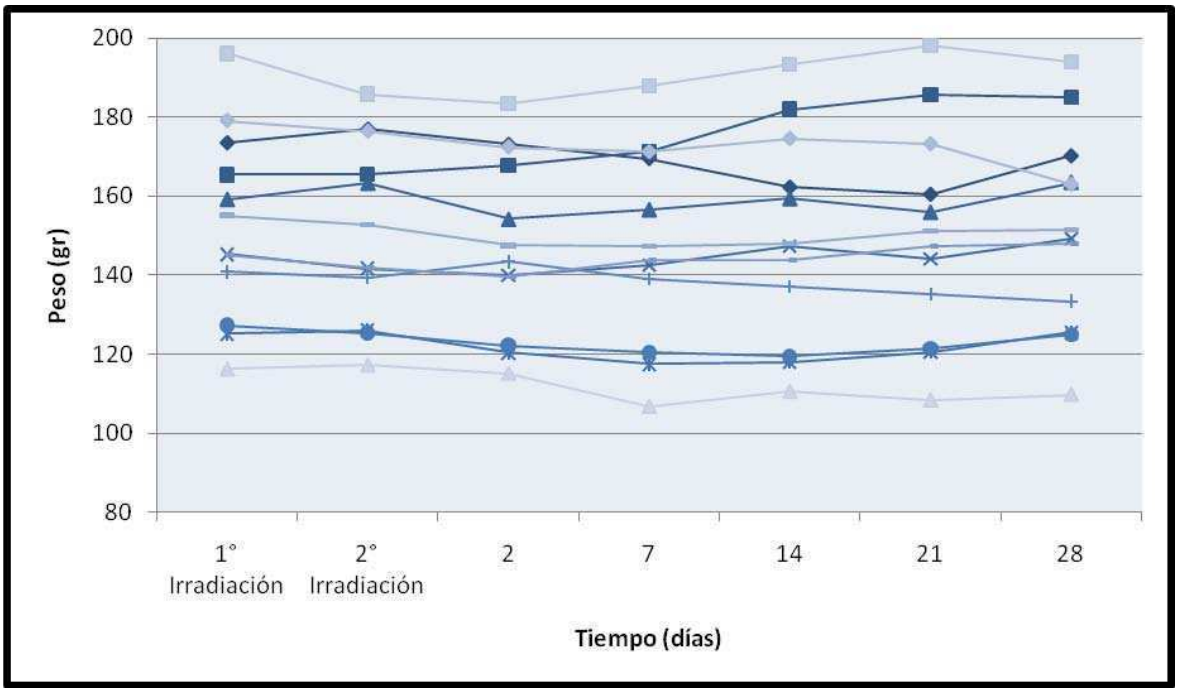


Figura 39 – Curvas de peso de cada uno de los hámsteres tratados con Ta+ Sec-BNCT y Ta+ Sec-HS en función del tiempo.

3. Discusión

Habiendo demostrado la eficacia terapéutica del BNCT secuencial sin exceder la tolerancia del tejido premaligno, y habiendo aumentado el éxito terapéutico del BPA-BNCT mediante el uso de una técnica de normalización de los vasos sanguíneos tumorales (reduciendo los efectos radiotóxicos), decidimos combinar amabas modalidades. Como se desarrolló en el Capítulo 1, el BNCT secuencial involucra la aplicación de BNCT mediado por BPA seguida de BNCT mediado por GB-10 luego de 24 ó 48 horas. Habiendo encontrado que ambos protocolos secuenciales de BNCT presentan una respuesta tumoral total (RTT) similar de 91-95%, elegimos trabajar con 48 horas de diferencia entre ambas aplicaciones.

Si bien estudios previos realizados en nuestro laboratorio pudieron demostrar inequívocamente que el GB-10-BNCT actúa mediante la destrucción de los vasos sanguíneos tumorales en el RA-6 del Centro Atómico Bariloche (Trivillin VA et al., 2006), aún no hemos podido concluir lo mismo para el RA-3 del Centro Atómico Ezeiza donde se llevaron a cabo todas las irradiaciones de esta tesis. Hasta el momento todos los estudios realizados con este propósito no resultaron

concluyentes, pero asumiendo la posibilidad que se repita el mismo mecanismo de acción observado en el RA-6, con esta nueva estrategia se estaría aprovechando la ventaja de normalizar los vasos sanguíneos tumorales para mejorar la entrega de un compuesto de transporte activo (BPA) y dejar revertir el proceso para que el GB-10 continúe actuando de su modo usual.

Este estudio demostró una potenciación en el éxito terapéutico cuando se utiliza la normalización de los vasos sanguíneos tumorales con talidomida antes del tratamiento con BNCT secuencial, produciendo una respuesta tumoral total (100±0%) nunca antes lograda, sin causar mucositis adicional en el tejido premaligno limitante de dosis. Asimismo, demostró una ventaja estadísticamente significativa en la respuesta completa (87±4% para Ta+ Sec-BNCT vs. 68±5% para Ta- Sec-BNCT). Respecto a los efectos radiotóxicos, todos los protocolos indujeron mucositis reversible en el tejido premaligno. Sin embargo, ninguno de los animales tratados previamente con talidomida alcanzaron grado 4 de mucositis, mientras que el 22±14% de los animales que no fueron previamente expuestos al protocolo de normalización desarrolló mucositis Grado 4. Si bien el porcentaje de animales que alcanzó grado 3 de mucositis fue similar en ambas modalidades, fue ligeramente mayor en los animales tratados con talidomida (38±17 vs. 33±16). Aunque ninguna de estas diferencias alcanzó significancia estadística, el hecho de no superar el grado 3 de mucositis presenta una clara tendencia a favor del tratamiento previo con talidomida.

Los protocolos fueron igualados en términos de fluencia, por lo que la dosis absorbida total a tumor resultó ser diferente. El tratamiento de normalización de los vasos tumorales con talidomida induce una reducción en la concentración global de boro en tumor, y por tal motivo la dosis boro y la dosis total a tumor resultan ser menores que para el BNCT secuencial convencional. Esta diferencia estaría indicando una mayor ventaja de la modalidad Ta+ Sec-BNCT sobre Ta- Sec-BNCT, ya que en términos de efectividad terapéutica se obtuvieron mejores resultados a menor dosis. Todo protocolo que maximice los efectos terapéuticos minimizando las dosis empleadas y/o sus efectos adversos presentará una ventaja respecto de otras modalidades de tratamiento.

Las determinaciones de valores globales de la concentración de boro por ICP-MS en muestras de tejido de animales inyectados con GB-10 no mostraron diferencias entre el grupo tratado previamente con talidomida y BPA-BNCT y el grupo tratado previamente con BPA-BNCT solamente. Por tal motivo, así como para el grupo Ta- Sec-BNCT, se llevó a cabo un estudio cualitativo por autorradiografía neutrónica de las bolsas tratadas con Ta+ Sec-BNCT, con el objetivo de determinar posibles cambios en la microdistribución del boro en el segundo ciclo de BNCT por los cambios generados en el microambiente tumoral luego del primer ciclo de la terapia. Este análisis se desarrolla en detalle en el Capítulo 4.

La potenciación del éxito terapéutico del BNCT secuencial tratado previamente con talidomida, podría atribuirse directamente a los efectos de normalización logrados antes de la administración de BPA. La eficacia de las terapias anti-angiogénicas depende del tiempo y dosis de administración. Modificando los vasos tumorales con una determinada dosis de algún inhibidor de VEGF puede incrementarse la entrega de drogas y oxigenación al tumor, lo que se conoce como ventana de normalización (Fukumura D and Jain RK, 2007). Habiendo desarrollado esta técnica para el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster hemos demostrado que su implementación mejora el control tumoral del BPA-BNCT, y ahora demostramos también, que su utilización antes del BNCT secuencial logra controlar, completa o parcialmente, la totalidad de los tumores. Sin embargo, como se describe en el próximo capítulo, existe un cambio en la microbistribución del GB-10 luego del tratamiento con talidomida y primer ciclo de BNCT que le estaría aportando una ventaja adicional a la combinación del tratamiento de normalización de los vasos sanguíneos con el BNCT secuencial. Si bien este cambio se refleja en una mayor homogeneidad en la distribución del GB-10 en tumor y en el tejido premaligno, no se mostró en el tejido normal. Por lo tanto, podría inferirse que la talidomida tendría un efecto sobre la distribución del GB-10. Como hemos discutido en el capítulo 1, la irradiación con BPA-BNCT podría inducir una disminución en la IFP y mejorar la entrega del GB-10. Por este motivo, la normalización previa al BNCT secuencial podría estar potenciando la reducción de la IFP generada por el primer ciclo de BNCT, ya que es sabido que la

normalización vascular disminuye la IFP y aumenta la oxigenación dentro del tumor (Jain RK, 2005). Asimismo, la reducción en la severidad de la mucositis alcanzada en el tejido premaligno limitante de dosis, luego del tratamiento con Ta+ Sec-BNCT, podría atribuirse a los efectos anti-inflamatorios de la talidomida (Lima V et al., 2005).

La búsqueda de una nueva estrategia para BNCT que incremente el control tumoral sin costos extras en términos de mucositis es particularmente relevante en el contexto de los ensayos clínicos realizados recientemente para cáncer recurrente de cabeza y cuello. Éstos mostraron controles tumorales alentadores pero asociados a mucositis limitante de dosis (Kankaanranta L et al., 2007; Kankaanranta L et al., 2012). Aquí, podemos concluir que el BNCT secuencial tratado previamente con talidomida podría ser una modalidad clínica prometedora para cáncer de cabeza y cuello, ya que induce una respuesta (completa + parcial) en el 100% de los tumores, sin incrementar la toxicidad en el tejido premaligno limitante de dosis. Además, esta nueva modalidad posee la ventaja adicional de emplear compuestos que ya están aprobados para el uso humano por la FDA (BPA, GB-10 y talidomida).

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS POR AUTORRADIOGRAFÍA NEUTRÓNICA

1. Introducción

Al considerar un tratamiento de BNCT, es fundamental que las células tumorales capten ^{10}B en forma preferencial. De esta forma, el tejido sano no se dañará ostensiblemente por la irradiación con neutrones térmicos. El efecto final del tratamiento depende fuertemente de la concentración de boro en tumor, relativa al tejido circundante (Coderre JA and Morris GM, 1999). Por ello, para lograr una implementación clínica exitosa de BNCT, uno de los mayores desafíos es cuantificar la concentración en tejidos de los agentes borados administrados al paciente. El conocimiento de la distribución de ^{10}B en tumor, tejido circundante y tejidos de referencia (como sangre, riñón o hígado) a lo largo del tiempo, tiene mucha importancia en la planificación del tratamiento para lograr una adecuada sincronización con la irradiación y calcular correctamente la dosis de radiación a prescribir. El tiempo ideal desde la infusión de boro hasta la irradiación es aquel en el que los cocientes de las concentraciones tumor:sangre o tumor:tejido normal son máximos, teniendo también en cuenta que la baja concentración absoluta en el tejido normal vecino a las células tumorales es un parámetro esencial para preservar el tejido sano. Asimismo, la concentración absoluta de boro en tumor debe ser suficiente para dar lugar a un número de reacciones de captura que resulte letal para la célula tumoral (Coderre JA et al., 2003).

El análisis para determinar la concentración en las muestras biológicas se basa en la cuantificación de alguno de los elementos que intervienen en la reacción de captura neutrónica de boro, por lo que tanto el ^{10}B como las partículas alfa y litio y los rayos gamma son utilizados por las diferentes técnicas de medición. Entre las posibles metodologías, aquellas que se basan en las propiedades atómicas de los elementos transportadores de boro son útiles para una cuantificación elemental, pero no pueden discriminar entre los isótopos ^{10}B y ^{11}B. Otras utilizan los productos de la reacción nuclear para medir la concentración y distribución espacial exclusivamente de ^{10}B, ya sea en sangre, en tejido e incluso a nivel celular. En este caso, es necesario contar con una fuente de neutrones

térmicos apropiada, que puede ser proporcionada por un reactor nuclear. Este requerimiento limita la posibilidad de utilizar estas técnicas sólo a los centros que cuentan con dichas instalaciones. También existen otras metodologías que, además de medir el isótopo ^{10}B, buscan distinguir entre las diferentes especies moleculares y estudiar el comportamiento farmacológico de las drogas utilizadas para BNCT. La mayoría de las técnicas requieren la extracción de una muestra de sangre y/o tejido del paciente, aunque no todas implican la destrucción del material (Wittig A et al., 2008). Se recomienda utilizar dos métodos independientes para el estudio de la concentración y distribución de boro a nivel macroscópico y microscópico, a fin de evitar errores sistemáticos. Un análisis preliminar de la concentración de boro en muestras biológicas puede complementarse con técnicas de imágenes, a fin de extraer información para avanzar en las investigaciones preclínicas y clínicas, por ejemplo la localización de boro en determinados órganos o tejidos (Probst TU, 1999).

Las técnicas más utilizadas para la medición de ^{10}B en BNCT son: el análisis por activación neutrónica de radiación gamma instantánea o prompt gamma (PGNAA), la espectrometría por plasma acoplado inductivamente tanto de emisión óptica como de masas (ICP-OES e ICP-MS) y la espectrometría alfa (α-spectrometry). El PGNAA se basa en el estudio espectroscópico de la radiación gamma emitida en el 94% de las reacciones de captura, cuando el ^{7}Li queda en un estado excitado y decae emitiendo un rayo gamma de 478 keV. Es un método rápido para medir la concentración media de ^{10}B en muestras macroscópicas (gramos), que utiliza el flujo de neutrones provenientes de un reactor nuclear. La preparación de muestras es simple y el método de medición está automatizado; la resolución es del orden de 1 ppm. Este método comenzó a desarrollarse para el análisis de ^{10}B en el Brookhaven National Laboratory (Fairchild RG et al., 1986) y es ampliamente utilizado en aplicaciones de BNCT (Nievaart S et al., 2009; Wittig A et al., 2008). La técnica de ICP-OES utiliza un plasma como medio de atomización de la muestra, con el objeto de producir átomos excitados que emiten radiación cuando vuelven a su estado fundamental. Estas emisiones se producen a una longitud de onda característica de un elemento en particular y se registran en un detector. La intensidad es proporcional a la concentración del elemento emisor.

El método de ICP-OES es confiable y, además, uno de los más rápidos para determinaciones de boro durante los tratamientos (Laakso J et al., 2001). Asimismo, la técnica de ICP-MS utiliza el plasma como fuente de ionización de la muestra y el espectrómetro de masas como método para la separación y detección de iones. Es de gran sensibilidad y permite la determinación de concentraciones a nivel de una parte por billón, con una gran precisión. Además, permite cuantificar los isótopos de un dado elemento por separado. Por lo tanto, las concentraciones de ^{10}B y ^{11}B pueden determinarse en forma directa, a diferencia del ICP-OES, donde se registra la totalidad del boro de la muestra. La técnica de ICP-MS se ha utilizado para la determinación de boro en diversos tejidos y fluidos corporales, con una precisión del orden de las décimas de ppm (Bellato ACS et al., 2004). La espectrometría alfa es actualmente utilizada en Italia por un grupo de la Universidad de Pavía (bajo la dirección del Dr. Saverio Altieri), para la determinación de la concentración media de ^{10}B. Está basada en la espectrometría de partículas cargadas que son liberadas en la reacción de captura (Roveda L et al., 2004). Se coloca un corte por congelación de tejido sobre un disco de MYLAR (tereftalato de polietileno), que es ubicado frente a un detector de silicio en vacío. La muestra se irradia con neutrones térmicos provenientes de la columna térmica de un reactor nuclear y las partículas emitidas por el boro contenido en la muestra son registradas por el detector. Su espectro de energía es estudiado con un analizador multicanal. Los protones de la reacción de captura del nitrógeno son también detectados pero, dado que los espectros pueden diferenciarse, esto no constituye un problema. La espectrometría alfa ha sido descripta con gran detalle por Silva Bortolussi (2007) y se ha utilizado en trabajos en colaboración con nuestro grupo (Bortolussi et al., 2010).

Todas las técnicas mencionadas hasta el momento son capaces de determinar la concentración de ^{10}B en forma global. Pero dado que la concentración de boro varía en cada tipo de tejido debido a diferencias metabólicas y estructurales, el valor medido sobre toda la muestra puede diferir dependiendo de las diferentes poblaciones que componen el tumor (por ejemplo tejido necrótico o viable). A los efectos de evaluar la incorporación de compuestos borados en el tejido, es necesario determinar no sólo la concentración global del

boro sino su distribución espacial, e incluso su concentración local en el mismo. Además, es sabido que la arquitectura de un tumor sólido es muy diferente a la de un tejido sano, con una vasculatura caótica, vasos desproporcionadamente grandes y regiones no irrigadas o con flujo nulo, alta presión intersticial y elevado metabolismo (Jain RK, 1998). Esto hace que la entrega de sustancias a un tumor por vía intravenosa se vea comprometida y su distribución sea altamente inhomogénea. Por lo tanto, el conocimiento de la distribución espacial de ^{10}B es fundamental para la optimización de los protocolos de BNCT. Para contribuir a la comprensión de los mecanismos involucrados en la captación de los compuestos borados, se ha establecido la potencialidad de las diferentes aproximaciones de la autorradiografía neutrónica entre otras técnicas (Portu AM et al., 2011a).

Una autorradiografía es una imagen obtenida sobre un material sensible al ser puesto en contacto con una muestra que contiene un elemento emisor de algún tipo de radiación. Ésta impresiona el material y revela así su distribución en la muestra. Los detectores de trazas nucleares de estado sólido (Solid State Nuclear Track Detectors, SSNTDs) pueden utilizarse para registrar trazas inducidas por neutrones, y una de sus aplicaciones más sobresalientes es el mapeo de estos elementos emisores de partículas. En particular, pueden emplearse para determinar la distribución local de átomos de ^{10}B en diferentes materiales (Armijo JS y Rosenbaum HS, 1967), siendo de particular interés las muestras de tejidos de pacientes de BNCT (ej: Altieri S et al., 2004). En este caso las partículas que potencialmente generarían trazas son los productos de la reacción de captura (las partículas α y los iones ^{7}Li de retroceso) al irradiarse un tejido que contiene ^{10}B con neutrones térmicos. En el marco de la Terapia por Captura Neutrónica de Boro, la aplicación de la autorradiografía inducida por neutrones fue utilizada por primera vez por Fairchild (Fairchild RG et al., 1986) unos años después que Fleischer y colaboradores describieran la posibilidad de detectar partículas cargadas en mica, sin registrar neutrones o radiación gamma (Fleischer RL et al., 1975).

Existe una gran variedad de materiales orgánicos e inorgánicos que tienen la capacidad de ser detectores de trazas nucleares. Si bien no serán abordados en esta tesis, los inorgánicos incluyen la mica y el óxido de silicio entre otros. Dentro

de la familia de los polímeros, son varios los que se han utilizado y caracterizado para la detección de partículas, como el tereftalato de polietileno y el policarbonato. El polialildiglicol carbonato (PADC, cuya marca comercial más conocida es CR39), ha sido el más utilizado en los desarrollos y aplicación de la técnica de autorradiografía para BNCT (ej: Altieri S et al., 2008). Tiene buenas propiedades para discriminar partículas y una gran sensibilidad. Además, el material puede pretratarse, atacándolo químicamente, con el objeto de aumentar su sensibilidad (Petterson OA et al., 1992). Sin embargo, en trabajos más recientes realizados en los laboratorios de la CNEA se ha mostrado que el policarbonato reúne condiciones óptimas para revelar el daño producido por las partículas emitidas en la reacción de captura para el desarrollo de la autorradiografía, por lo cual el policabonato Lexan™ fue elegido como material detector en lugar del PADC (Portu AM et al., 2011a; Saint Martin G et al., 2011). Con las condiciones de irradiación, procesamiento químico y visualización de las muestras, se han logrado imágenes claras, sin la contribución de las trazas producidas, por ejemplo, por los protones emitidos en la reacción de captura con el isótopo ^{14}N del nitrógeno (elemento de gran abundancia en tejidos biológicos). El daño que estas partículas producen sobre ciertos detectores de mayor sensibilidad (como PADC) es la principal contribución al fondo. El contar con un fondo bajo permite lograr imágenes más definidas y con mayor contraste, cuando se analizan autorradiografías provenientes de muestras con contenido de boro. Además, otra característica muy conveniente en términos del trabajo en el laboratorio es la simplicidad en el manejo que permiten las láminas de Lexan de 250 µm de espesor. Son muy fáciles de cortar, manipular y limpiar, debido a que son menos quebradizas que otros detectores, como el CR39. Esto permite cortar folias de diferentes formas, de acuerdo a la aplicación de interés.

Dependiendo del flujo de neutrones, la concentración de boro y las condiciones de revelado (etching), las trazas podrán verse lo suficientemente separadas como para permitir un conteo individual y traducirlo a valores de concentración por medio de un sistema de calibración (autorradiografía cuantitativa, AQT). La comparación entre imágenes histológicas y autorradiográficas permite la localización de los átomos de boro en la muestra de

tejido (Gabel D et al., 1987). Más aún, la concentración de ^{10}B en las diferentes regiones de un corte de tejido puede inferirse midiendo la densidad de trazas en el detector. Para cuantificar la concentración de ^{10}B distribuido en cortes histológicos de tejidos a partir de la medición del número de trazas nucleares en SSNTDs, es necesario contar con un sistema de calibración, que requiere de "patrones" o muestras de referencia con concentraciones conocidas de ^{10}B. En 1987, D. Gabel publicó sus sistemas de calibración basados en homogenatos de hígado de pollo con ácido bórico (Gabel D et al., 1987) y en la actualidad se siguen utilizando algunos sistemas de estas características (ej: Gadan MA et al., 2012).

