



ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN Y EFICACIA TERAPÉUTICA *IN VIVO* DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER

“Tesis presentada para optar al título de Doctor en Tecnología Nuclear”

Autor:

Lic. Marcela A. Garabalino

Directora:

Dra. Amanda E. Schwint

Co-directora:

Dra. Verónica A. Trivillin

Lugar de trabajo:

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

Buenos Aires, 2016

Estudios de biodistribución y eficacia terapéutica *in vivo* de la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) en modelos experimentales de cáncer

Resumen

El desafío en las terapias oncológicas es desarrollar estrategias que dañen selectivamente a las células malignas, minimizando el efecto en tejidos normales. La terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) brindaría esta posibilidad. BNCT aplica la tecnología nuclear al área biomédica y es una modalidad de tratamiento binario que combina la administración de compuestos borados que se acumulan selectivamente en el tumor y la irradiación externa con neutrones. El ^{10}B interactúa con neutrones de baja energía desencadenando una reacción de captura que da lugar a la formación de una partícula alfa (^4He) y un núcleo de ^7Li de alta transferencia lineal de energía (LET), rango corto (5 a 10 micrómetros) y alta eficacia biológica relativa (RBE). Esta modalidad terapéutica permitiría así dañar los tejidos tumorales sin producir daño significativo al tejido normal.

Nuestro grupo propuso y demostró por primera vez la eficacia terapéutica de BNCT para el tratamiento del cáncer oral en un modelo experimental en la bolsa de la mejilla del hámster. Nosotros analizamos distintos agentes portadores de boro y protocolos de administración, como así también evaluamos nuevos protocolos de tratamiento y algunos aspectos del mecanismo de acción de BNCT. El objetivo general de éste trabajo fue realizar estudios de biodistribución de boro empleando diferentes portadores y/o estrategias de administración de compuestos borados en los modelos experimentales de cáncer oral en hámster, de metástasis colorrectal en hígado o en pulmón de ratas BDIX y en pulmón normal de oveja, para evaluar la potencial ventaja terapéutica para BNCT de nuevos compuestos transportadores de boro y/o nuevas estrategias de administración. A partir de los estudios de biodistribución en el modelo experimental de cáncer oral en hámster se seleccionaron dos de los protocolos con potencial terapéutico y se estudió la eficacia terapéutica y la potencial radiotoxicidad de BNCT *in vivo*.

Los estudios de biodistribución y farmacocinética con los distintos protocolos de administración de compuestos borados en los diferentes modelos experimentales *in vivo* demostraron la incorporación selectiva de boro al tumor en cantidades potencialmente terapéuticas que no provocarían daño significativo al tejido normal. Los resultados de los estudios de BNCT *in vivo* realizados mostraron un aumento de la eficacia terapéutica de BNCT para el tratamiento de cáncer oral sin radiotoxicidad aparente.

Palabras clave: Captura Neutrónica en Boro; BNCT; modelos experimentales de cáncer *in vivo*; estudios de biodistribución de boro; estudios de eficacia terapéutica de BNCT.

***In vivo* studies of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in experimental cancer models: boron biodistribution and therapeutic efficacy**

Abstract

The challenge of oncological treatments today is to develop strategies that will damage tumor cells selectively, while preserving normal tissue. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) would afford that possibility. BNCT applies nuclear technology to biomedicine and is a binary treatment that combines the administration of boron carriers that are taken up preferentially by neoplastic tissue and irradiation with a thermal/epithermal neutron beam. The high linear energy transfer (LET) alpha particles and recoiling lithium-7 (^7Li) nuclei emitted during the capture of a thermal neutron by a boron-10 (^{10}B) nucleus have a high relative biological effectiveness (RBE). Their short range in tissue (6–10 μm) would limit the damage largely to cells containing ^{10}B . In this way, BNCT would target neoplastic tissue selectively, sparing normal tissue.

Our group proposed and demonstrated for the first time the therapeutic efficacy of BNCT for the treatment of oral cancer in an experimental model in the hamster cheek pouch. We assessed the therapeutic potential of different boron carriers and administration protocols, novel treatment strategies and some aspects of the mechanisms involved in the effect of BNCT on tumor and normal tissues. The general aim of the present study was to perform boron biodistribution studies with different boron carriers and/or administration protocols in experimental models of oral cancer in hamster, colorectal cancer liver metastasis and diffuse lung metastasis in BDIX rats and in a preclinical sheep model of healthy lung to evaluate the potential therapeutic advantage for BNCT of new boron compounds and/or novel administration strategies for different tumor types and localizations. Based on the biodistribution studies in the experimental model of oral cancer in the hamster cheek pouch we selected two of the protocols with therapeutic potential for evaluation in radiobiological BNCT studies. We studied the therapeutic efficacy and potential radiotoxicity of these protocols *in vivo*.

The biodistribution and pharmacokinetic studies with the different administration protocols employing different boron compounds in the various experimental models *in vivo* evidenced the selective tumor uptake of therapeutically useful boron concentration levels that would not cause significant damage to normal tissue in the treatment volume. The *in vivo* BNCT studies showed improved therapeutic efficacy of BNCT for the treatment of oral cancer without radiotoxicity.