Aumentando el flujo de neutrones y variando las condiciones del revelado, también es posible obtener imágenes autorradiográficas con una gran densidad de trazas, a fin de evaluar en forma cualitativa las diferencias en los niveles de grises, brindando de esta forma información valiosa sobre la distribución espacial de boro (autorradiografía cualitativa, AQL).

En la Argentina, la autorradiografía se desarrolló con el objeto de proveer información acerca de la microdistribución de ^{10}B en tejidos, tanto de pacientes como provenientes de modelos animales. Una vez caracterizados los sistemas de referencia con los que se realizaron las curvas de calibración (que permiten calcular la concentración de boro a partir de la densidad de trazas), éstos comenzaron a aplicarse a distintos modelos biológicos (Portu AM et al., 2011b). Los sistemas de referencia utilizados por Portu y colaboradores fueron SLCs (Small Lexan Cases) y agarosa con ácido bórico. Muchas de estas aplicaciones permitieron comprobar la validez de la metodología, al comparar datos de concentración global de ^{10}B en cortes con datos correspondientes a muestras de tejido arrojados por técnicas analíticas.

Internacionalmente se han utilizado dos secciones de tejido para el análisis autorradiográfico: una para ser irradiada y procesada y otra para el análisis histológico, con el objeto de correlacionar los hallazgos por autorradiografía con la estructura del tejido (ej: Altieri S et al., 2008). Sin embargo, en nuestro país se ha introducido una variante a esta modalidad, proponiéndose la utilización de la misma sección de tejido para un estudio histológico aproximado y para la

generación de la autorradiografía (Portu MA et al., 2011b). De esta forma, la imagen de trazas se compara con la histológica que le dio origen. Esto permite analizar las diferentes regiones del corte histológico en forma más precisa y aumenta la resolución espacial. En el marco de esta tesis se utilizaron ambos tipos de técnicas.

En un estudio de biodistribución, el animal de experimentación (o el paciente) es inyectado con un compuesto borado. Luego de la infusión, debe esperarse un intervalo de tiempo antes de tomar la muestra, con el objeto de permitir que los átomos de ^{10}B alcancen las células tumorales. Este tiempo depende del mecanismo de transporte del compuesto borado y del protocolo de administración entre otras características. Si bien la técnica de autorradiografía neutrónica se describe en profundidad en Materiales y Métodos, aquí, a modo ilustrativo, haremos una breve descripción de la metodología desarrollada en Argentina ya que posee pequeñas variaciones respecto de la utilizada en Italia. Una vez resecado, el tejido se fija inmediatamente en nitrógeno líquido con el objeto de evitar la migración de los átomos de boro de sus sitios originales, permitiendo una evaluación realista de su distribución. Las piezas se seccionan en un criostato y se montan sobre folias de detectores de trazas nucleares que se irradian con neutrones en la facilidad de columna térmica del reactor nuclear RA-3.

De acuerdo al tipo de análisis que se desee realizar, las muestras pueden irradiarse con dos fluencias diferentes: 10^{12} $n.cm^{-2}$ para la cuantificación de ^{10}B (AQT), y 10^{13} $n.cm^{-2}$ para el análisis cualitativo (AQL). Luego de irradiadas y marcadas, se eligen las folias que se desean procesar y se colorean con hematoxilina y eosina. Pudo comprobarse que el detector no se altera, aunque la sección quede coloreada en forma permanente. Las trazas latentes no se ven afectadas por este proceso. La sección de tejido se fotografía con bajo aumento, con el objeto de obtener imágenes de la totalidad del corte. También se realiza una exploración del corte, utilizando el sistema de coordenadas y fotografiando regiones específicas con mayor aumento. Luego, se remueve el tejido y se revelan las trazas. Las muestras para AQT se atacan químicamente durante 2 min, mientras que las destinadas a AQL, por 6 min, ya que un tiempo de revelado más

prolongado permite una amplificación del diámetro de las trazas, incrementando la superposición y el contraste de la imagen. Las folias se observan y fotografían nuevamente, buscando las zonas delimitadas en el análisis histológico previo. La posición de la folia en la platina del microscopio se reproduce lo más fielmente posible con respecto a la posición en la que se tomaron las primeras fotografías, a fin de capturar el mismo campo y conservar la orientación del corte. Para la cuantificación de ^{10}B (correspondiente a un corte), los valores medios de densidad de trazas se interpolan en las curvas de calibración, obteniendo así la concentración de ^{10}B. En la figura 40 se muestra un esquema que resume el proceso descripto para AQT. Para AQL, los últimos tres pasos se reemplazan por la toma de fotografías (a diferentes aumentos) de la imagen autorradiográfica y su posterior exploración.

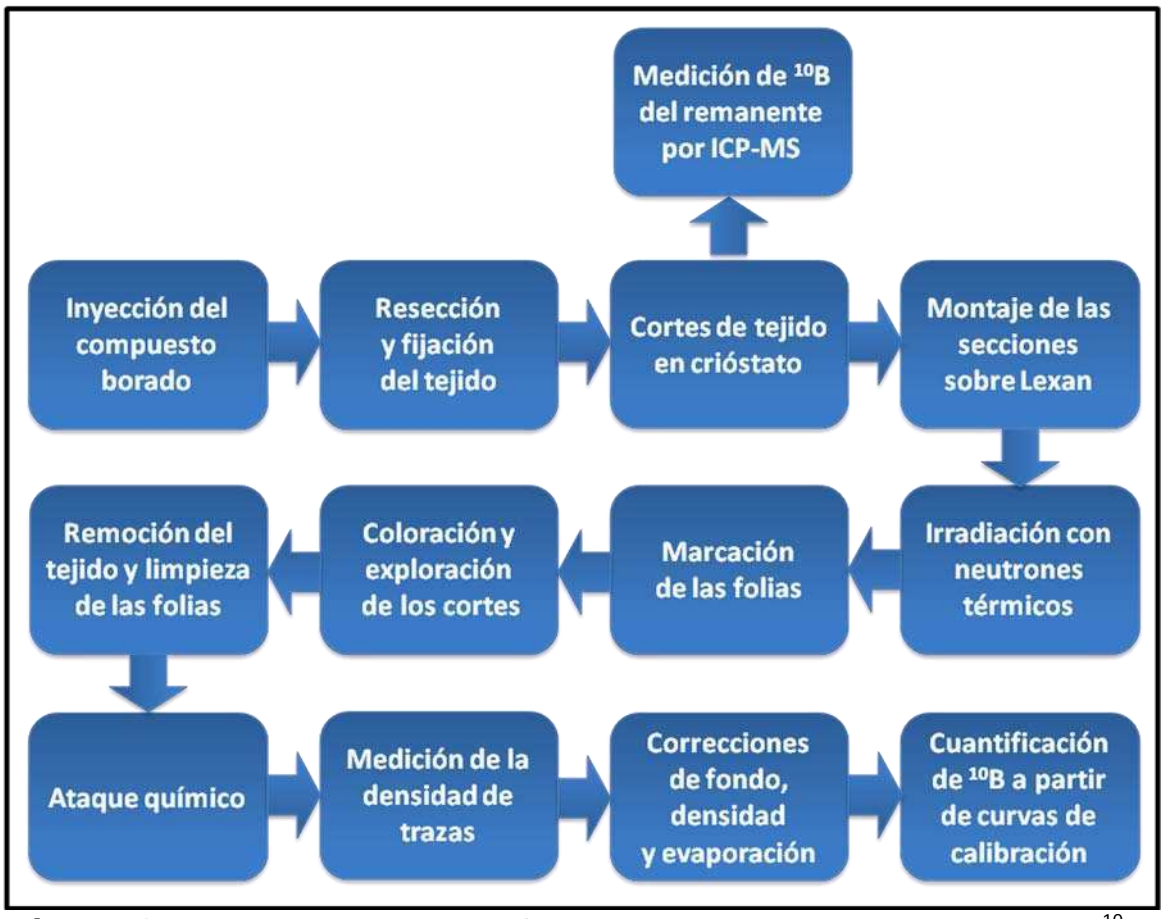


Figura 40 - Esquema de la metodología desarrollada en Argentina para cuantificar ^{10}B por AQT.

2. Resultados

2.1 BNCT secuencial

Como ya se ha mencionado, la aplicación exitosa de BNCT depende fuertemente de la captación tumoral e intratumoral de ^{10}B. Por lo tanto, el conocimiento de la concentración de boro en tumor y tejido circundante, además de tejido normal, es fundamental cuando se considera un protocolo de BNCT. En estudios radiobiológicos anteriores, hemos demostrado el éxito terapéutico de protocolos de BNCT mediado por GB-10, ya sea como único compuesto o en combinación con BPA (Trivillin VA et al., 2006) y, más recientemente (también desarrollado en el marco de esta tesis), en un protocolo de BNCT secuencial en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster. Esta metodología, descripta extensamente en el capítulo 1, implica una primera etapa de BPA-BNCT seguida por GB-10-BNCT luego de 24 ó 48 horas. Si bien no se detectaron cambios significativos en la concentración de ^{10}B medida en forma global por las técnicas de ICP-MS e ICP-OES, la primera aplicación de BPA-BNCT podría alterar considerablemente la distribución de GB-10 para la segunda aplicación. En este contexto se buscó explorar los cambios potenciales en la microdistribución de boro, por medio de la autorradiografía neutrónica, que no pueden ser detectadas por mediciones globales de boro por métodos analíticos.

En este estudio se analizaron muestras provenientes de cuatro grupos de animales: con GB-10 sólo, irradiados con BPA 24 ó 48 hs antes de la inyección del GB-10, y animales sin administración de boro (Figura 41).

Los tumores, el tejido premaligno y el tejido normal, se procesaron como se describió en la sección Materiales y Métodos. Asimismo, los remanentes de las muestras cortadas por crióstato se midieron por ICP-MS.

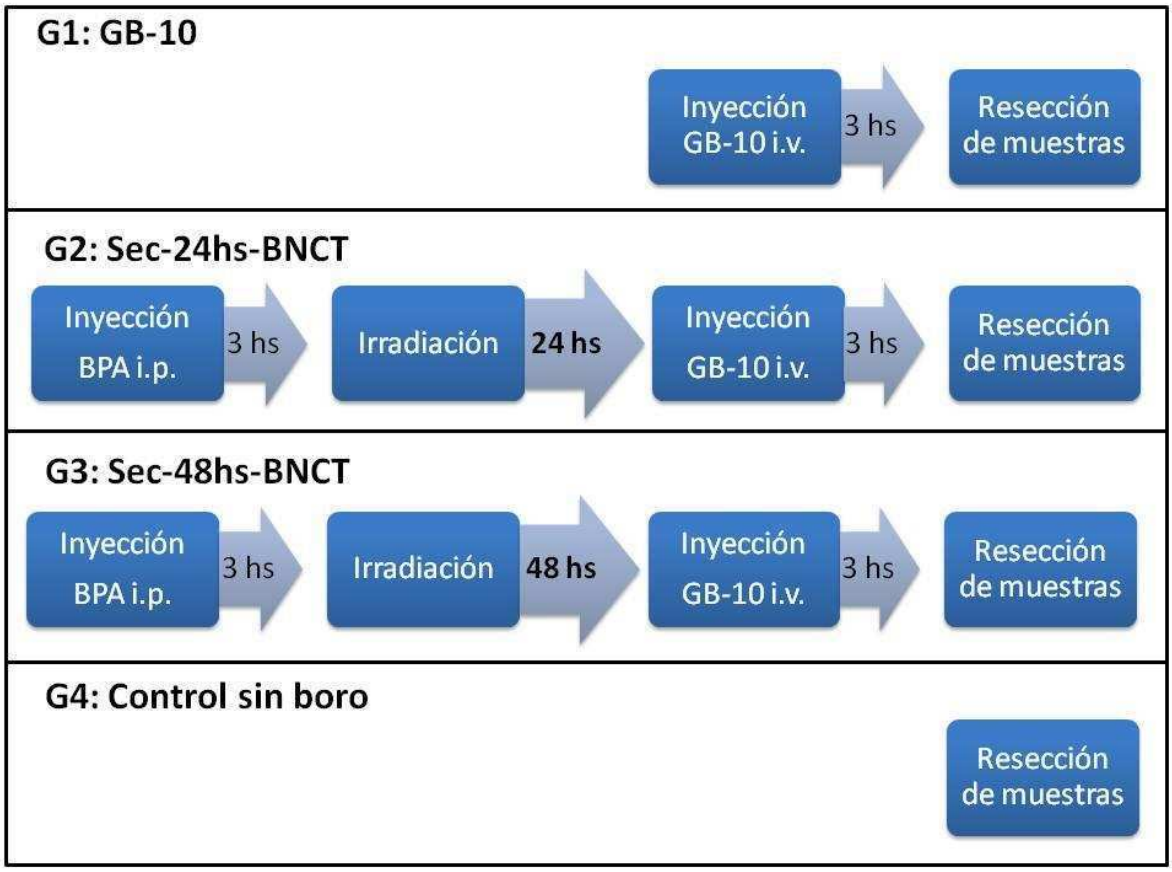


Figura 41 - Resumen de los protocolos estudiados para el primer análisis por AQT y AQL.

En la figura 42 puede observarse un ejemplo de AQL de tumor correspondiente a cada protocolo. Las autorradiografías correspondientes al G4 (control sin boro) presentan un número muy reducido de trazas, indicando la ausencia de contaminación de boro durante la manipulación de la muestra. Los otros tres grupos presentan una densidad de trazas considerablemente mayor. Además, las trazas están distribuidas heterogéneamente, variando con las diferentes estructuras histológicas.

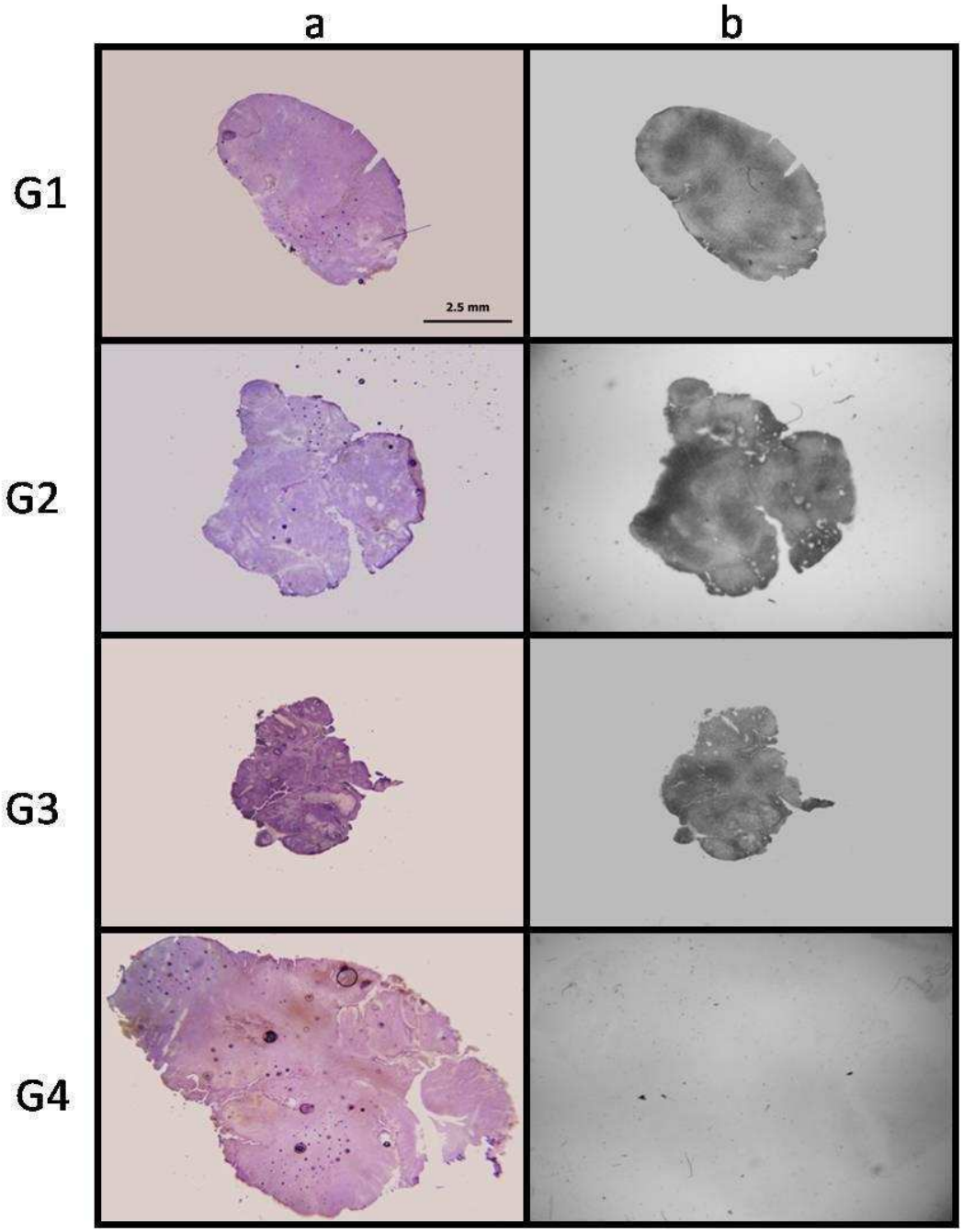


Figura 42 - (a) Cortes por criostato de tumor de hámster coloreado con hematoxilina y montado sobre Lexan (1,25x). (b) imagen de AQL correspondiente a (a).
G1: animales inyectados con GB-10 (50 mg ^{10}B/kg p.c.). G2: animales tratados con BPA-BNCT seguido de una inyección de GB-10 (misma dosis que G1, 24 hs post irradiación). G3: ídem G2, pero la inyección de GB-10 48 hs luego de la irradiación. G4: no irradiado, no inyectado.

Con el objeto de verificar la técnica y confirmar que las heterogeneidades corresponden a diferencias de captación, también se analizaron tumores de animales inyectados con BPA, cuya biodistribución es conocida (Kreimann EL et

al., 2001a). La resección del tejido se produjo 3 horas luego de la administración de BPA (15,5 mg ^{10}B/Kg de peso corporal). En la figura 43 puede observarse claramente cómo el compuesto se acumula en forma preferencial en el parénquima (P), en relación al estroma (E), como consecuencia de su transporte activo (Wittig A et al., 2000). De esta forma, la metodología reproduce el comportamiento esperado y las heterogeneidades observadas en los protocolos que se utiliza GB-10 no se deben a errores de la técnica.

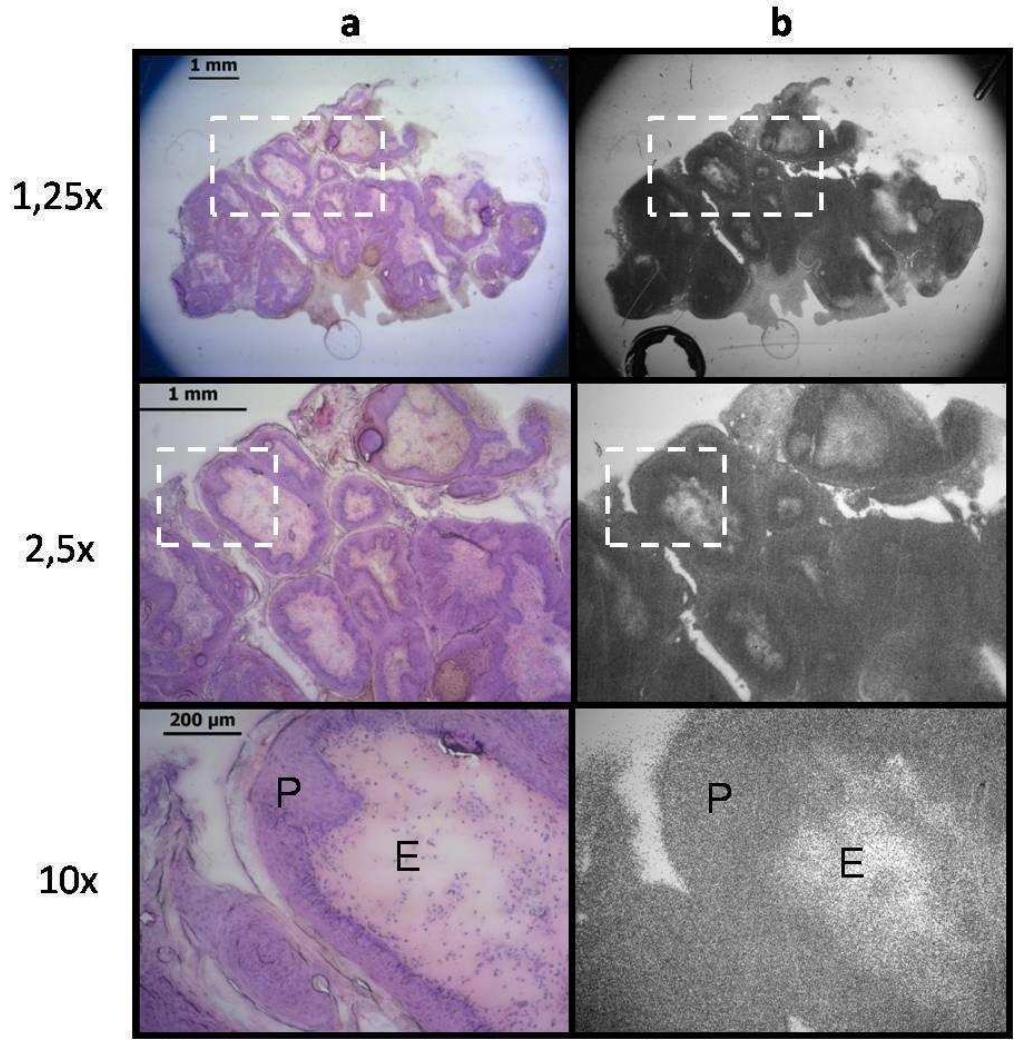


Figura 43 - (a) Ejemplo de un corte por criostato de tumor de un animal inyectado con BPA (15,5 mg^{10}B/kg p.c.), coloreado con hematoxilina y eosina, montado sobre Lexan, a diferentes aumentos (1,25x, 2,5x y 10x). Se indican zonas de parénquima (P) y estroma (E). (b) Imagen de AQL correspondiente a (a).

En contraposición a lo observado para BPA, el análisis cualitativo de los protocolos con GB-10 reveló que la concentración de boro en estroma es mayor que en parénquima. En la figura 44 se encuentra un ejemplo de una muestra de G1 (GB-10 sólo), fotografiada a distintos aumentos. En este caso, la diferencia entre parénquima y estroma es muy marcada. Si bien esta acumulación preferencial en estroma se ilustra para G1, lo mismo se observó para ambos protocolos de BNCT secuencial.

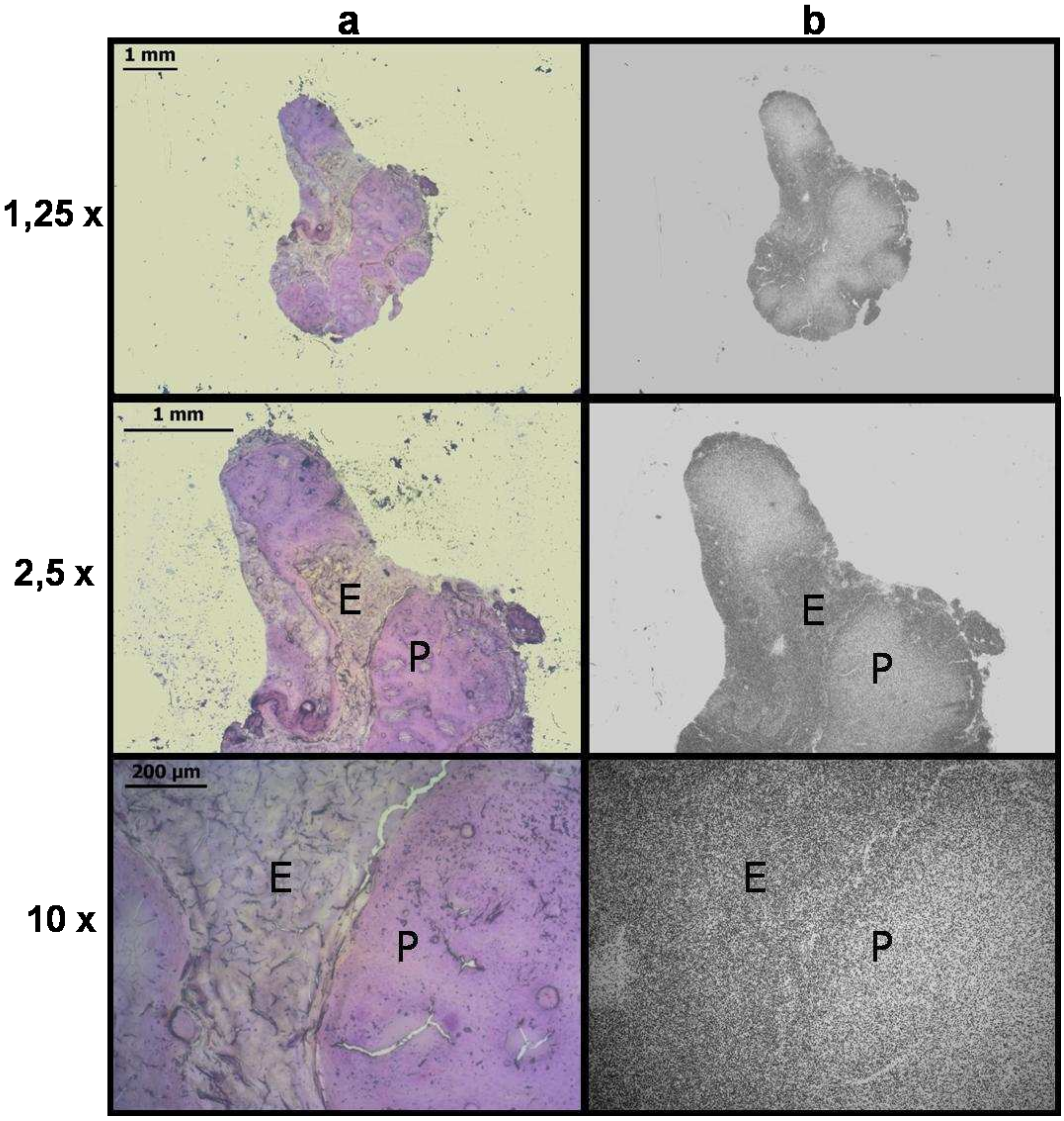
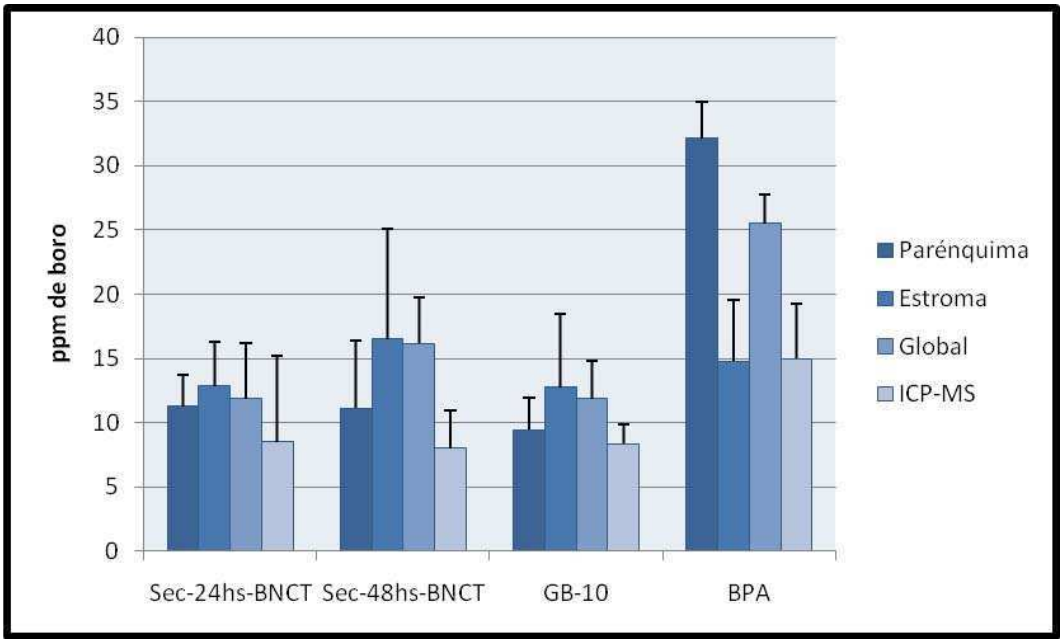


Figura 44 - (a) Corte por criostato de un tumor proveniente del protocolo G1, coloreado con hematoxilina y eosina, a diferentes aumentos (1,25x, 2,5x y 10x). Se indican zonas de parénquima (P) y estroma (E). (b) Imágenes de AQL correspondientes a (a).

Los valores obtenidos por autorradiografía neutrónica cuantitativa (AQT) e ICP-MS para tumor se encuentran representados en la figura 45. Para la AQT se analizaron 3 cortes de cada tejido por animal, evaluando 4 animales por cada protocolo. Además, para cada corte de tumor se cuantificó la densidad de trazas diferencialmente para estoma y parénquima en todos los casos que fue posible delimitar las estructuras. Asimismo, para todos los cortes se calculó la concentración global de boro contando la cantidad de trazas en 50 campos al azar, sin tener en cuenta el tipo de estructura histológica. Luego, se analizaron los promedios de cada protocolo para comparar las mediciones de ambas metodologías.



Figuras 45 - Mediciones de AQT (valor global y de las regiones de interés) e ICP-MS para los tres protocolos de GB-10 analizados y para BPA (ppm± DE).

Las desviaciones estándar son muy altas debido a la variabilidad biológica observada entre animales. Tanto para los protocolos secuenciales como para el de GB-10 sin previa irradiación, la concentración en estroma es mayor que en parénquima. La relación estroma/parénquima (E/P) calculada para Sec-24hs-BNCT es de 1,2, mientras que para Sec-48hs-BNCT y GB-10 sólo es de 1,5. Sin embargo, para BPA la relación E/P es diferente (0,5), lo que respalda el mecanismo de

transporte activo del compuesto. Para todos los protocolos analizados, el valor global de AQT se encuentra entre el de parénquima y el de estroma, representando el significado de la medición global. Si bien el promedio de las mediciones realizadas por ICP-MS no coincide con la medición global por AQT, esta diferencia alcanzó significancia estadística sólo para Sec-48hs-BNCT (p= 0,0186). Adicionalmente, cuando se analizaron los casos individualmente (comparando cada corte para AQT con el valor determinado por ICP-MS del remanente de taco) se encontró que la medida de ICP-MS casi siempre coincide con alguna de las determinaciones por AQT, ya sea la de parénquima, la de estroma o la global. El valor promedio obtenido para G4 (control sin boro) por AQT fue de 1± 0 ppm.

El análisis autorradiográfico cualitativo del tejido precanceroso y normal reveló una gran heterogeneidad en la distribución del GB-10 tanto para los protocolos secuenciales como para el GB-10 sin previa irradiación. En la figura 46 se muestra, a modo de ejemplo, un corte de tejido premaligno para cada protocolo estudiado. El mismo patrón de distribución se observó para el tejido normal de los protocolos G1, G2 y G3. Si bien para G4 (control sin boro) se observó una mayor densidad de trazas que las obtenidas para tumor, esta cantidad es despreciable frente a la observada para los protocolos con GB-10.

Asimismo, con el análisis a mayor aumento de las AQL se estableció que el GB-10 se acumula preferentemente en el tejido conectivo. En la figura 47 se ilustra un ejemplo de G3 (Sec-48hs-BNCT), pero la misma distribución se observó para G1 (GB-10 sólo) y G2 (Sec-24hs-BNCT). En esta oportunidad se muestra, adicionalmente, una foto del corte histológico de 10 µm (por criostato) consecutivo al corte utilizado para la AQL. Si bien las fotos presentadas en la figura 47 corresponden a tejido premaligno, la misma distribución se observó en el tejido normal de G1, G2 y G3.

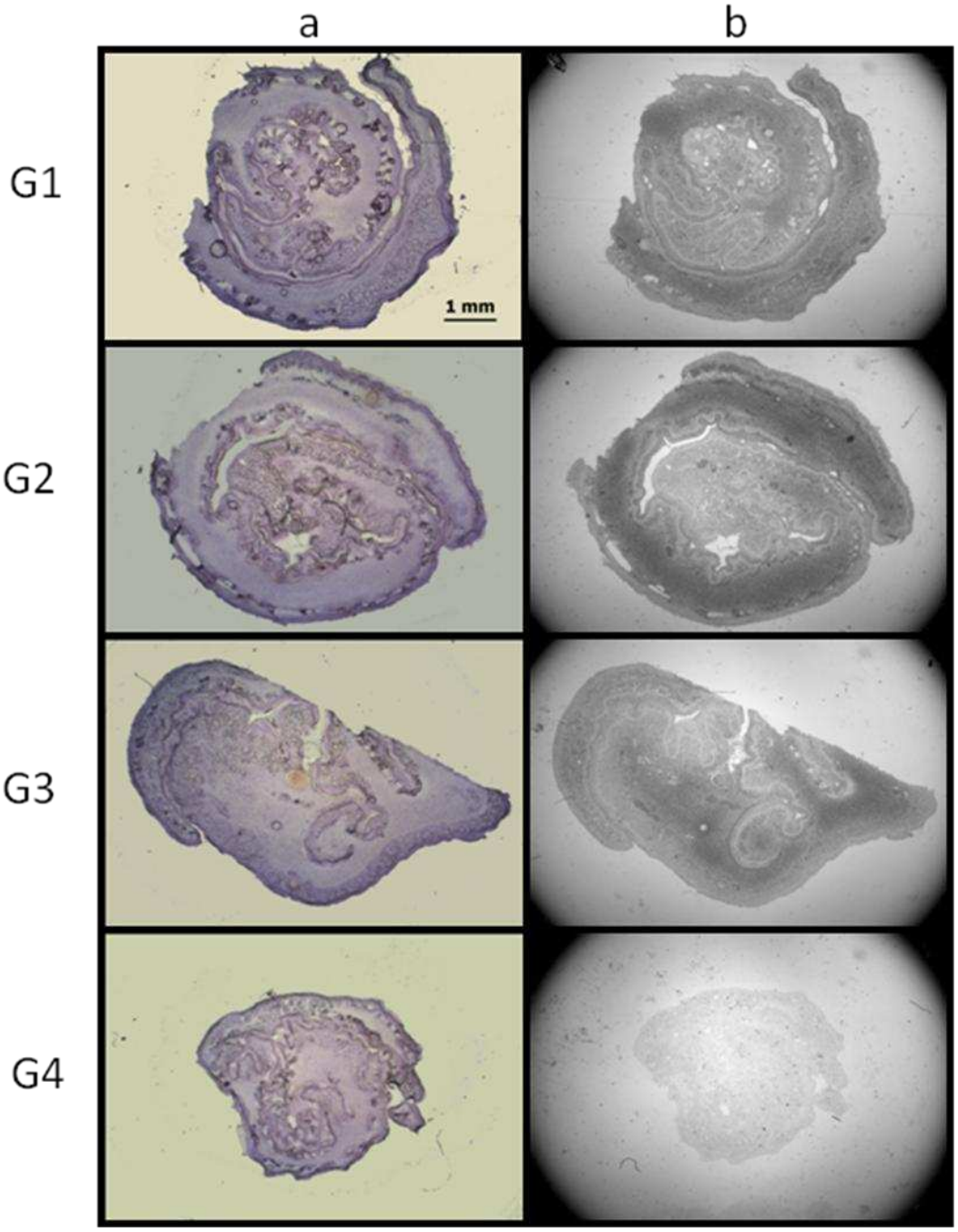


Figura 46 - (a) Cortes por criostato de tejido premaligno de hámster coloreado con hematoxilina y montado sobre Lexan (1,25x). (b) imagen de AQL correspondiente a (a). G1: animales inyectados con GB-10 (50 mg ^{10}B/kg p.c.). G2: animales tratados con BPA-BNCT seguido de una inyección de GB-10 (misma dosis que G1, 24 hs post irradiación). G3: ídem G2, pero la inyección de GB-10 48 hs luego de la irradiación. G4: no irradiado, no inyectado.

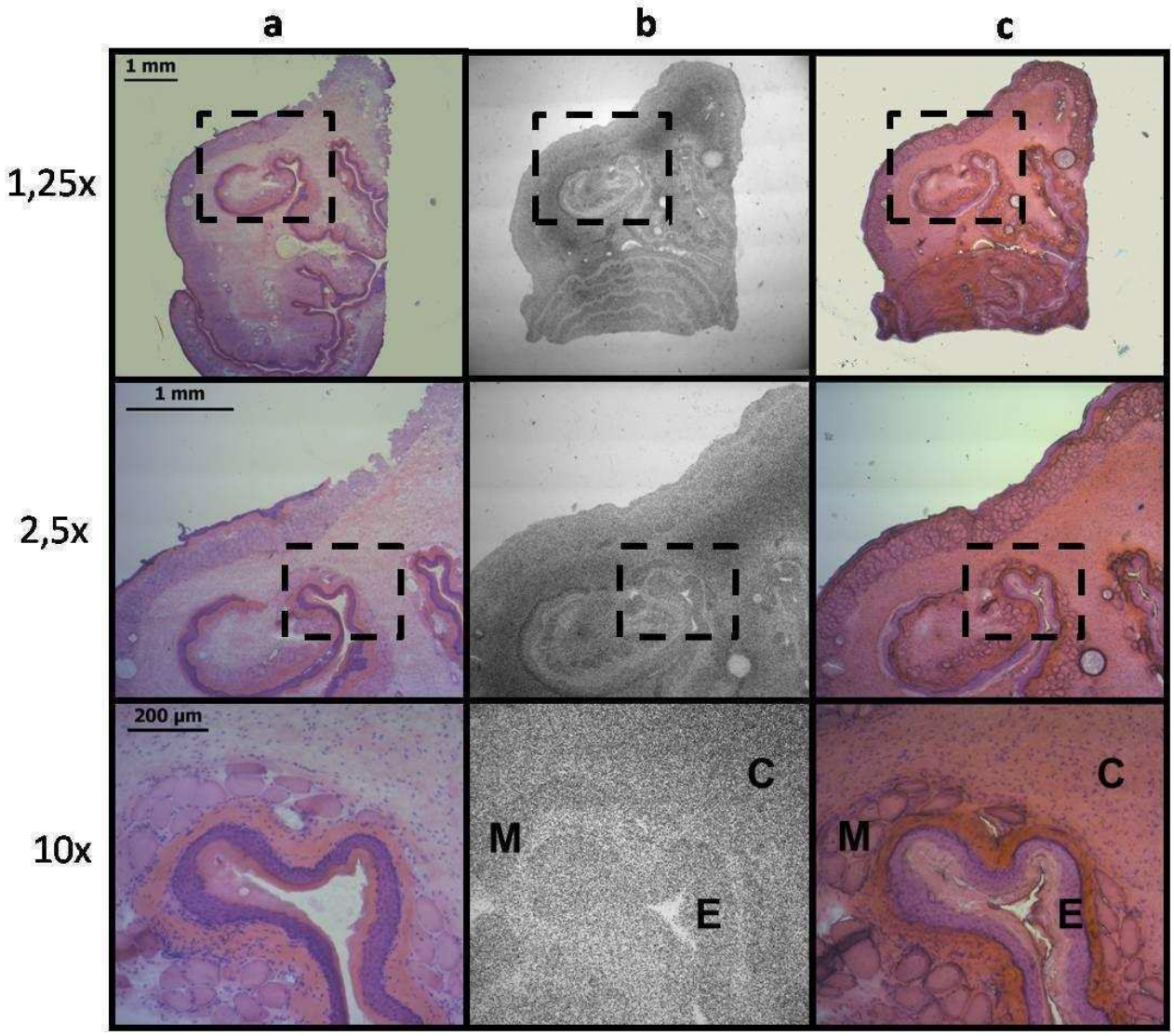


Figura 47 –(a) Corte por criostato (10 µm) de tejido premaligno de hámster tratado con Sec-48hs-BNCT, coloreado con hematoxilina y eosina, montado sobre vidrio. (b) imagen de AQL correspondiente a (c). (c) Cortes por criostato (30 µm) de tejido premaligno de hámster tratado con Sec-48hs-BNCT, coloreado con hematoxilina y eosina, montado sobre Lexan. Se indican zonas de epitelio (E), tejido conectivo (C) y músculo (M).Todos los cortes se muestran en 1,25x, 2,5x y 10x.

Si bien los cortes de los tumores de los animales inyectados con BPA se utilizaron como control de la técnica, por su conocida distribución preferencial dentro del parénquima, aquí se analizó la distribución del compuesto en cortes de tejido precanceroso y normal por primera vez. En la figura 48 se ilustra un ejemplo de AQL para tejido premaligno proveniente de un animal inyectado con BPA, donde puede apreciarse que el boro se acumula preferencialmente en epitelio y músculo.

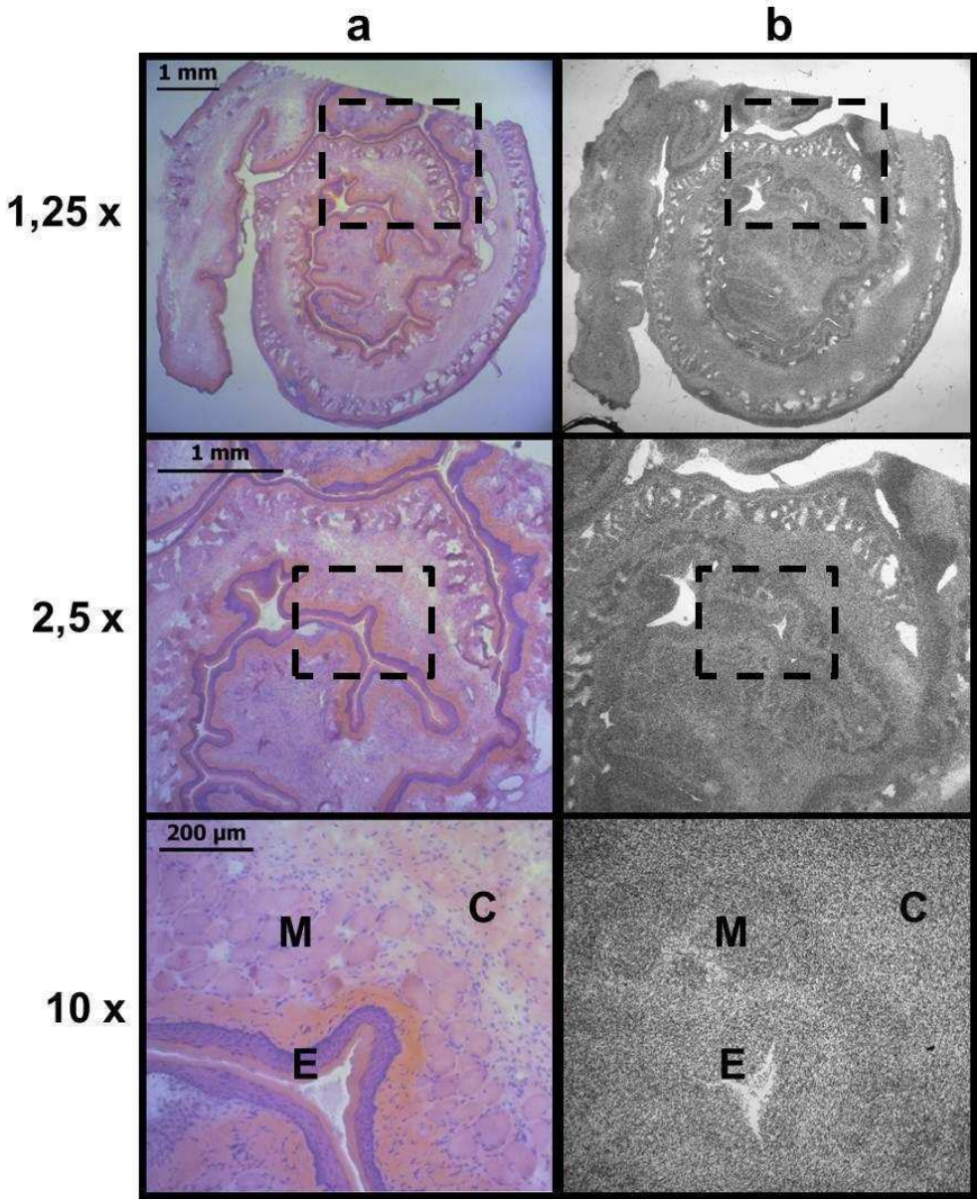


Figura 48 -–(a) Cortes por criostato (10 µm) de tejido premaligno de hámster inyectado con BPA (15,5 mg ^{10}B/kg p.c.), coloreado con hematoxilina y eosina montado sobre vidrio. (b) imagen de AQL correspondiente a un corte consecutivo a (a). Se indican zonas de epitelio (E), tejido conectivo (C) y músculo (M).Todos los cortes se muestran en 1,25x, 2,5x y 10x.

Además, para todos los casos analizados se observó que independientemente del compuesto utilizado, la concentración de boro en el tejido conectivo subyacente al epitelio (tejido conectivo denso) fue menor que la observada en el epitelio. Sin embargo, por las características estructurales de dicho tejido y por su localización dentro del corte, no fue posible cuantificarlo de forma aislada por AQT.

Los valores obtenidos por AQT e ICP-MS para tejido precanceroso se representan en la figura 49. Al igual que para tumor, las AQT se realizaron contando las trazas correspondientes a 3 cortes de cada tejido por animal, y 4 animales por cada protocolo. Además, para cada corte de tejido premaligno y normal se cuantificó la densidad de trazas diferencialmente para epitelio, tejido conectivo (laxo y denso en conjunto, pero mayoritariamente laxo) y músculo en todos los casos que fue posible delimitar las estructuras. Además, para todos los cortes se calculó la concentración global de boro. Luego, se analizaron los promedios de cada protocolo para comparar las mediciones de ambas metodologías.

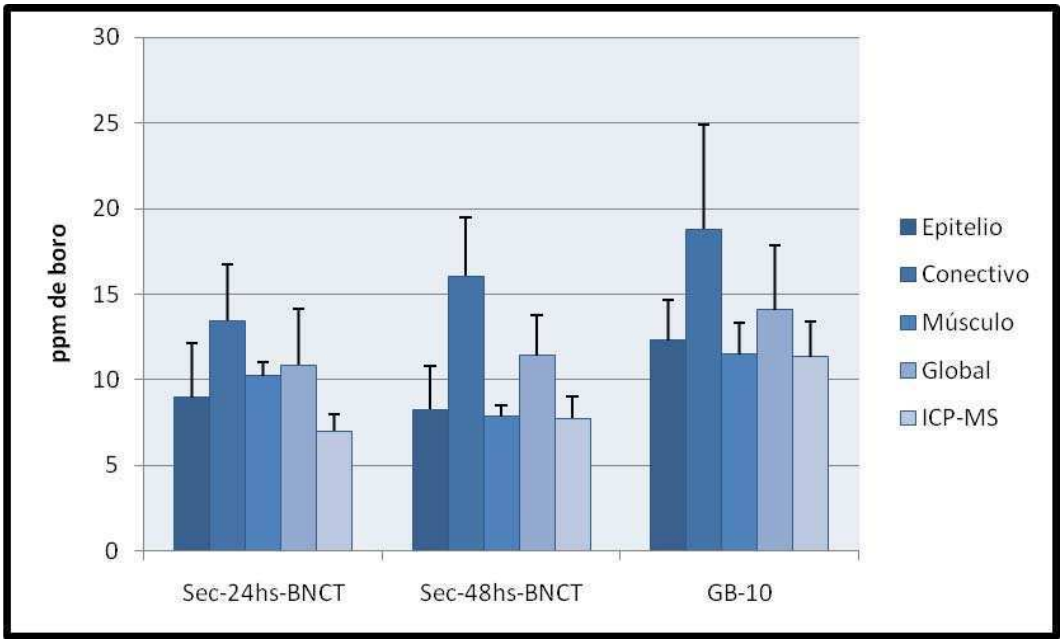


Figura 49 - Mediciones de AQT e ICP-MS para las diferentes estructuras tisulares del tejido premaligno para los tres protocolos analizados (ppm± DE).

Tanto para G1, G2 y G3 la concentración de ^{10}B, en el tejido premaligno, fue mayor para tejido conectivo que para epitelio y músculo (que mostraron valores similares). Asimismo, el valor global determinado por AQT se encuentra entre el valor de epitelio y tejido conectivo. Las mediciones por ICP-MS resultaron, al igual que para tumor, menores que las determinadas por AQT global, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas excepto para Sec-48hs-BNCT

(p= 0,0364). El valor promedio obtenido para G4 (control sin boro) por AQT fue de 1± 2 ppm.

Para el tejido normal se utilizó la misma metodología que para el tejido precanceroso. Los resultados de AQT e ICP-MS se presentan en la figura 50.

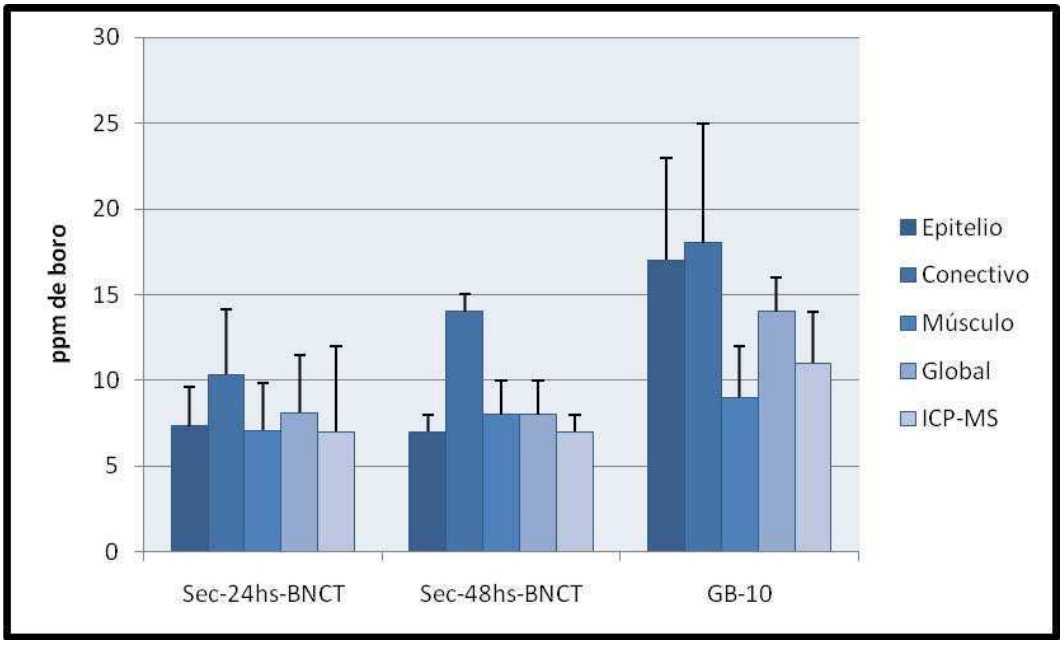


Figura 50 - Mediciones de AQT e ICP-MS para las diferentes estructuras tisulares de la bolsa normal para los tres protocolos analizados (ppm± DE).

Para la bolsa normal, la microlocalización del ^{10}B fue similar a la del tejido premaligno. El GB-10 se concentró preferentemente en el tejido conectivo tanto para G1, G2 y G3, aunque esta diferencia no fue tan notoria para G3 (GB-10 sólo). Además, los valores determinados por AQT global no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores cuantificados por ICP-MS. Este resultado es esperable, ya que el tejido normal no presenta gran variación entre los diferentes cortes, mientras que el tumor y el tejido premaligno son estructuralmente más heterogéneos. Cuanto más homogénea sea la estructura del tejido a analizar menor diferencia habrá entre los métodos de determinación de la concentración de boro. El valor promedio obtenido para G4 (control sin boro) por AQT fue de 2± 2 ppm.

2.2 Tratamiento con talidomida

En 1991 Rolf Barth y colaboradores desarrollaron un método para determinaciones globales de boro por espectrometría de emisión atómica por plasma de corriente contínua (DCP-AES) (Barth RF et al., 1991). En esa experiencia ellos encontraron que, para muestras biológicas, éste método es comparable al de ICP-OES. Sin embargo, remarcaron la necesidad de seguir utilizando la autorradiografía neutrónica para definir la captación de boro en cortes histológicos, donde las consideraciones espaciales son de primordial importancia. Veinte años después, Shinji Kawabata y colaboradores volvieron a enfatizar el concepto de que las mediciones globales de boro deberían ser complementadas por técnicas de resolución espacial, ya que altas concentraciones de boro en tumor no significan necesariamente que el compuesto borado se encuentra dentro de las células tumorales (Kawabata S et al., 2011).

Como es bien sabido, y se ha desarrollado extensamente en el Capítulo 2, la hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos tumorales conduce a una hipertensión intersticial y a un flujo sanguíneo temporal y espacialmente heterogéneo. Es decir que las drogas se acumularán en áreas que ya tienen una cantidad suficiente mientras que las regiones inaccesibles continuarán siéndolo (Jain RK, 1999). Es por eso que, la normalización de estos vasos ineficientes, busca distribuir las drogas y el oxígeno a una mayor proporción de células tumorales reparando el sistema de entrega defectuoso (Jain RK, 2005), y no pretende aumentar la captación total de droga y oxígeno.

Dentro del marco de esta tesis, desarrollamos por primera vez una técnica de normalización de los vasos sanguíneos en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, y la utilizamos para evaluar la eficacia terapéutica y potencial radiotoxicidad del BNCT mediado por BPA luego de la aplicación de la misma. Con esta nueva modalidad obtuvimos porcentajes de control tumoral significativamnte mayores a los obtenidos sin la aplicación previa del tratamiento con el normalizador (talidomida) (84±3% vs. 67±5%). Sin embargo, el valor absoluto de contenido de boro, determinado por ICP-MS, dentro de los tumores fue similar tanto para los animales tratados con talidomida como para los animales no tratados con talidomida (20±8 ppm y 24±6 ppm respectivamente). Teniendo

en cuenta el concepto de normalización de los vasos sanguíneos, nuestra hipótesis fue que la mejora en el control tumoral podría estar dada por un posible cambio en la microdistribución del BPA. Para ponerla a prueba decidimos utilizar la autorradiografía neutrónica como técnica. En la figura 51 se muestra un esquema de los protocolos analizados. En esta oportunidad, se utilizó CR39 como detector polimérico de trazas nucleares y el estudio se hizo en colaboración con el grupo del Dr. Altieri de la Universidad de Pavía, Italia.

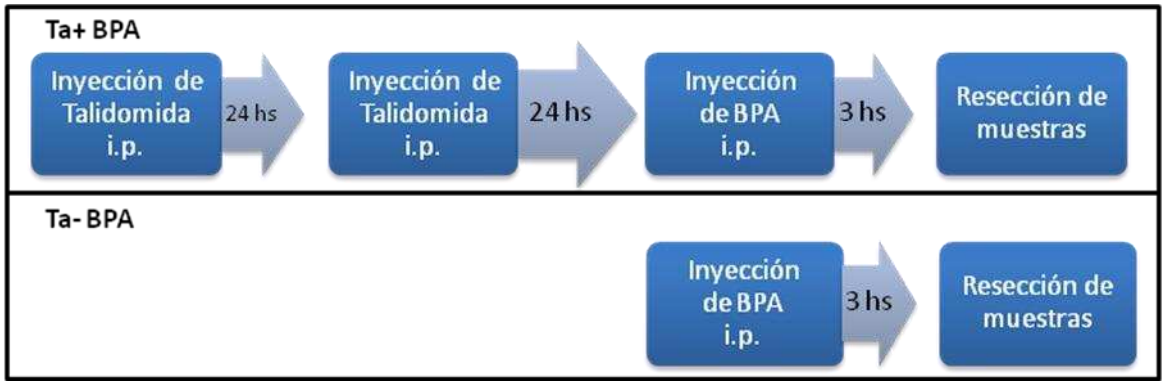


Figura 51 - Esquema de los protocolos estudiados para el análisis por AQL en CR39 como material detector de trazas nucleares.

En la figura 52 se muestran, a modo de ejemplo, imágenes autorradiográficas de 2 tumores de animales inyectados con BPA (Ta- BPA), y de 2 tumores de animales inyectados con BPA pero previamente tratados con talidomida (Ta+ BPA). Dado que esta etapa del trabajo se llevó a cabo bajo la metodología de autorradiografía empleada mundialmente, y no la desarrollada en la Argentina, no se cuenta con las coloraciones de los tejidos antes de revelar los detectores de trazas. Por este motivo se muestran sólo las imágenes autorradiográficas.

En estos ejemplos, se puede observar que la distribución del BPA es heterogénea para Ta- BPA. Esta observación se correlaciona con el transporte activo del compuesto, y con las imágenes autorradiográficas obtenidas en Lexan, para el mismo protocolo, que se describieron en la sección anterior (2.1). Sin embargo, cuando los animales son tratados previamente con talidomida, la

distribución espacial del BPA pareciera ser más homogénea (Figura 42, Ta+ BPA). Adicionalmente, si bien no se realizó el análisis cuantitativo, se observa una correlación entre los valores obtenidos por ICP-MS y la densidad de trazas de las autorradiografías, donde las imágenes más oscuras corresponden a una mayor concentración de boro (24±6 ppm para Ta- BPA vs 20±8 ppm para Ta+ BPA).

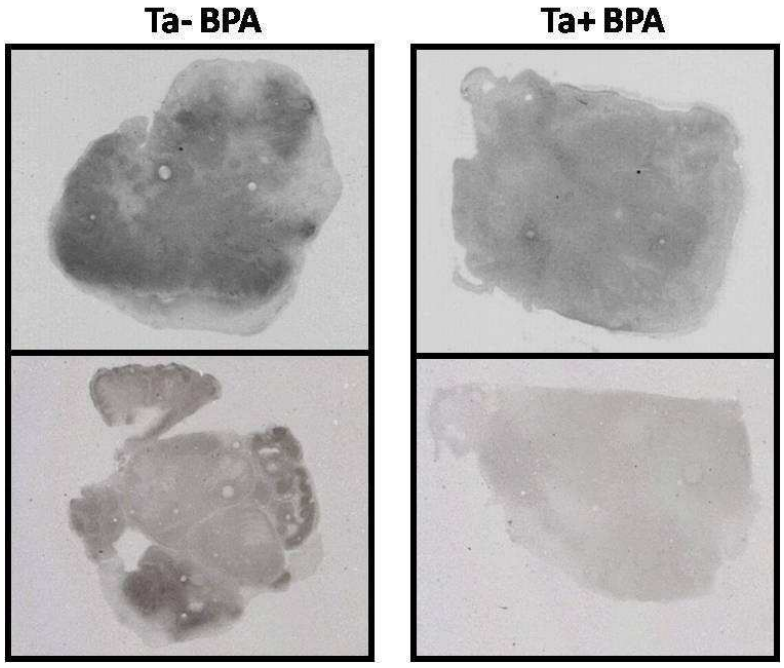


Figura 52 – AQL sobre CR39 de tumor de hámster. Ta- BPA: inyectado con BPA 15,5 mg/kg; Ta+ BPA: tratado con talidomida e inyectado con BPA 15,5 mg/kg.

2.3 Tratamiento con talidomida + BNCT Secuencial

Durante el desarrollo de esta tesis demostramos la eficacia terapéutica del BNCT secuencial sin exceder la tolerancia del tejido premaligno y sin exacerbar la mucositis inducida por una única aplicación de BNCT. También desarrollamos una técnica de normalización de los vasos sanguíneos tumorales que incrementa el éxito terapéutico del BPA-BNCT (reduciendo los efectos radiotóxicos). Con el objetivo de incrementar aún más el éxito terapéutico del BNCT en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, decidimos combinar ambas modalidades (a este protocolo se lo denominó Ta+ Sec-BNCT).

Como principales resultados de esta nueva modalidad obtuvimos un 100% de control tumoral (respuesta completa + respuesta parcial) y un 87±4% de

respuesta completa. Además, respecto a la radiotoxicidad, esta combinación no superó el grado 3 de mucositis.

Para determinar los posibles cambios en la microdistribución del GB-10 luego del tratamiento con talidomida y posterior irradiación con BPA, realizamos un estudio cualitativo por autorradiografía neutrónica en colaboración con el grupo de imagenología del boro de la CNEA. En la sección 2.1 de este mismo capítulo analizamos en detalle los posibles cambios en la microdistribución del GB-10 luego de la irradiación con BPA, sin el tratamiento previo de normalización de los vasos tumorales (Ta- Sec-BNCT), y aquí se utilizarán algunos de los resultados ya obtenidos para este protocolo para comparar con el grupo tratado con talidomida. Además, en la sección 2.2 analizamos los cambios que ocurren en la microlocalización del BPA dentro del tumor luego del tratamiento con talidomida. En la figura 53 se detallan los protocolos estudiados dentro de esta sección.

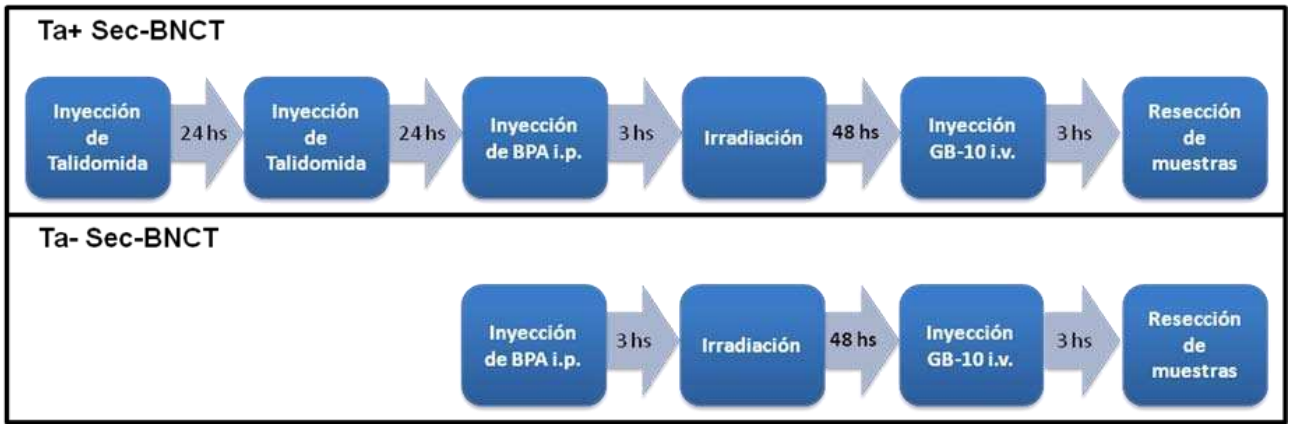


Figura 53 - Resumen de los protocolos analizados por AQL en esta sección.

Si bien el protocolo que se utilizó para comparar resultados es el de Sec-48 hs-BNCT (G3), en esta sección lo denominamos Ta- Sec-BNCT para facilitar la diferencia entre el grupo tratado con talidomida (Ta+) y el no tratado (Ta-).

El análisis por AQL reveló, inesperadamente, un cambio en la microdistribución del GB-10 luego del tratamiento con talidomida e irradiación con BPA en el tejido premaligno. En la figura 54 se muestra, a modo de ejemplo, un corte de tejido premaligno a diferentes aumentos, donde puede observarse una

mayor homogeneidad en la distribución de boro en las diferentes estructuras del tejido (epitelio, tejido conectivo y músculo) para Ta+ Sec-BNCT (columna b) que para Ta- Sec-BNCT (columna c).

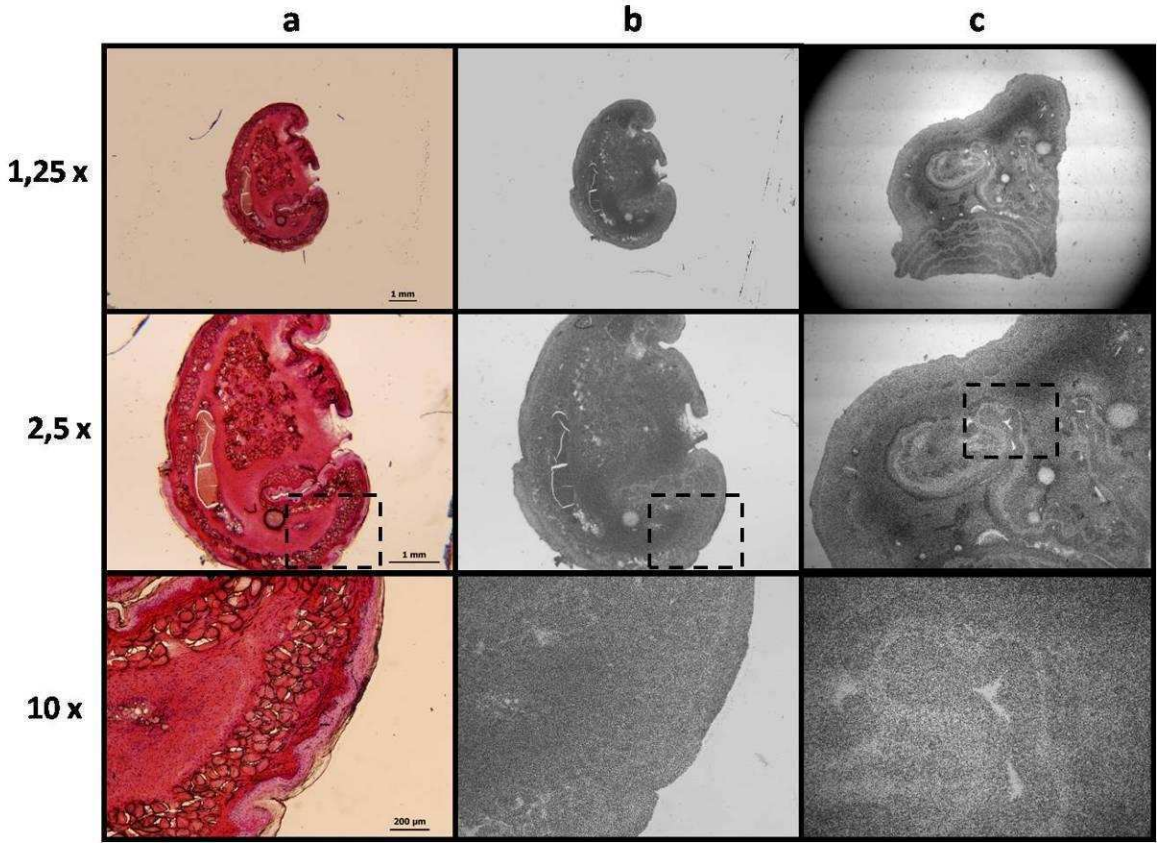


Figura 54 - (a) Corte por criostato de tejido premaligno de hámster tratado con Ta+ Sec-BNCT, coloreado con hematoxilina y eosina, y montado sobre Lexan. (b) imagen de AQL correspondiente a (a). (c) imagen de AQL correspondiente a un corte por criostato de tejido premaligno de hámster tratado con Ta- Sec-BNCT. Todos los cortes se muestran en 1,25x, 2,5x y 10x.

Sin embargo, el análisis de AQL del tejido normal no mostró cambios en la distribución espacial del GB-10 luego del tratamiento de normalización y BPA-BNCT. En la figura 55 se observa que la distribución del boro dentro del tejido normal sigue siendo heterogénea y con una acumulación preferencial en el tejido conectivo. Como se describió en la sección 2.1 de este mismo capítulo, la distribución del GB-10 para Ta- Sec-BNCT es similar tanto para tejido normal como para el tejido premaligno. Por lo tanto las imágenes autorradiográficas de la figura 55 pueden compararse con las de la columna c de la figura 54.

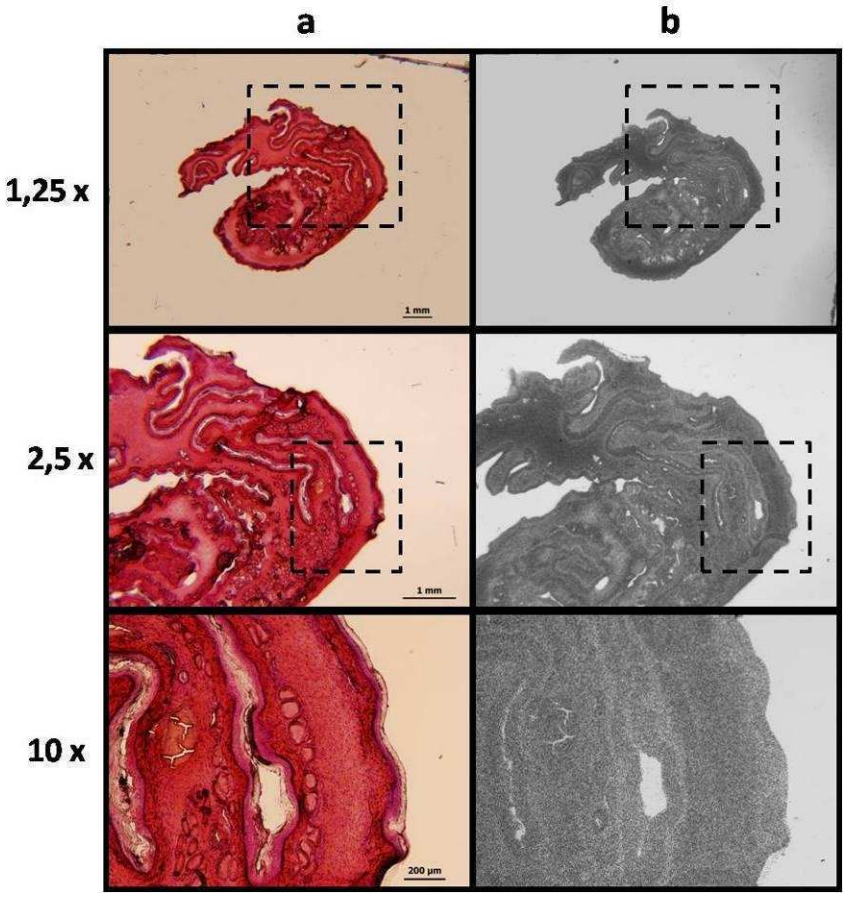


Figura 55 - (a) Corte por criostato de bolsa normal de hámster tratado con Ta+ Sec-BNCT, coloreado con hematoxilina y eosina, y montado sobre Lexan. (b) imagen de AQL correspondiente a (a). Todos los cortes se muestran en 1,25x, 2,5x y 10x.

El mismo análisis por AQL se aplicó al tumor, pero en este caso se utilizaron cortes de la bolsa de la mejilla del hámster completas (sin separar el tumor del tejido premaligno). En la figura 56 se muestra, a diferentes aumentos, un corte de bolsa con tumor correspondiente a un animal tratado con Ta+ Sec-BNCT (columnas a y b) y un corte de tumor (sólo) de un animal tratado con Ta- Sec-BNCT (columna c). En este caso, puede observarse nuevamente, que la distribución en el tejido precanceroso es homogénea para Ta+ Sec-BNCT. Además, se observa un marcado cambio en la microdistribución del GB-10 dentro del tumor. En el tumor tratado con Ta+ Sec-BNCT la distribución espacial del boro es más homogénea que en los tumores sin tratamiento con talidomida.

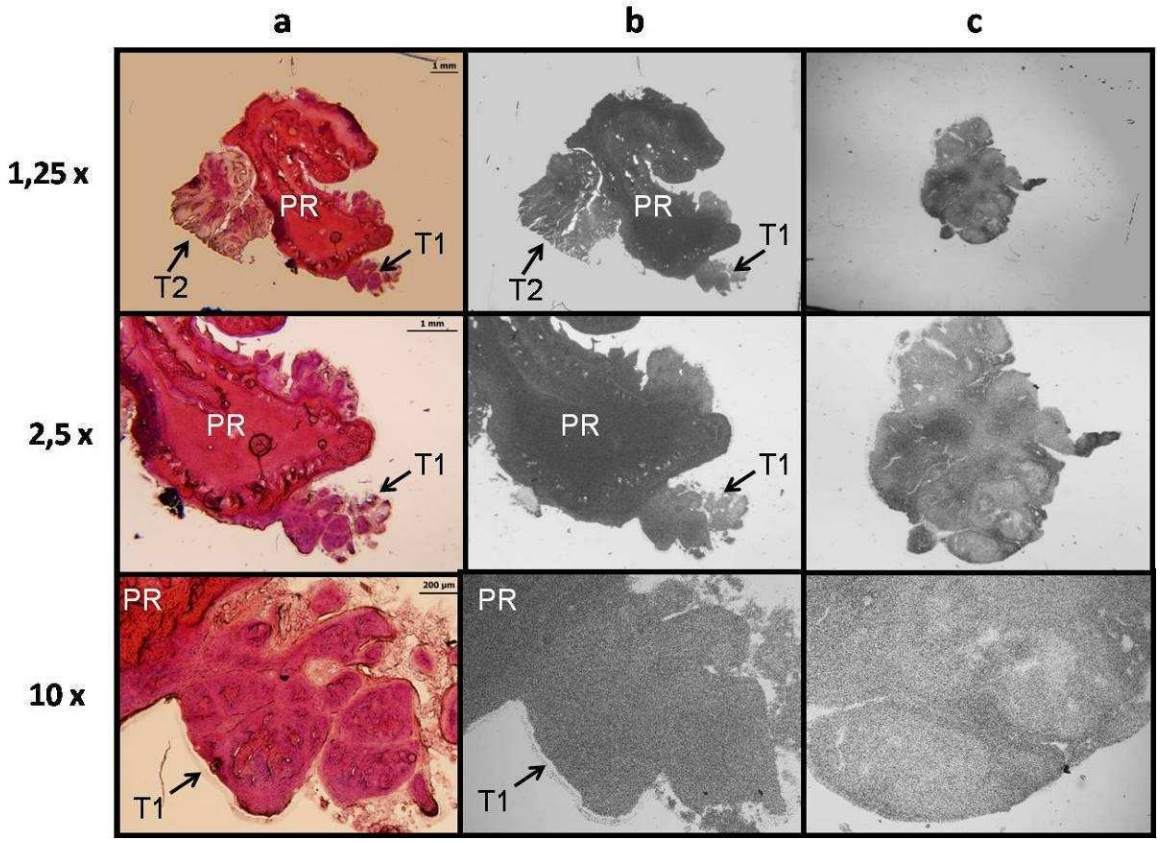


Figura 56 - (a) Corte de bolsa cancerizada con tumor de hámster tratado con Ta+ Sec-BNCT, coloreado con hematoxilina y eosina, y montado sobre Lexan. (b) imagen de AQL correspondiente a (a). (c) imagen de AQL correspondiente a tumor de hámster tratado con Ta- Sec-BNCT. Todos los cortes se muestran en 1,25x, 2,5x y 10x.

Si bien las mediciones de la concentración global de boro por ICP-MS no mostraron diferencias entre el tejido precanceroso y el tumor, el análisis por AQL pareciera revelar una mayor concentración de GB-10 en el tejido premaligno que en el tumor por la densidad de trazas.

3. Discusión

3.1 BNCT secuencial

Las aproximaciones cualitativa y cuantitativa se analizaron en conjunto a fin de obtener información acerca de la microdistribución del ^{10}B en tumores provenientes de diferentes protocolos: GB-10 administrado a animales sin tratar

(GB-10), GB-10 administrado 24 hs post BPA-BNCT (Sec-24hs-BNCT) y GB-10 administrado 48 hs post BPA-BNCT (Sec-48hs-BNCT).

Mediante el análisis por AQL para tumor se observó el mismo patrón de heterogeneidad tanto para GB-10, como para Sec-24hs-BNCT y Sec-48hs-BNCT: el estroma capta más ^{10}B en relación al parénquima, contrariamente a lo que sucede cuando se inyecta BPA. Asimismo, se determinó que la distribución del GB-10 en tejido premaligno y normal también es heterogénea, con una acumulación preferencial en el tejido conectivo laxo en los 3 protocolos analizados. El hallazgo de un patrón de distribución heterogéneo del GB-10 pareciera contraponerse al concepto de compuesto con distribución homogénea establecido anteriormente en nuestro laboratorio por Heber y colaboradores (Heber EM et al., 2006). Sin embargo, la diferencia radica en las técnicas utilizadas y no en una contraposición de los datos obtenidos. En el trabajo publicado en 2006, se utilizó el método de ICP-OES como técnica de determinación global de ^{10}B, mientras que aquí utilizamos una técnica que permite determinar la localización del compuesto inequívocamente. Por el tipo de metodología, mediante la técnica de plasma inductivo sólo pueden realizarse determinaciones sobre trozos de muestras que incluyen todas las estructuras del tejido de manera integral. Con nuestro análisis por AQL y AQT enfatizamos la importancia del empleo de una técnica que pueda determinar la microlocalización del boro en las regiones de un tejido que no puede separarse físicamente para su cuantificación por ICP.

Adicionalmente, la cuantificación de la concentración de boro por autorradiografía neutrónica (AQT), en las diferentes estructuras tisulares, contribuyó al conocimiento de la radiobiología de los protocolos de BNCT desarrollados en esta tesis. Debe tenerse en cuenta que las técnicas utilizadas para comparar la concentración de boro son muy diferentes entre sí. La de ICP-MS mide la concentración global en muestras de tejido (cantidad de material equivalente a aproximadamente 10 secciones de tejido), mientras que la AQT permite un análisis, sección por sección, de la concentración de boro en una misma muestra, permitiendo examinar la variabilidad intratumoral.

El análisis por AQT de tumor de los protocolos antes mencionados (GB-10, Sec-24hs-BNCT y Sec-48hs-BNCT) mostró una diferencia cuantificable entre

estroma y parénquima. Si bien la diferencia entre protocolos es baja, la relación estroma:parénquima fue de 1,2 para Sec-24hs-BNCT, mientras que para GB-10 y Sec-48hs-BNCT fue de 1,5. Estos resultados son coherentes con los altos valores de boro en sangre reportados previamente para GB-10 (Heber EM et al., 2004), asociados a una permeabilidad aumentada en la vasculatura aberrante de los tumores. Esta heterogeneidad estaría relacionada con el hecho de que la vasculatura tumoral es caótica, con zonas de lagunas donde se acumularía el compuesto. Dado que el GB-10 entra a las células por transporte pasivo, no tiene posibilidad de acumularse preferencialmente en parénquima. Para el tejido premaligno y normal se encontró que la relación tejido conectivo:epitelio varía entre 1,4 y 2, mientras que la relación músculo:epitelio es, en promedio, 1, para todos los protocolos. Asimismo, el análisis por AQT pudo demostrar que las heterogeneidades encontradas varían dependiendo el compuesto a analizar. Coincidentemente con el modo de transporte activo del BPA, el promedio de la relación parénquima:estroma fue mayor que para GB-10 (2,2 vs. 0,8 respectivamente). Estas diferencias estarían indicando una mayor homogeneidad del GB-10 respecto del BPA, lo que avalaría lo observado por Heber y colaboradores con un método de medición global (Heber EM et al., 2006).

Sin embargo, tanto por los resultados de AQL como por los de AQT, pareciera ser de suma importancia el análisis de la microlocalización del boro como método complementario a la cuantificación global del mismo. El análisis realizado por autorradiografía neutrónica sugiere que la aplicación de BPA-BNCT no afecta de manera significativa la distribución espacial de boro en tumor, tras la inyección de GB-10. Sin embargo, la menor relación estroma:parénquima se vió en los animales tratados con Sec-24hs-BNCT, lo que indicaría una mayor homogeneidad del compuesto dentro del tumor. Si bien esta diferencia, 1,2 respecto de 1,5 para Sec-48hs-BNCT pareciera ser pequeña, se podría asociar al mayor control tumoral alcanzado por los animales tratados con Sec-24hs-BNCT en relación al control alcanzado por los tratados con Sec-48hs-BNCT (95±2% vs. 91±3%). Una posible explicación para esta diferencia en la heterogeneidad del GB-10 después de 24 ó 48 horas del primer ciclo de BNCT, podría ser que se produzca una mayor disminución de la IFP luego de 24 horas de la irradiación con

BPA que luego de 48 hs. Si bien se ha descripto que la IFP puede disminuir luego de la irradiación con fotones (Znati CA et al., 1996), el tiempo y mecanismo de este proceso no está claramente descripto para BNCT. Así, una reducción en la IFP puede incrementar la captación de agentes terapéuticos (Buchegger F et al., 1995), ó similarmente a lo que ocurre en el proceso de normalización de los vasos sanguíneos tumorales aberrantes, mejorar su distribución a una mayor fracción de células tumorales (Jain RK, 2005).

3.2 Tratamiento con talidomida

El análisis por AQL de los tumores de animales tratados con talidomida e inyectados con BPA (Ta+ BPA) reveló una mayor homogeneidad en la distribución del ^{10}B respecto de los tumores inyectados con BPA pero sin tratamiento previo con talidomida (Ta- BPA). Este análisis respaldaría nuestra hipótesis de normalización de los vasos sanguíneos tumorales aberrantes mediante la administración de un compuesto antiangiogénico (talidomida) por un período corto de tiempo (2 días). Si bien, mediante esta técnica, no se espera aumentar la cantidad de droga entregada, se espera que la localización de la misma sea más eficiente (Jain RK, 2005). Coincidentemente con los datos obtenidos por ICP-MS, la densidad de trazas observadas para Ta+ BPA es menor que para Ta- BPA, pero su distribución es más homogénea. De esta manera, el aumento del control tumoral de 67±5% para Ta- BPA-BNCT a 84±3% para Ta+ BPA-BNCT estaría directamente relacionado a esta diferencia en la microdistribución del BPA.

Con el análisis autorradiográfico, pudimos corroborar el cambio inducido sobre el BPA luego del tratamiento con el agente normalizador (talidomida), ya que todos los estudios anteriormente realizados y descriptos en el capítulo 2 fueron sobre parámetros morfológicos, estructurales y funcionales de la vasculatura tumoral, pero no sobre la localización del compuesto de interés. Una vez más, demostramos la importancia de contar con una técnica de microlocalización del ^{10}B que se puede aplicar con diferentes objetivos.

3.3 Tratamiento con talidomida + BNCT Secuencial

Por último, el análisis por AQL de los tumores tratados con Ta+ Sec-BNCT reveló un cambio en la microdistribución del GB-10 luego del tratamiento con talidomida y posterior BPA-BNCT. Si bien el GB-10 es un compuesto difusivo, el tratamiento con talidomida (al igual que para BPA) aumentó la homogeneidad del ^{10}B dentro del tumor. Este resultado fue un hallazgo, ya que luego de 48 hs de haber finalizado el tratamiento con talidomida se esperaba que el período de ventana de normalización hubiera comenzado a revertir y el GB-10 actuara, como se cree hasta el momento, destruyendo los vasos sanguíneos aberrantes. Sin embargo, el análisis por AQL reveló que ese tiempo es aún suficiente para mejorar la localización del GB-10 pese a no ser un compuesto de transporte activo. Si bien está descripto que el GB-10 actuaría mediante un mecanismo dirigido a los vasos tumorales en el RA-6 del Centro Atómico Bariloche (Trivillin VA et al., 2006), no existen evidencias concluyentes de que el GB-10 actúe bajo el mismo mecanismo en el RA-3 del Centro Atómico Ezeiza.

Asimismo, este estudio mostró un cambio de distribución del GB-10 en el tejido premaligno limitante de dosis, disminuyendo la heterogeneidad observada en los animales sin tratamiento de normalización vascular. Si bien este cambio no era esperable, coincide con las observaciones realizadas en el Capítulo 2, donde el análisis microscópico de la bolsa cancerizada (tejido premaligno) reveló una disminución en la densidad vascular y una menor tortuosidad de los vasos. Aunque en ese mismo capítulo, el análisis de permeabilidad vascular no mostró cambios en el tejido premaligno, pareciera que el tratamiento con talidomida adicionado a los posibles cambios generados luego de la irradiación con BPA, se traducen en una mayor homogeneidad del GB-10 tanto en tumor, como en tejido premaligno. Es de esperar que, debido a la cancerización de campo realizada por el DMBA, el tejido precanceroso esté más irrigado, y esa vasculatura sea más aberrante que la del tejido normal. Además, coincidentemente con el concepto de normalización de los vasos tumorales, el tratamiento con talidomida y posterior irradiación con BPA no mostró cambios en la distribución del GB-10 en el tejido normal.

Adicionalmente, los resultados obtenidos por AQL de los animales tratados con Ta+ Sec-BNCT acompañan los resultados de control tumoral obtenidos en el Capítulo 3. Un aumento en la homogeneidad de la distribución de los compuestos borados utilizados hace que la respuesta tumoral total (respuesta completa + respuesta parcial) pase de 91±3% a 100±0% y la respuesta completa asciende de 68±5% a 87±4%.

En este capítulo demostramos la importancia y el aporte al conocimiento de la radiobiología de los protocolos de BNCT que otorga la técnica de autorradiografía neutrónica. Hemos demostrado, que pequeños cambios en la distribución de los compuestos borados pueden asociarse a cambios en el control tumoral, y por lo tanto su comprensión es de suma importancia a la hora de realizar una planificación terapéutica.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En estudios anteriores hemos demostrado la eficacia terapéutica del BNCT mediado por BPA, BNCT mediado por GB-10 y BNCT mediado por la combinación de ambos compuestos en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster sin toxicidad en tejido normal, pero con mucositis limitante de dosis en el tejido premaligno (Kreimann EL et al., 2001b; Trivillin VA et al., 2006; Pozzi ECC et al., 2009). Además, mediante ensayos clínicos a nivel mundial se ha comprobado el éxito terapéutico del BNCT tanto en tumores cerebrales (ej. Aiyama H et al., 2011) como en melanoma y tumores de cabeza y cuello (ej. Hiratsuka J et al., 2011; Kankaanranta L et al., 2012), pero aún se espera que estos resultados puedan ser mejorados. Se ha visto que mayores dosis y tiempos más prolongados de infusión del BPA no mejoran el tratamiento (Henriksson R et al., 2008), y que al igual que la re irradiación con fotones, el doble tratamiento con BPA-BNCT está asociado a una toxicidad sustancial que incluye la necrosis de partes blandas y osteonecrosis (Kankaanranta L et al., 2012). Por estos motivos, y dado que hoy en día se han optimizado los haces de neutrones generados por reactores de fisión y se están desarrollando fuentes de neutrones basadas en aceleradores que podrán ser instaladas en hospitales (Barth RF et al., 2012), es necesario avanzar en el diseño de nuevos compuestos transportadores de boro que puedan mejorar la selectividad por el tumor y diseñar nuevas modalidades terapéuticas para optimizar el BNCT sin exceder los límites de radiotolerancia.

Con el objetivo de contribuir a resolver las dificultades anteriormente descriptas, desarrollamos nuevas modalidades terapéuticas de BNCT aplicadas al modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster. En este trabajo de tesis ideamos el BNCT secuencial, una técnica de normalización de los vasos sanguíneos tumorales con talidomida, una nueva modalidad de BPA-BNCT con previa normalización de los vasos tumorales, y el tratamiento con talidomida antes de la aplicación del BNCT secuencial. Adicionalmente analizamos la microdistribución del ^{10}B para cada una de estas modalidades. Todos estos nuevos enfoques del BNCT se crearon con el objetivo de optimizar la respuesta tumoral sin exceder la tolerancia del tejido premaligno.

En el Capítulo 1 demostramos una ventaja terapéutica del BNCT secuencial sobre una única aplicación de BNCT mediada por la combinación de BPA y GB-10

(con dosis absorbidas totales a tumor igualadas), produciendo un aumento en la respuesta tumoral sin causar mucositis adicional en el tejido premaligno limitante de dosis que rodea a los tumores. Dado que el potencial efecto de aplicaciones secuenciales de BNCT mediadas por el mismo agente borado no fue tema de este estudio, aquí sólo se provee evidencia de un incremento en la eficacia terapéutica de BPA-BNCT seguida de GB-10-BNCT comparada con (BPA+GB-10)-BNCT. Tampoco se estudió la aplicación secuencial en orden inverso (es decir GB-10-BNCT seguido de BPA-BNCT), pero sospechamos que sería menos efectiva basándonos en la hipótesis que GB-10-BNCT actuaría a nivel vascular (Trivillin VA et al., 2006) y dificultaría la subsiguiente entrega de BPA a las células tumorales. Si bien este mecanismo de acción fue demostrado de modo indiscutible en tumores tratados en el RA-6 del Centro Atómico Bariloche, no pudo ser confirmado en la totalidad de los casos analizados hasta el momento en el RA-3 del Centro Atómico Ezeiza. Por lo tanto, sería interesante explorar a futuro la posibilidad de invertir las irradiaciones, realizando primero el GB-10-BNCT y luego de 24 ó 48 hs el BPA-BNCT. Asimismo, dos aplicaciones secuenciales de BPA-BNCT serían sumamente interesantes de evaluar en términos de control tumoral. Sin embargo, este protocolo contaría con una dificultad debida a la conocida mucositis que se alcanza en el tejido premaligno luego del BNCT mediado por BPA en este modelo (Trivillin VA et al., 2006). Es justamente, por los efectos secundarios generados por el BPA-BNCT, que cuando ideamos esta nueva modalidad secuencial decidimos prescribir con BPA-BNCT sólo el 70% de la dosis comúnmente utilizada para este modelo cuando se emplea como único tratamiento (Trivillin VA et al., 2006; Pozzi ECC et al., 2009).

Ambos protocolos secuenciales de BNCT (con 24 ó 48 horas de intervalo) mostraron una respuesta tumoral total significativamente mayor que la de una única aplicación de (BPA+GB-10)-BNCT. La tasa de respuesta completa también fue significativamente mayor para los protocolos secuenciales que para la única aplicación. Además, todos los protocolos indujeron mucositis reversible en el tejido premaligno. En términos de toxicidad, no hubo un aumento de efectos adversos asociados con el incremento en la respuesta tumoral de los protocolos secuenciales. Asimismo, el análisis autorradiográfico cualitativo (AQL) no mostró

cambios en la distribución heterogénea del GB-10 cuando a los tumores se los trató previamente con BPA-BNCT. Sin embargo, el análisis cuantitativo (AQT) de los tumores tratados con BNCT secuencial reveló una pequeña diferencia en la distribución del GB-10, mostrando una mayor homogeneidad cuando las sesiones son separadas por un intervalo de 24 hs. Coincidentemente, esta modalidad arrojó un resultado de respuesta tumoral total (RTT) levemente mayor (pero no estadísticamente significativo) que cuando las irradiaciones son realizadas con 48 hs de diferencia. Es interesante destacar, que en este trabajo se realizó por primera vez un análisis exhaustivo de la microlocalización del GB-10, tanto en tumor, como en tejido premaligno y normal. Si bien se realizó para poder estudiar los posibles cambios generados sobre la distribución del compuesto luego del tratamiento con BPA-BNCT, fue un aporte sumamente enriquecedor. Por ser un compuesto difusivo y presentar un grado de homogeneidad mayor al BPA, se lo describió como un agente borado con distribución homogénea (Heber EM et al., 2006). Sin embargo, dado que el análisis autorradiográfico puede determinar las diferencias de localización del ^{10}B a lo largo de todas las estructuras tisulares, hemos podido concluir que el GB-10 presenta una acumulación preferencial en el estroma (en el caso de los tumores) y en el tejido conectivo (tanto del tejido precanceroso como del tejido normal). Asimismo, respaldando lo observado por Heber y colaboradores mediante un método analítico de la concentración global (Heber EM et al., 2006), el análisis por AQT mostró una mayor heterogeneidad para el BPA que para el GB-10.

La ventaja terapéutica del BNCT secuencial podría ser atribuida a diferentes factores. BNCT secuencial involucra el uso de dos agentes borados con diferentes propiedades y mecanismos de acción complementarios, contribuyendo posiblemente a alcanzar las diferentes poblaciones celulares del tumor. Si bien esas propiedades también existen al entregar los compuestos simultáneamente, el pequeño intervalo entre aplicaciones podría favorecer la captación de GB-10, ya que está descripto que poco tiempo después de una irradiación se produce un descenso en la IFP [ej., 1-2 días después de una única dosis o dosis fraccionadas mayores a 10 Gy de fotones (Znati CA et al., 1996)]; y una reducción en la IFP incrementa la captación de agentes terapéuticos (e.j., Buchegger F et al., 1995).

Entonces, el efecto terapéutico de la primera aplicación de BPA-BNCT a una dosis total a tumor de aproximadamente 4 Gy podría reducir considerablemente la IFP, además de inducir la muerte de las células cancerígenas, favoreciendo la penetración y distribución del GB-10. Asimismo, una posible explicación para el aumento en la homogeneidad del GB-10 luego de 24 hs de la primera irradiación podría ser que el descenso de la IFP sea más marcado luego de un día que de dos. Por estos motivos, el GB-10 tendría una mejor oportunidad de alcanzar el tumor cuando es administrado como parte de un protocolo de Sec-BNCT que cuando es administrado conjuntamente con BPA en el protocolo de única aplicación.

La prolongación del tratamiento a lo largo del tiempo reduce la toxicidad en el tejido normal cuando se utiliza radioterapia convencional, pero reduce la probabilidad de control tumoral (Dörr W et al., 2005). En el caso del BNCT, donde la dosis de irradiación está compuesta por una combinación de componentes de alto y bajo-LET, el intervalo corto (1 ó 2 días) entre tratamientos produciría una pequeña variación en la reparación del daño subletal. Sin embargo, este intervalo, que es suficientemente corto para no permitir una repoblación celular (Hopewell JW et al., 2003), podría favorecer la llegada del boro a las células tumorales que fueron refractarias a la primera aplicación. Ambos intervalos usados en este estudio (24 ó 48 h) parecen ser igualmente efectivos en cuanto a respuesta tumoral ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En lo que concierne al hallazgo que Sec-BNCT incrementó el control tumoral sobre el (BPA+GB-10)-BNCT sin toxicidad adicional, es sabido que una tasa de proliferación de células basales más rápida hace al tejido más propenso a desarrollar mucositis (Sonis ST et al., 2000). La reducción en la síntesis de ADN inducida por el BNCT mediado por BPA descripta anteriormente por nuestro grupo en el tejido premaligno de la bolsa de la mejilla del hámster (Heber EM et al., 2007) podría hacer que el tejido expuesto a la segunda aplicación de BNCT (GB-10-BNCT) sea menos, o en el peor de los casos, igualmente propenso a desarrollar mucositis que si la dosis total es entregada en una única aplicación. Estos efectos podrían aplicarse principalmente a las componentes de dosis de bajo-LET del BNCT. Como la mucositis es un proceso de múltiples pasos iniciado por la injuria a

la mucosa y asociado a un incremento en la producción de citoquinas inflamatorias que causan daño directo sobre la mucosa y que inician ciclos de retroalimentación positiva (Sonis ST et al., 2000), el intervalo de 24 ó 48 horas entre aplicaciones de BNCT podría permitir que el proceso inflamatorio remita parcialmente antes que sea entregada la segunda dosis, impidiendo que se agrave la mucositis. A pesar que indudablemente existen diferencias entre el tejido premaligno en la bolsa de la mejilla del hámster y el tejido alrededor de un SCC en humanos, una estrategia terapéutica que reduce la toxicidad sobre el tejido potencialmente maligno en el modelo experimental podría contribuir considerablemente a reducir la toxicidad en la mucosa oral humana.

La aplicación secuencial de BPA-BNCT seguida de GB-10-BNCT, a diferencia de una única aplicación de (BPA + GB-10)-BNCT, permitiría la modulación de cada aplicación con métodos apropiados diseñados para cada transportador de boro. Además, dado que el GB-10, junto al BPA y el BSH, está aprobado para su uso en humanos, podríamos pensar que la implementación del BNCT secuencial sería una modalidad clínica prometedora.

A pesar que previamente demostramos el éxito terapéutico del BNCT mediado por BPA en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster (Pozzi ECC et al., 2009), nos enfrentamos al desafío de optimizar esta técnica, empleando enfoques que puedan ser considerablemente útiles en otros modelos experimentales y, eventualmente, en un escenario clínico. En este contexto, hemos empleado exitosamente estrategias como la combinación de compuestos borados para incrementar la homogeneidad en la distribución de boro (Trivillin VA et al., 2006). Nuestros estudios de BNCT en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster, y los de otros autores en otros modelos experimentales, han mostrado la importancia sobre el éxito terapéutico que cumple la homogeneidad en la distribución del boro en las células tumorales (Heber EM et al., 2006; Ono K et al., 1999). Dado que la optimización de la captación de los compuestos borados contribuirá a la eficacia del BNCT (ej. Ono K et al., 1999), desarrollamos, como parte de este trabajo de tesis, la técnica de

normalización de los vasos sanguíneos tumorales en el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster.

Ya que la vasculatura de los hámsteres no se puede tratar con los anticuerpos monoclonales que se utilizan para normalizar los vasos tumorales en humanos, ratas y ratones (Goel S et al., 2011), con el estudio desarrollado en el Capítulo 2 establecimos por primera vez una técnica de normalización de los vasos sanguíneos tumorales en el modelo de la bolsa del hámster con el objetivo de utilizarlo en el estudio de BNCT particularmente. Seleccionamos un protocolo de administración de talidomida que induce la normalización de los vasos sanguíneos en el modelo de hámster. Apoyándonos en un análisis cualitativo de la morfología de los vasos sanguíneos en el tejido con alteraciones potencialmente malignas (PMD) *in situ*, establecimos una ventana tentativa de normalización a las 48 horas de iniciado el tratamiento, y la empleamos en los experimentos subsiguientes. Macroscópicamente, la observación de angostamiento y enderezamiento de los vasos sanguíneos en el tejido con PMD fue máximo a las 48 horas de la primera inyección de talidomida. Este hallazgo fue interpretado como potencial normalización de los vasos sanguíneos en la bolsa cancerizada, y luego fue confirmado por dos análisis adicionales.

Una reducción estadísticamente significativa en la permeabilidad de los vasos sanguíneos al azul de Evans (EBD) en los tumores de los animales tratados con talidomida indicó una reducción en la hiperpermeabilidad característica de los vasos sanguíneos aberrantes dentro de los tumores que compromete el flujo sanguíneo y consecuentemente impide la entrega eficiente de drogas. Por eso, la reducción en la extravasación del EBD fue interpretada como un signo de normalización de los vasos sanguíneos (Cerniglia GJ et al., 2009). Los vasos sanguíneos de la bolsa normal, hígado y riñón no mostraron cambios como resultado del tratamiento con talidomida. Solo los vasos anormales serían sensibles a la normalización. En este sentido, los vasos sanguíneos del tejido con PMD son aberrantes comparados con los de la bolsa normal, pero están menos alterados funcional y estructuralmente que los del tumor. En este contexto, el pequeño grado de normalización que pueden alcanzar los vasos del tejido con PMD no sería suficiente para ser demostrada inequívocamente. Las observaciones

cualitativas al microscopio indicando la presencia de menor tortuosidad, vasos sanguíneos más angostos en el tejido con PMD de hámsteres tratados con talidomida, fueron usadas como guía para establecer la ventana de normalización en los tumores pero no pretendió ser empleada como evidencia cuantitativa de la normalización en el tejido con PMD. Sin embargo, el análisis por AQL de tejidos premalignos tratados con talidomida, irradiados con BPA, y luego inyectados con GB-10 revelaron una distribución más homogénea del compuesto borado en comparación con los que no fueron normalizados previamente. Este hallazgo indicaría que el tejido con PMD también es potencialmente normalizable.

Asimismo, los valores de relación de aspecto mostraron que el tratamiento con talidomida reduce significativamente la compresión de los vasos sanguíneos tumorales a niveles que se asemejan a los de la vasculatura normal. Las fuerzas de compresión pueden causar el colapso del lumen vascular y restringir el flujo sanguíneo. La normalización de los vasos sanguíneos disminuiría la hiperpermeabilidad vascular y la presión de fluido intersticial (Hagendoorn J et al., 2006), reduciendo las fuerzas compresivas y contribuyendo a una adecuada entrega de los agentes terapéuticos dentro del tumor (Jain RK, 1998).

El efecto secundario del tratamiento con talidomida no debería ser desestimado. En particular, los animales cancerizados y sometidos a anestesia fueron especialmente sensibles a efectos tóxicos, con un 22% de incidencia de muertes. La anestesia exacerbaría el efecto de la talidomida, conocido por ser un sedante no barbitúrico (von Moos R et al., 2003; Lima V et al., 2005). Efectos tóxicos similares han sido previamente descriptos (Yang Y et al., 2009). En particular, Yang y colaboradores reportaron que solo los animales cancerizados exhibieron estos efectos secundarios inducidos por la talidomida y sugirieron que las farmacocinéticas de las drogas en animales expuestos a un cancerígeno son diferentes a las de los animales normales (Yang Y et al., 2009). Este aspecto debe ser tenido en cuenta cuando se planean estudios experimentales. Si bien la talidomida está aprobada desde 1997 para su uso en humanos en patologías que incluyen el eritema nodoso leproso (Tseng S et al., 1996), también se ha aprobado su uso en combinación con dexametasona para el tratamiento de mieloma múltiple (Cavallo F et al., 2007). Sin embargo, a la hora de planificar un

nuevo protocolo clínico de BNCT sería interesante pensar en la administración de anticuerpos monoclonales (por ejemplo bevacizumab) como agente normalizador de la vasculatura tumoral teniendo en cuenta los posibles efectos adversos y teratogénicos de la talidomida. El bevacizumab (cuyo nombre comercial es el Avastin) es un compuesto antiangiogénico que también está aprobado para su uso en humanos y se utiliza actualmente en múltiples ensayos clínicos de fase II y fase III (Strickler JH y Hurwitz HI, 2012).

Si bien existen muchos modelos de normalización de los vasos sanguíneos tumorales, nosotros desarrollamos, por primera vez, una técnica de normalización para el modelo de cáncer bucal de la bolsa de la mejilla del hámster con el objetivo de aplicarla en terapias contra el cáncer de cabeza y cuello en general, pero en particular para BNCT. Mediante la comparación de autorradiografías provenientes de tumores de animales inyectados con BPA, con o sin tratamiento previo de normalización con talidomida, demostramos un cambio en la microlocaclización del ^{10}B. Mediante este análisis y mediciones globales de la concentración de boro determinamos que el pre tratamiento con talidomida no aumenta los valores absolutos pero incrementa la homogeneidad de su captación. Asimismo, posteriormente a nuestro trabajo, Liu y colaboradores reportaron una ampliación en la distribución del boro en tumores murinos luego del tratamiento con bevacizumab, enfatizando la posibilidad de mejorar la entrega de los agentes borados utilizados en BNCT (Liu Y et al., 2012).

Adicionalmente, en el capítulo 2, también demostramos que la normalización de los vasos sanguíneos antes de la administración del BPA aumenta la respuesta tumoral de BNCT mediado por BPA. El hallazgo que el tratamiento previo con talidomida no induce un cambio significativo en la respuesta tumoral en animales tratados con Haz Sólo sugeriría que el incremento en la respuesta tumoral estaría relacionado a un efecto sobre la entrega del BPA. Los valores globales de boro nos dicen poco acerca de la aptitud y utilidad terapéutica de la biodistribución del boro, a pesar que esos valores son útiles para los cálculos dosimétricos (ej. Coderre JA y Morris GM, 1999). De hecho, el principal objetivo de la normalización de los vasos sanguíneos tumorales no es aumentar la captación total de droga y oxígeno sino distribuirlos eficientemente a una mayor proporción de células

tumorales reparando el sistema de entrega defectuoso (Jain RK, 2005). Estos datos sugieren, en el contexto del presente estudio, que el incremento en la respuesta tumoral provocada por la normalización de los vasos aberrantes antes de la entrega del BPA podría ser atribuida, al menos parcialmente, a la distribución más homogénea del BPA dentro del tumor detectada por AQL.

El incremento de la oxigenación como resultado de la normalización de los vasos tumorales podría jugar un rol considerable incrementando la sensibilidad de los tumores a la componente de baja transferencia lineal de energía (LET) en BNCT. Sin embargo, el hecho que no se hayan encontrado diferencias significativas en la respuesta tumoral entre los grupos Ta+ y Ta- de animales tratados con Haz Sólo sugeriría que el beneficio principal de la normalización de los vasos sanguíneos estaría asociado al direccionamiento incrementado del boro. Además, el hecho de no haber encontrado cambios estadísticamente significativos en la respuesta tumoral inducidos por la administración de talidomida antes del tratamiento con Haz Sólo descartaría un efecto directo de la talidomida (administrada en períodos cortos) en la remisión tumoral.

El descubrimiento que el tratamiento previo con talidomida provoca un efecto protector sobre la mucositis generada en el tejido premaligno limitante de dosis nos impulsó a explorar este tema en mayor profundidad. La comparación de los grupos de animales tratados con Haz Sólo (Ta+ HS y Ta- HS) en términos de la toxicidad en el tejido con PMD mostró un leve beneficio por el tratamiento previo con talidomida. Sin embargo, como la dosis total absorbida del Haz Sólo fue baja porque esos grupos fueron diseñados para explorar el efecto de la dosis de fondo y fueron igualados a la fluencia neutrónica de los grupos tratados por BNCT (Ta+ BPA-BNCT y Ta- BPA-BNCT), la mucositis fue extremadamente leve. Entonces diseñamos dos nuevos grupos (Ta+ adHS y Ta- adHS) a una dosis mayor de Haz Sólo para exacerbar la mucositis en el tejido premaligno (sin exceder los niveles aceptables) y analizar el efecto de la talidomida en la mucositis inducida por radiación, sin tener en cuenta sus efectos sobre la entrega del BPA. Este estudio demostró un efecto protector directo de la talidomida sobre la mucositis, aparentemente no relacionado a los cambios en la entrega del boro. Estos hallazgos concuerdan con el efecto protector de la talidomida sobre la

mucositis experimental descripto previamente (Lima V et al., 2005). Este resultado fue asociado a la actividad inhibitoria de citoquinas de la talidomida. En particular, se ha especulado que el efecto anti-inflamatorio sería parcialmente atribuido a la reducción del TNF-α (Lima V et al., 2005). Sin embargo, no se pueden hacer comparaciones directas entre este estudio y el de Lima y colaboradores (Lima V et al., 2005), porque existen diferencias entre los protocolos de administración cuando la talidomida es utilizada como droga antiangiogénica en períodos cortos para inducir una ventana de normalización vascular y cuando se utiliza como droga anti-inflamatoria.

A pesar que reportamos el incremento en la respuesta tumoral sin costo adicional en términos de mucositis en el tejido premaligno limitante de dosis empleando BNCT secuencial, y un aumento en el éxito terapéutico del BPA-BNCT utilizando una técnica de normalización de los vasos sanguíneos tumorales que además disminuye los efectos radiotóxicos, decidimos combinar ambas modalidades de tratamiento con el objetivo de incrementar aún más la eficacia terapéutica del BNCT.

Si bien los resultados obtenidos con Sec-BNCT y Ta+ BPA-BNCT fueron sumamente alentadores, la implementación de este nuevo protocolo denominado Ta+ Sec-BNCT alcanzó una respuesta tumoral total (respuesta completa + respuesta parcial) del 100±0% de los tumores. Esta respuesta fue significativamente mayor que la alcanzada por Sec-BNCT sin tratamiento previo de normalización con talidomida. Además, la respuesta completa también fue significativamente mayor (87±4%) para los tumores tratados con Ta+ Sec-BNCT que para los que no fueron pre tratados con talidomida (68±5%). Este incremento en el éxito terapéutico fue acompañado por una disminución de la severidad de los efectos radiotóxicos. Este resultado no alcanzó una significancia estadística cuando se analizó en forma conjunta la incidencia de los Grados 3 y 4 de mucositis. Sin embargo, ninguno de los animales tratados con Ta+ Sec-BNCT superó el grado 3 de mucositis, mientras que el 22±14% de los animales sin tratamiento de normalización previo al Sec-BNCT (Ta- Sec-BNCT) alcanzó grado 4 de mucositis. Una posible explicación para esta reducción en los efectos

secundarios está dada por el posible efecto anti-inflamatorio de la talidomida descripto por Lima y colaboradores (Lima V et al., 2005), y anteriormente desarrollado en esta sección.

Adicionalmente, para complementar los resultados obtenidos, y analizar los posibles cambios generados en la microdistribución del GB-10 luego del tratamiento con talidomida y posterior irradiación con BPA, realizamos un estudio por AQL. Este análisis, no sólo mostró una mayor homogeneidad del GB-10 dentro del tumor, sino también en el tejido premaligno. Estos hallazgos nos permitieron concluir que, si bien el GB-10 es un compuesto difusivo, su distribución se ve afectada por la normalización de los vasos sanguíneos; y que esta normalización alcanzaría también al tejido con PMD pese a que los estudios funcionales (como los de permeabilidad) no revelaron cambios significativos. Esta conclusión está avalada por la heterogeneidad en la distribución de boro observada en el tejido normal, demostrando que la distribución del compuesto borado sigue siendo la misma cuando no hay una vasculatura defectuosa para normalizar. Si bien era de esperar que la eficacia terapéutica del BNCT secuencial mejorara con el tratamiento de normalización vascular por el sólo hecho que el control tumoral del BPA-BNCT aumenta significativamente al tratarlo previamente con talidomida, encontramos que la homogenización de la distribución del GB-10 sería una ventaja adicional de esta nueva modalidad.

Si bien esta nueva modalidad se desarrolló esperando un tiempo de 48 hs entre cada una de las aplicaciones de BNCT, ahora resulta evidente que una separación de 24 hs entre irradiaciones podría ser aún mejor. Esto se deduce de los análisis autorradiográficos realizados a lo largo de esta tesis. El análisis por AQT del Sec-24hs-BNCT mostró una mayor homogeneidad del GB-10 dentro del tumor que para Sec-48hs-BNCT, y el análisis por AQL de los tumores tratados con Ta+ Sec-BNCT (siendo 48hs el intervalo entre irradiaciones) también mostró una mayor homogeneidad en la distribución del GB-10. Si bien en el primer caso el aumento de homogeneidad es más sutil (y tiene otro origen) que cuando se realiza el tratamiento de normalización, ambos efectos sumados podrían hacer una mayor contribución al control tumoral. Además, como hemos discutido anteriormente, el pequeño cambio en la distribución del GB-10 para Sec-24hs-

BNCT está asociado a un mayor control tumoral que para Sec-48hs-BNCT (aunque no es estadísticamente significativo). Es posible que la diferencia entre Ta+ Sec-24hs-BNCT y Ta+ Sec-48hs-BNCT no sea muy grande ya que hemos llegado al 100±0% de respuesta tumoral total y a un 87±4% de respuesta completa, pero a la hora de planificar un nuevo tratamiento sería importante tener en cuenta la asociación que existe entre los cambios generados en la distribución de los compuestos borados y los porcentajes de control tumoral. Ya que adicionalmente el tratamiento con talidomida previo al BNCT secuencial incrementó la homogeneidad del GB-10 en el tejido premaligno, sería interesante estudiar el efecto de la normalización de los vasos sanguíneos en dicho tejido. Este tratamiento podría tener un efecto sobre el control de nuevos tumores primarios. Asimismo, algunos autores consideran que la determinación de la efectividad biológica del compuesto (CBE) debería ser una parte fundamental de cualquier nuevo desarrollo aplicado a BNCT (Hopewell JW et al., 2011). Sin embargo es importante destacar que nuestros estudios remarcan la necesidad de cambiar el enfoque de la determinación de estos valores. Si bien es sabido que los factores CBE calculados experimentalmente son más inciertos para los tumores que para los tejidos normales, son tejido específicos y pueden variar con el protocolo de administración del compuesto borado (Coderre JA et al., 2003; Hopewell JW et al., 2011), nuestros resultados enfatizan la necesidad de tener en cuenta la microlocalización del ^{10}B a la hora de calcular estos factores. Asimismo, la dificultad que plantea el cálculo certero de los factores RBE y CBE estaría enfatizando la incertidumbre que actualmente representan las dosis informadas como Gray equivalentes (Gy-Eq). Si bien algunos autores reconocen que las "dosis isoefectivas" de BNCT a fotones casi siempre son incorrectas según el método actual de calcularlas, y plantean nuevas ecuaciones para un cálculo más realista (González SJ y Santa Cruz GA, 2012), aún existe la necesidad de incluir nuevos parámetros para mejorar la equivalencia.

En el contexto de los ensayos clínicos recientes (en curso) de BNCT para cáncer recurrente de cabeza y cuello que mostraron controles tumorales alentadores pero asociados a mucositis limitante de dosis (Kankaanranta L et al., 2007; Kankaanranta L 2012), la búsqueda de una nueva estrategia para BNCT que incremente el control tumoral sin costos adicionales en términos de mucositis es particularmente relevante. Con este trabajo podemos concluir que tanto el BNCT secuencial como la normalización de los vasos sanguíneos tumorales antes de la aplicación de BNCT mediado por BPA, y particularmente la combinación de ambas modalidades podrían ser protocolos prometedores para ensayos clínicos en cáncer de cabeza y cuello, ya que aumentan la respuesta tumoral sin incrementar la toxicidad en el tejido premaligno limitante de dosis.

REFERENCIAS

Aihara T, Morita N, Hiratsuka J, Ono K, Harada T. BNCT for Advanced or Recurrent Head and Neck Cancer. Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Theraphy, Buenos Aires, Argentina. 2010; 25-27.

Aiyama H, Nakai K, Yamamoto T, Nariai T, Kumada H, Ishikawa E, Isobe T, Endo K, Takada T, Yoshida F, Shibata Y, Matsumura A. A clinical trial protocol for second line treatment of malignant brain tumors with BNCT at University of Tsukuba. Appl Radiat Isot. 2011; **69**(12):1819-22.

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.

Altieri S, Braghieri A, Bortolussi S, Bruschi P, Fossati F, Pedroni P, Pinelli T, Zonta A, Ferrari C, Prati U, Roveda L, Barni S, Chiari P, Nano R. Neutron radiography of human liver metastases after BPA infusion. 11th International Congress on Neutron Capture Therapy, Boston, USA. 2004.

Ansiaux R, Baudelet C, Jordan BF, Beghein N, Sonveaux P, De Wever J, Martinive P, Grégoire V, Feron O, Gallez B. Thalidomide radiosensitizes tumors through early changes in the tumor microenvironment. Clin Cancer Res. 2005; **11**(2 Pt 1):743-50.

Armijo JS and Rosenbaum HS. Boron detection in metals by alpha-Particle Tracking. J. Appl. Phys. 1967; **38**(5):2064-2069.

Aromando RF, Pérez MA and Itoiz ME: Characterization of the microvaculature in experimental oral carcinogenesis. In: Abstracts of the XLII Annual Meeting of the Argentine Society for Dental Research, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina, October 2009; abstract 35.

Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. Oral Oncol. 2008; **44**(2):103-8.

Barrett JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. Environ Health Perspect. 1993; **100**:9-20.

Barth RF, Adams DM, Soloway AH, Mechetner EB, Alam F, Anisuzzaman AK. Determination of boron in tissues and cells using direct-current plasma atomic emission spectroscopy. Anal Chem. 1991; **63**(9):890-3.

Barth RF, Coderre JA, Vicente MG, Blue TE. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. Clin Cancer Res. 2005; **11**(11):3987-4002.

Barth RF, Grecula JC, Yang W, Rotaru JH, Nawrocky M, Gupta N, Albertson BJ, Ferketich AK, Moeschberger ML, Coderre JA, Rofstad EK. Combination of boron neutron capture therapy and external beam radiotherapy for brain tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004; **58**(1):267-77.

Barth RF, Joensuu H. Boron neutron capture therapy for the treatment of glioblastomas and extracranial tumours: as effective, more effective or less effective than photon irradiation? Radiother Oncol. 2007; **82**(2):119-22.

Barth RF, Soloway AH, Brugger RM. Boron neutron capture therapy of brain tumors: past history, current status, and future potential. Cancer Invest. 1996; **14**(6):534-50.

Barth RF, Soloway AH, Fairchild RG. Boron neutron capture therapy for cancer. Sci Am. 1990; **263**(4):100-3, 106-7.

Barth RF, Vicente MG, Harling OK, Kiger WS 3rd, Riley KJ, Binns PJ, Wagner FM, Suzuki M, Aihara T, Kato I, Kawabata S. Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer. Radiat Oncol. 2012; **7**:146.

Barth RF. Boron neutron capture therapy at the crossroads: challenges and opportunities. Appl Radiat Isot. 2009; **67**(7-8 Suppl):S3-6.

Bauer KS, Dixon SC, Figg WD.Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent. Biochem Pharmacol. 1998; **55**(11):1827-34.

Bellato ACS, Giné MF, Menegário AA. Determination of B in body fluids by isotope dilution inductively coupled mass spectrometry with direct injection nebulization. Microchem. J. 2004; **77**:119-122.

Bernaola OA, Saint Martin G, Azpiazu Garrido SM. Submicroscopic analysis of damage structure in nuclear tracks. Rad Meas. 2006; **46**:247-252.

Binnie WH, Rankin KV. Epidemiological and diagnostic aspects of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol 1984; 13:333-341.

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.

Bolesina N, Morelatto R, Belardinelli P, Blanc F, Guzmán Mentesana G, Fernández E, Herrera G, López SA. Mortalidad y sobrevida de 89 pacientes con carcinoma de células escamosas de localización bucal de un servicio de Córdoba, Argentina. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica, Los Cocos, Córdoba, Argentina. 2010; 41.

Bortolussi S, Altieri S, Protti N, Stella S, Ballarini F, Bruschi P, Gadan MA, Thorp SI, Miller M, Pozzi ECC, Trivillin VA, Garabalino MA, Molinari AJ, Monti Hughes A, Heber EM, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Schwint AE. ^{10}B Measurement by Alpha Spectrometry and 10B Imaging by Neutron Autoradiography as a Contribution to the Understanding of BNCT Radiobiology in Oral cancer and Liver Metastases Animal Models. Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Therapy. Buenos Aires, Argentina. 2010. p. 59-62.

Bortolussi S. Boron Neutron Capture Therapy of disseminated tumours. Ph.D. Thesis, Dipartimento di Fisica Nucleare e Teorica, Università degli Studi di Pavia. 2007.

Boss CB and Freeden KJ. Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Perkin Elmer, 1999; 2nd. Edition, USA.

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.

Brandizzi D, Chuchurru JA, Lanfranchi HE, Cabrini RL.Analysis of the epidemiological features of oral cancer in city of Buenos Aires. Acta Odon. Latinoamer. 2005; **18**:31-35.

Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE. Clinical features and evolution of oral cancer: a study of 274 cases Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008; **13**(9):E544-8

Buchegger F, Rojas A, Delaloye AB, Vogel CA, Mirimanoff RO, Coucke P, Sun LQ, Raimondi S, Denekamp J, Pèlgrin A, et al. Combined radioimmunotherapy and radiotherapy of human colon carcinoma grafted in nude mice. Cancer Res. 1995; **55**(1):83-9.

Burian J, Marek M, Mares V, Drahota Z. Neutron-capture therapy of brain tumours: neutron sources, neutron-capture drugs, biological tests and clinical perspectives in the Czech Republic. Physiol Res. 1997; **46**(2):93-9.

Cardoso J, Nievas S, Pereira M, Schwint A, Trivillin V, Pozzi E, Heber E, Monti Hughes A, Sanchez P, Bumaschny 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.

Cardoso JE, Trivillin VA, Heber EM, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Itoiz ME, Bumaschny 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.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. 2000; **407**(6801):249-57.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 2003; **9**(6):653-60.

Carpano M, Dagrosa A, Nievas S, Santa Cruz GA, Cabrini R, Juvenal G, Pisarev M. In-vivo studies towards optimizing the application of BNCT to the individual treatment of malignant melanoma. Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Theraphy, Buenos Aires, Argentina. 2010; 111-114.

Casal MR, González SJ, Blaumann HR, Longhino J, Calzetta Larrieu OA, Wemple CA.Comparison of the performance of two NCT treatment planning systems using the therapeutic beam of the RA-6 reactor. Appl Radiat Isot. 2004; **61**(5):805-10.

Cavallo F, Boccadoro M, Palumbo A. Review of thalidomide in the treatment of newly diagnosed multiple myeloma. Ther Clin Risk Manag. 2007; **3**(4):543-52.

Cerniglia GJ, Pore N, Tsai JH, Schultz S, Mick R, Choe R, Xing X, Durduran T, Yodh AG, Evans SM, Koch CJ, Hahn SM, Quon H, Sehgal CM, Lee WM, Maity A. Epidermal growth factor receptor inhibition modulates the microenvironment by vascular normalization to improve chemotherapy and radiotherapy efficacy. PLoS One. 2009; **4**(8):e6539.

Chen B, Pogue BW, Luna JM, Hardman RL, Hoopes PJ and Hasan T: Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications. Clin Cancer Res. 2006; **12**: 917-923.

Chen TC, Wang CP, Ko JY, Yang TL, Lou PJ. The impact of pathologic close margin on the survival of patients with early stage oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2012; **48**(7):623-8.

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.

Coderre JA, Chanana AD, Joel DD, Elowitz EH, Micca PL, Nawrocky MM, Chadha M, Gebbers JO, Shady M, Peress NS, Slatkin DN. Biodistribution of boronophenylalanine in patients with glioblastoma multiforme: boron concentration correlates with tumor cellularity. Radiat Res. 1998; **149**(2):163-70.

Coderre JA, Morris GM. The radiation biology of boron neutron capture therapy. Radiat Res. 1999; **151**(1):1-18.

Coderre JA, Turcotte JC, Riley KJ, Binns PJ, Harling OK, Kiger WS 3rd. Boron neutron capture therapy: cellular targeting of high linear energy transfer radiation. Technol Cancer Res Treat. 2003; **2**(5):355-75.

Czerninski R, Amornphimoltham P, Patel V, Molinolo AA, Gutkind JS. Targeting mammalian target of rapamycin by rapamycin prevents tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. Cancer Prev Res (Phila). 2009; **2**(1):27-36.

Dagrosa MA, Viaggi M, Rebagliati RJ, Batistoni D, Kahl SB, Juvenal GJ, Pisarev MA. Biodistribution of boron compounds in an animal model of human undifferentiated thyroid cancer for boron neutron capture therapy. Mol Pharm. 2005; **2**(2):151-6.

D'amato RJ, Loughnan MS, Flynn E and Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; **91**:4082-4085.

Duda DG, Jain RK, Willett CG.Antiangiogenics: the potential role of integrating this novel treatment modality with chemoradiation for solid cancers. J Clin Oncol. 2007; **25**(26):4033-42.

Eter N, Spitznas M. DMSO mimics inhibitory effect of thalidomide on choriocapillary endothelial cell proliferation in culture. Br J Ophthalmol. 2002; **86**(11):1303-5.

Eveson JW. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. J Oral Pathol. 1981; **10**(3):129-46.

Fairchild RG, Gabel D, Laster BH, Greenberg D, Kiszenick W, Micca PL. Microanalytical techniques for boron analysis using the 10B(n,alpha)7Li reaction. Med. Phys. 1986; **13**(1):50–6.

Fairchild RG, Kahl SB, Laster BH, Kalef-Ezra J, Popenoe EA. In vitro determination of uptake, retention, distribution, biological efficacy, and toxicity of boronated compounds for neutron capture therapy: a comparison of porphyrins with sulfhydryl boron hydrides. Cancer Res. 1990; **50**(16):4860-5.

Fan S, Tang QL, Lin YJ, Chen WL, Li JS, Huang ZQ, Yang ZH, Wang YY, Zhang DM, Wang HJ, Dias-Ribeiro E, Cai Q, Wang L. A review of clinical and histological parameters associated with contralateral neck metastases in oral squamous cell carcinoma. Int J Oral Sci. 2011; **3**(4):180-91.

Fleischer RL, Price P, Walker RM. Nuclear Tracks in Solids. University of California Press, Berkeley. 1975.

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature. 1989; **339**(6219):58-61.

Folkman J. Angiogenesis. Annu Rev Med. 2006; 57:1-18.

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.

Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. Microvasc Res. 2007; **74**(2-3):72-84.

Gabel D, Fairchild RG, Larsson B, Börner HG. The relative biological effectiveness in V79 Chinese hamster cells of the neutron capture reactions in boron and nitrogen. Radiat Res. 1984; **98**(2):307-16.

Gabel D, Holstein H, Larsson B, Gille L, Ericson G, Sacker D, Som P, Fairchild RG. Quantitative neutron capture radiography for studying the biodistribution of tumor-seeking boron-containing compounds. Cancer Res. 1987; **47**(20):5451-4.

Gabel D. Present status and perspectives of boron neutron capture therapy. Radiother Oncol. 1994; **30**(3):199-205.

Gadan MA, Bortolussi S, Postuma I, Ballarini F, Bruschi P, Protti N, Santoro D, Stella S, Cansolino L, Clerici A, Ferrari C, Zonta A, Zonta C, Altieri S. Set-up and calibration of a method to measure 10B concentration in biological samples by neutron autoradiography. Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B. 2012; **274**: 51-56.

Gahbauer R, Gupta N, Blue T, Goodman J, Barth R, Grecula J, Soloway AH, Sauerwein W, Wambersie A. Boron neutron capture therapy: principles and potential. Recent Results Cancer Res. 1998; **150**:183-209.

Garabalino MA, Heber EM, Monti Hughes A, Molinari AJ, , Pozzi EC, Nievas S, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Bauer W, Trivillin VA, Schwint AE. Biodistribution of sodium borocaptate (BSH) for BNCT in the hamster cheek pouch oral cancer model. Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy. Buenos Aires, Argentina. 2010; 130-133.

Garabalino MA, Monti Hughes A, Molinari AJ, Heber EM, Pozzi EC, 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**(1):199-207.

Ghoshal S, Mallick I, Panda N, Sharma SC.Carcinoma of the buccal mucosa: analysis of clinical presentation, outcome and prognostic factors. Oral Oncol. 2006; 42(5):533-9

Gilligan G, Secchi D, Panico R, Calamari S, Barembaum S, Scatena G, Castillo G, Sotomayor C, Azcurra A. Predicción de lesiones potencialmente malignas y malignas a través de variables clínicas y micológicas en pacientes adultos. XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Odontológica, Los Cocos, Córdoba, Argentina. 2010; 142.

Gimenez-Conti I. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. Acta Odontol Latinoam. 1993; **7**(1):3-12.

Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. Physiol Rev. 2011; **91**(3):1071-121.

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. 2004b; **61**(5):1101-5.

González SJ, Carando DG, Bonomi MR. A new approach to determine tumor-to-blood 10B concentration ratios from the clinical outcome of a BNCT treatment. Appl Radiat Isot. 2004a; **61**(5):923-8.

González SJ, Santa Cruz GA. The photon-isoeffective dose in boron neutron capture therapy. Radiat Res. 2012; **178**(6):609-21.

Gonzalez-Moles MA, Scully C, Ruiz-Avila I. Molecular findings in oral premalignant fields: update on their diagnostic and clinical implications. Oral Dis. 2012; 18(1):40-7. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01845.x.

Hagendoorn J, Tong R, Fukumura D, Lin Q, Lobo J, Padera TP, Xu L, Kucherlapati R and Jain RK: Onset of abnormal blood and lymphatic vessel function and interstitial hypertension in early stages of carcinogenesis. Cancer Res. 2006; **66**: 3360-3364.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; **144**(5):646-74.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000; **100**(1):57-70.

Harling OK. Fission reactor based epithermal neutron irradiation facilities for routine clinical application in BNCT--Hatanaka memorial lecture. Appl Radiat Isot. 2009; **67**(7-8 Suppl):S7-11.

Hawthorne MF, Lee MW. A critical assessment of boron target compounds for boron neutron capture therapy. J Neurooncol. 2003; **62**(1-2):33-45.

Heber E, Trivillin VA, Nigg D, Kreimann EL, Itoiz ME, Rebagliati RJ, Batistoni D, Schwint AE. Biodistribution of GB-10 (Na(2)(10)B10H10 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, 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, Hughes AM, 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.

Heber EM, Monti Hughes A, Pozzi EC, Itoiz ME, Aromando RF, Molinari AJ, Garabalino MA, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE. Development of a model of tissue with potentially malignant disorders (PMD) in the hamster cheek pouch to explore the long-term potential therapeutic and/or toxic effects of different therapeutic modalities. Arch Oral Biol. 2010; **55**(1):46-51.

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.

Heikkinen S, Savolainen S, Melkko P. In vitro studies on stability of L-p-boronophenylalanine-fructose complex (BPA-F). J Radiat Res (Tokyo). 2011; **52**(3):360-4.

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.

Hiratsuka J, Aihara, T, Sasaoka S, Fukuda H, Maruhashi A, Ono K. BNCT for skin cancer andadvanced head and neckcancer in Japan. Proceedings of 6th Young Researchers Boron Neutron Capture Therapy Meeting. Hscinchu, Taiwán. 2011; 85-86.

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.

Hopewell JW, Nyman J, Turesson I. Time factor for acute tissue reactions following fractionated irradiation: a balance between repopulation and enhanced radiosensitivity. Int J Radiat Biol. 2003; **79**(7):513-24.

Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. J Control Release. 1998; **53**:49-67.

Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science 2005; **307**:58-62.

Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. Cancer Res. 1987; **47**(12):3039-51.

Jain RK. Understanding barriers to drug delivery: high resolution in vivo imaging is key. Clin Cancer Res. 1999; **5**(7):1605-6.

Jiang SH. Illustation of BNCT process for recurrent head and neck cancer at THOR. Proceedings of the 6th Young Researchers Boron Neutron Capture Therapy Meeting. Hscinchu, Taiwán. 2011; 115-119.

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.

Kamino K, Tillmann T, Boschmann E, Mohr U. Age-related incidence of spontaneous non-neoplastic lesions in a colony of Han:AURA hamsters. Exp Toxicol Pathol. 2001; **53**(2-3):157-64.

Kankaanranta L, Saarilahti K, Koivunoro H, Seppälä T, Hyvönen H, Välimäki P, Atula T, Mäkitie A, Kotiluoto P, Auterinen I, Savolainen S, Joensuu H. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) as the first line treatment in patients with melanoma and head and neck carcinoma. Proceedings of 14th International Congress on Neutron Capture Therapy. Buenos Aires, Argentina. 2010; 531.

Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Saarilahti K, Atula T, Collan J, Salli E, Kortesniemi 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.

Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Saarilahti K, Atula T, Collan J, Salli E, Kortesniemi 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, Kortesniemi 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.

Kato I, Fujita Y, Maruhashi A, Kumada H, Ohmae M, Kirihata M, Imahori Y, Suzuki M, Sakrai Y, Sumi T, Iwai S, Nakazawa M, Murata I, Miyamaru H, Ono K. Effectiveness of boron neutron capture therapy for recurrent head and neck malignancies. Appl Radiat Isot. 2009; **67**(7-8 Suppl):S37-42.

Kato I, Fujita Y, Ohmae M, Sakrai Y, Kumada H, Murata AI, Miyamaru H, Maruhashi A, Kirihata M, Imahori Y, Suzuki M Sumi T, Iwai S, Nakazawa M, Ono K. Boron Neutron Capture Therapy for recurrent head and neck cancer. Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Theraphy, Buenos Aires, Argentina, 2010; 529.

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.

Kawabata S, Miyatake S, Nonoguchi N, Hiramatsu R, Iida K, Miyata S, Yokoyama K, Doi A, Kuroda Y, Kuroiwa T, Michiue H, Kumada H, Kirihata M, Imahori Y, Maruhashi A, Sakurai Y, Suzuki M, Masunaga S, Ono K. Survival benefit from boron neutron capture therapy for the newly diagnosed glioblastoma patients. Appl Radiat Isot. 2009; **67**(7-8 Suppl):S15-8.

Kawabata S, Miyatake S-I, Hiramatsu R, Miyata S, Takekita Y, Doi A, Kuroiwa T, Kirihata M, Sakurai Y, Maruhashi A, Ono K.Phase II Clinical Study of Boron Neutron Capture Therapy combined with X-ray Radiotherapy/Temozolomide in patients with newly diagnosed Glioblastoma Multiforme - Current status report. Proceedings of the 14th International Congress on Neutron Capture Theraphy, Buenos Aires, Argentina. 2010; 9-12.

Kawabata S, Yang W, Barth RF, Wu G, Huo T, Binns PJ, Riley KJ, Ongayi O, Gottumukkala V, Vicente MG. Convection enhanced delivery of carboranylporphyrins for neutron capture therapy of braintumors. J Neurooncol. 2011; **103**(2):175-85.

Kimura Y, Ariyoshi Y, Miyatake S, Shimahara M, Kawabata S, Ono K. Boron neutron capture therapy for papillary cystadenocarcinoma in the upper lip: a case report. Int J Oral Maxillofac Surg. 2009b; **38**(3):293-5.

Kimura Y, Ariyoshi Y, Shimahara M, Miyatake S, Kawabata S, Ono K, Suzuki M, Maruhashi A. Boron neutron capture therapy for recurrent oral cancer and metastasis of cervical lymph node. Appl Radiat Isot. 2009; **67**(7-8 Suppl):S47-9.

Kobayashi T, Kanda K. Analytical calculation of boron- 10 dosage in cell nucleus for neutron capture therapy. Radiat Res. 1982; **91**(1):77-94.

Kondo H, Onuma M, Shibuya H, Sato T. Spontaneous tumors in domestic hamsters. Vet Pathol. 2008; **45**(5):674-80.

Kraft SL, Gavin PR, DeHaan CE, Leathers CW, Bauer WF, Miller DL, Dorn RV 3rd. Borocaptate sodium: a potential boron delivery compound for boron neutron capture therapy evaluated in dogs with spontaneous intracranial tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; **89**(24):11973-7.

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.

Laakso J, Kulvik M, Ruokonen I, Vähätalo J, Zilliacus R, Färkkilä M, Kallio M. Atomic emission method for total boron in blood during neutron-capture therapy. Clin Chem. 2001; **47**(10):1796-803.

Laconi E, Doratiotto S, Vineis P The microenvironments of multistage carcinogenesis. Semin Cancer Biol. 2008; **18**(5):322-9.

Laconi E. The evolving concept of tumor microenvironments. Bioessays. 2007; **29**(8):738-44.

Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. Med Oral. 2003; 8:2-9.

Li SJ, Ren GX, Jin WL, Guo W. Establishment and characterization of a rabbit oral squamous cell carcinoma cell line as a model for in vivo studies. Oral Oncol. 2011; **47**(1):39-44.

Li T, Hamdi J, Hawthorne MF. Unilamellar liposomes with enhanced boron content. Bioconjug Chem. 2006; **17**(1):15-20.

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.

Lima V, Brito GA, Cunha FQ, Rebouças CG, Falcão BA, Augusto RF, Souza ML, Leitão BT and Ribeiro RA: Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and

thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters Eur J Oral Sci. 2005; **113**:210-217.

Liu Y, Suzuki M, Masunaga SI, Chen YW, Kashino G, Tanaka H, Sakurai Y, Kirihata M, Ono K. Effect of bevacizumab treatment on p-boronophenylalanine distribution in murine tumor. J Radiat Res. 2012. [Epub ahead of print]

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.

Maeda H, Kameyama Y. Effect of excisional wounding on DMBA-induced hamster tongue carcinogenesis. J Oral Pathol. 1986;15(1):21-7.

Mandal S, Bakeine GJ, Krol S, Ferrari C, Clerici AM, Zonta C, Cansolino L, Ballarini F, Bortolussi S, Stella S, Protti N, Bruschi P, Altieri S. Design, development and characterization of multi-functionalized gold nanoparticles for biodetection and targeted boron delivery in BNCT applications. Appl Radiat Isot. 2011; **69**(12):1692-7.

Masunaga S, Sakurai Y, Tanaka H, Suzuki M, Liu Y, Kondo N, Maruhashi A, Kinashi Y, Ono K. Effects of employing a ^{10}B-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.

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 Larrieu 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 EC. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address. Cancer Res. 1978; **38**(6):1479-96.

Miller M, Quintana J, Ojeda J, Langan S, Thorp S, Pozzi E, Sztejnberg 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. New era of cell re-discovery led to the control of melanogenesis/melanoma: a scientific journey into terra incognita. Pigment Cell Res. 2001; **14**(1):47-70.

Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN. Animal models in oral cancer research. Oral Oncol. 2006; **42**(5):448-60.

Monti Hughes A, Heber EM, Pozzi E, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Nievas SI, Aromando RF, Itoiz ME, Trivillin VA,Schwint AE.Boron neutron capture therapy (BNCT) inhibits tumor development from precancerous tissue: an experimental study that supports a potential new application of BNCT. Appl Radiat Isot. 2009; **67**(7-8 Suppl):S313-7.

Monti Hughes A, Pozzi EC, Heber EM, Thorp S, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Molinari AJ, Garabalino MA, Nigg DW, Trivillin VA,Schwint AE. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in an oral precancer model: therapeutic benefits and potential toxicity of a double application of BNCT with a six-week interval. Oral Oncol. 2011; **47**(11):1017-22.

Moreira AL, Friedlander DR, Shif B, Kaplan G, Zagzag D. Thalidomide and a thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation in vitro. J Neurooncol. 1999; **43**(2):109-14.

Morelatto RA, López de Blanc SA. Oral cancer mortality in the province of Cordoba, Argentine Republic in the period 1975-2000. A comparative study with other populations. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11(3):E230-5

Mori Y, Suzuki A, Yoshino K, Kakihana H. Complex formation of p-boronophenylalanine with some monosaccharides. Pigment Cell Res. 1989; **2**(4):273-7.

Morris AL, Scott DB, Reiskin AB. Carcinogenesis in the hamster cheek pouch. I. Correlation of histopathology with soluble sulfhydryl groups. Cancer Res. 1961; **21**:1352-9.

Morris AL. Factors influencing experimental carcinogensis in the hamster cheek pouch. J Dent Res. 1961; **40**:3-15.

Morris GM, Coderre JA, Hopewell JW, Micca PL, Rezvani M. Response of rat skin to boron neutron capture therapy with p-boronophenylalanine or borocaptate sodium. Radiother Oncol. 1994; **32**(2):144-53.

Nagano S, Perentes JY, Jain RK, Boucher Y. Cancer cell death enhances the penetration and efficacy of oncolytic herpes simplex virus in tumors. Cancer Res. 2008; **68**(10):3795-802.

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.

Nagy JA, Chang SH, Dvorak AM and Dvorak HF: Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? Br J Cancer. 2009; **100**: 865-869.

Nakai K, Yamamoto T, Aiyama H, Takada T, Yoshida F, Kageji T, Kumada H, Isobe T, Endo K, Matsuda M, Tsurubuchi T, Shibata Y, Takano S, Mizumoto M, Tsuboi K, Matsumura A. Boron neutron capture therapy combined with fractionated photon irradiation for glioblastoma: a recursive partitioning analysis of BNCT patients. Appl Radiat Isot. 2011; **69**(12):1790-2.

Nakai K, Yamamoto T, Aiyama H, Takada T, Yoshida F, Kageji T, Kumada H, Isobe T, Endo K, Matsuda M, Tsurubuchi T, Shibata Y, Takano S, Mizumoto M, Tsuboi K, Matsumura A. Boron neutron capture therapy combined with fractionated photon irradiation for glioblastoma: a recursive partitioning analysis ofBNCT patients. Appl Radiat Isot. 2011; **69**(12):1790-2.

Nemec A, Murphy B, Kass PH, Verstraete FJ.Histological subtypes of oral non-tonsillar squamous cell carcinoma in dogs. J Comp Pathol. 2012 Aug-Oct;147(2-3):111-20.

Nievaart S, Appelman K, Stecher-Rasmussen F, Sauerwein W, Wittig A, Moss R. Extension of the calibration curve for the PGRA facility in Petten. Appl Radiat Isot. 2009; **67**(7-8 Suppl):S362-4.

Ono K. BNCT in Japan – Experiences by KUR. Proceedings of the 6th Young Researchers Boron Neutron Capture Therapy Meeting. Hscinchu, Taiwán. 2011; 189-191.

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.

Opitz OG, Harada H, Suliman Y, Rhoades B, Sharpless NE, Kent R, Kopelovich L, Nakagawa H, Rustgi AK. A mouse model of human oral-esophageal cancer. J Clin Invest. 2002; **110**(6):761-9.

Ozawa T, Afzal J, Lamborn KR, Bollen AW, Bauer WF, Koo MS, Kahl SB, Deen DF. Toxicity, biodistribution, and convection-enhanced delivery of the boronated porphyrin BOPP in the 9L intracerebral rat glioma model. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005; **63**(1):247-52.

Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E and Jain RK: Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. Nature. 2004; **427**: 695.

Palmer MR, Goorley JT, Kiger WS, Busse PM, Riley KJ, Harling OK, Zamenhof RG. Treatment planning and dosimetry for the Harvard-MIT Phase I clinical trial of cranial neutroncapture therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002; **53**(5):1361-79.

Pérez MA and Itoiz ME. Marcadores histoquímicos de la cancerización de campo en la mucosa bucal. Revista de la Facultad de Odontología (UBA). 2004; **19**(47):9-13.

Pérez MA, 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.

Pettersson OA, Carlsson J, Grusell E. Accumulation of 10B in the central degenerative areas of human glioma and colon carcinoma spheroids after sulfhydryl boron hydride administration. Cancer Res. 1992; **52**(6):1587-91.

Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. Exp Cell Res. 2010; **316**(8):1324-31.

Pisarev MA, Dagrosa MA, Juvenal GJ. Boron neutron capture therapy in cancer: past, present and future. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007; **51**(5):852-6.

Portu A, Bernaola OA, Nievas S, Liberman S, Saint Martin G. Measurement of 10B concentration through autoradiography images in polycarbonate nuclear track detectors. Rad. Meas. 2011a; **46**:1154-1159.

Portu A, Carpano M, Dagrosa A, Nievas S, Pozzi E, Thorp S, Cabrini R, Liberman S, Saint Martin G. Reference systems for the determination of 10B through autoradiography images: application to a melanoma experimental model. Appl Radiat Isot. 2011b; **69**(12):1698-701.

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 ECC, Cardoso JE, Colombo LL, Thorp SI, 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.

Probst TU. Methods for boron analysis in boron neutron capture therapy (BNCT). Fresenius J Anal Chem. 1999; 364: 391–403.

Quesada AR, Muñoz-Chápuli R and Medina MA. Antiangiogenic drugs: from bench to clinical trials. Med Res Rev. 2006; **26**: 483-530.

Rao M, Trivillin VA, Heber EM, Cantarelli Mde 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.

Rasheed MH, Beevi SS, Geetha A. Enhanced lipid peroxidation and nitric oxide products with deranged antioxidant status in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2007; **43**(4):333-8.

Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques ME. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. Int J Exp Pathol. 2005; **86**(6):375-81.

Rous P, Kidd JG. A comparison of virus-induced rabbit tumors with the tumors of unknown cause elicited by tarring. J Exp Med. 1939; **69**(3):399-424.

Roveda L, Prati U, Bakeine J, Trotta F, Marotta P, Valsecchi P, Zonta A, Nano R, Facoetti A, Chiari P, Barni S, Pinelli T, Altieri S, Braghieri A, Bruschi P, Fossati F, Pedroni P. How to study boron biodistribution in liver metastases from colorectal cancer. J Chemother. 2004; 16 Suppl **5**:15-8.

Saint Martin G, Bernaola OA, García Bermúdez M, Behar G. Evolution of Ion Track Profiles in Amorphous SiO2. Rad. Meas. 2007; **42**:130-134.

Saint Martin G, Portu A, Santa Cruz GA, Bernaola OA. Stochastic simulation of track density in nuclear track detectors for 10B measurements in autoradiography. 2011; **269**(23):2781-2785

Salley JJ. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. J Dent Res. 1954; **33**(2):253-62.

Santa Cruz GA, González SJ, Bertotti J, Marín J. First application of dynamic infrared imaging in boron neutron capture therapy for cutaneous malignant melanoma. Med Phys. 2009; **36**(10):4519-29.

Santa Cruz GA, Zamenhof RG. The microdosimetry of the (10)B reaction in boron neutron capture therapy: a new generalized theory. Radiat Res. 2004; **162**(6):702-10.

Santis H, Shklar G, Chauncey Hh. Histochemistry of experimentally induced leukoplakia and carcinoma of the hamster buccal pouch. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1964; **17**:207-18.

Sarode SC, Sarode GS, Tupkari JV. Oral potentially malignant disorders: precising the definition. Oral Oncol. 2012; **48**(9):759-60. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.02.025.

Sauerwein W, Zurlo A; EORTC Boron Neutron Capture Therapy Group. The EORTC Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) Group: achievements and future projects. Eur J Cancer. 2002; 38 Suppl 4:S31-4.

Segers J, Di Fazio V, Ansiaux R, Martinive P, Feron O, Wallemacq P, Gallez B. Potentiation of cyclophosphamide chemotherapy using the anti-angiogenic drug thalidomide: importance of optimal scheduling to exploit the 'normalization' window of the tumor vasculature. Cancer Lett. 2006; **244**(1):129-35.

Shelly K, Feakes DA, Hawthorne MF, Schmidt PG, Krisch TA, Bauer WF. Model studies directed toward the boron neutron-capture therapy of cancer: boron delivery to murine tumors with liposomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; **89**(19):9039-43.

Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. Cancer. 2005; **103**(9):1843-9.

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.

Shklar G, Eisenberg E, Flynn E. Immunoenhancing agents and experimental leukoplakia and carcinoma of the hamster buccal pouch. Prog Exp Tumor Res. 1979; **24**:269-82.

Slaga TJ and Gimenez-Conti IB. An animal model for oral cancer. J Natl Cancer Inst Monogr. 1992; (13):55-60.

Soloway AH, Hatanaka H, Davis MA. Penetration of brain and brain tumor. VII. Tumor-binding sulfhydryl boron compounds. J Med Chem. 1967; **10**(4):714-7.

Soloway AH, Tjarks W, Barnum BA, Rong FG, Barth RF, Codogni IM, Wilson JG. The Chemistry of Neutron Capture Therapy. Chem Rev. 1998; **98**(4):1515-1562.

Sonis ST, Eilers JP, Epstein JB, LeVeque FG, Liggett WH Jr, Mulagha MT, Peterson DE, Rose AH, Schubert MM, Spijkervet FK, Wittes JP. Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. Mucositis Study Group. Cancer. 1999; **85**(10):2103-13.

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. 2004a; **2**(1):21-32; discussion 35-6.

Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. Oral Oncol. 1998; **34**(1):39-43.

Sonis ST. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. Oral Oncol. 2009; **45**(12):1015-20.

Sonis ST. Oral mucositis in cancer therapy. J Support Oncol. 2004 b; **2**(6 Suppl 3):3-8.

Strickler JH, Hurwitz HI. Bevacizumab-based therapies in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. Oncologist. 2012; **17**(4):513-24

Sundberg C, Nagy JA, Brown LF, Feng D, Eckelhoefer IA, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. Am J Pathol. 2001; **158**(3):1145-60.

Suzuki M, Endo K, Satoh H, Sakurai Y, Kumada H, Kimura H, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhashi A, Ono K. A novel concept of treatment of diffuse or multiple pleural tumors by boron neutron capture therapy (BNCT). Radiother Oncol. 2008; **88**(2):192-5.

Sweet WH. Early history of development of boron neutron capture therapy of tumors. J Neurooncol. 1997; **33**(1-2):19-26.

Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. J Clin Virol. 2005; **32** Suppl 1:S59-66.

Tonar Z, Egger GF, Witter K and Wolfesberger B: Quantification of microvessels in canine lymph nodes. Microsc Res Tech. 2008; **71**: 760-772.

Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ and Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. Cancer Res. 2004; **64**:3731-3736.

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 BNCT radiobiology. 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.

Tseng S, Pak G, Washenik K, Pomeranz MK, Shupack JL. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. J Am Acad Dermatol. 1996; **35**(6):969-79.

van Oijen MG, Slootweg PJ.Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000; **9**(3):249-56.

Von Moos R, Stolz R, Cerny T and Gillessen S. Thalidomide: from tragedy to promise. Swiss Med Wkly. 2003; **133**:77-87.

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.

Weinstein IB. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. Cancer Res. 1988; **48**(15):4135-43.

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. 2008; **68**(1):66-90.

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.

Yamamoto T, Nakai K, Matsumura A. Boron neutron capture therapy for glioblastoma. Cancer Lett. 2008; **262**(2):143-52.

Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. Cell. 1998; **93**(5):661-4.

Yang W, Barth RF, Wu G, Bandyopadhyaya AK, Thirumamagal BT, Tjarks W, Binns PJ, Riley K, Patel H, Coderre JA, Ciesielski MJ, Fenstermaker RA. Boronated epidermal growth factor as a delivery agent for neutron capture therapy of EGF receptor positive gliomas. Appl Radiat Isot. 2004; **61**(5):981-5.

Yang W, Barth RF, Wu G, Tjarks W, Binns P, Riley K. Boron neutron capture therapy of EGFR or EGFRvIII positive gliomas using either boronated monoclonal antibodies or epidermal growth factor as molecular targeting agents. Appl Radiat Isot. 2009; **67**(7-8 Suppl):S328-31.

Yang Y, Ge JP and Zhou ZT. Effects of thalidomide on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamster with respect to angiogenesis. J Oral Pathol Med. 2009; **38**:455-462.

Yeo SG, Kim JS, Cho MJ, Kim KH, Kim JS. Interstitial fluid pressure as a prognostic factor in cervical cancer following radiation therapy. Clin Cancer Res. 2009; **15**(19):6201-7.

Znati CA, Rosenstein M, Boucher Y, Epperly MW, Bloomer WD, Jain RK. Effect of radiation on interstitial fluid pressure and oxygenation in a human tumor xenograft. Cancer Res. 1996; **56**(5):964-68.

Zonta A, Pinelli T, Prati U, Roveda L, Ferrari C, Clerici AM, Zonta C, Mazzini G, Dionigi P, Altieri S, Bortolussi S, Bruschi P, Fossati F. Extra-corporeal liver BNCT for the treatment of diffuse metastases: what was learned and what is still to be learned. Appl Radiat Isot. 2009; **67**(7-8 Suppl):S67-75.

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. JPCS. 2006; **41**:484-495.

Zygogianni AG, Kyrgias G, Karakitsos P, Psyrri A, Kouvaris J, Kelekis N, Kouloulias V. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. Head Neck Oncol. 2011; **3**:2.