Key words: Boron Neutron Capture Therapy; BNCT; *in vivo* models of cancer; boron biodistribution studies, studies of the therapeutic efficacy of BNCT.

**El presente trabajo de tesis dio lugar a seis publicaciones en revistas internacionales,
con referato de pares:**

1. Boron neutron capture therapy (BNCT) for the treatment of liver metastases: biodistribution studies of boron compounds in an experimental model. **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. Radiation Environmental Biophysics 50(1):199-207 (2011).
2. Boron delivery with liposomes for boron neutron capture therapy (BNCT): biodistribution studies in an experimental model of oral cancer demonstrating therapeutic potential. 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. Radiation Environmental Biophysics 51(2):195-204 (2012).
3. Biodistribution of sodium borocaptate (BSH) for boron neutron capture therapy (BNCT) in an oral cancer model. **Garabalino MA**, Heber EM, Monti Hughes A, González SJ, Molinari AJ, Pozzi EC, Nievas S, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Bauer W, Trivillin VA, Schwint AE. Radiation Environmental Biophysics 52(3):351-61 (2013).
4. Boron biodistribution for BNCT in the hamster cheek pouch oral cancer model: combined administration of BSH and BPA. **Garabalino MA**, Heber EM, Monti Hughes A, Pozzi EC, Molinari AJ, Nigg DW, Bauer W, Trivillin VA, Schwint AE. Applied Radiation and Isotopes 88:64-8 (2014).
5. Biodistribution of the boron carriers boronophenylalanine (BPA) and/or decahydrodecaborate (GB-10) for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in an experimental model of lung metastases. Trivillin VA, **Garabalino MA**, Colombo LL, González SJ, Farías RO, Monti Hughes A, Pozzi EC, Bortolussi S, Altieri S, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Schwint AE. Applied Radiation and Isotopes 88:94-8 (2014).
6. Therapeutic efficacy of boron neutron capture therapy mediated by boron-rich liposomes for oral cancer in the hamster cheek pouch model. Heber EM, Hawthorne MF, Kueffer PJ, **Garabalino MA**, Thorp SI, Pozzi EC, Monti Hughes A, Maitz CA, Jalisatgi SS, Nigg DW, Curotto P, Trivillin VA, Schwint AE. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 111(45):16077-81 (2014).

Agradecimientos

Es mucha la gente a quien quiero agradecer por haberme acompañado en la tarea de realizar y escribir éste trabajo de tesis. Quizás, para algunas personas hacer una tesis sea meramente un trámite para cumplir con ciertas normas establecidas. Pero para mí, no fue así. En particular, en los años que me llevó realizarla, hubo muchos cambios en mi vida personal, que no fueron ajenos a los esfuerzos laborales y personales realizados, no sólo por mí, sino por mucha gente que me contuvo, sostuvo y apoyó incondicionalmente, para que hoy pudiera concretar uno de los sueños de mi vida, y a la cual le voy a estar sumamente agradecida por la posibilidad de conocer y conservar nuevos amigos y en algunos casos especiales, hasta ser parte de su “familia”. Seguramente, la lista no estará del todo completa, por eso quiero disculparme por alguna omisión u olvido (totalmente involuntario).

A Mandy por ser amiga, directora, mentora, excelente profesional, “oreja”, “psicóloga”, “asesora de imagen”, “consejera”, entre muchas otras virtudes que ella posee. Gracias por todo lo mencionado y mucho más. Pero especialmente por haberme dado la oportunidad en la vida de realizar un doctorado, cuando mis condiciones no eran las del “manual universal del tesista doctoral”. También, por todos los LUV y SISUs enviados! Pero debo destacar que principalmente estoy agradecida de por vida, por haberme acompañado, como amiga y jefa, en el intenso y arduo camino que me llevó a ser mamá. GRACIAS!

A Vero, por ser amiga, co-directora, mentora, “compinche”, compañera de viaje, “levantadora de ánimo”, “asesora de relaciones públicas en congresos”, “consultora de opiniones” y por enseñarme muchas cosas del trabajo!!! Pero, al igual que a Mandy, voy a estar eternamente agradecida a ella y su familia (Diego, Cami, Lu, Lauti y Fido) por habernos apoyado, contenido y albergado “incondicionalmente” a mi hija y a mí, en uno de los momentos más arduos del camino de mi vida. GRACIAS por habernos dado “calor de hogar”!

A Lisien por ser amiga, co-equiper, por sentir placer de trabajar a su lado, por diseñar sueños (no sólo bolsas de anaerobiosis), por enseñarme y subrayarme las prioridades de la vida, por su energía y por ser ese modelo de persona que posee en su interior un ave fénix (ya que ella siempre resurge de sus cenizas). GRACIAS por tu positividad, amabilidad, calidez y dulzura.

A Andre por ser amiga, “mi querida”, compañera de risas (especialmente por Peter Capusoto), compañera de viajes (a lugares con lagunas que no existen!), compañera de estudio, “solucionadora” de situaciones donde “acá hay algo mal”, “agente de viaje”, especialista en obtención de papers (no disponibles en PubMed), transmisora de buena onda y positivismo y en especial en ésta tesis, por ayudarme con la lista de referencias!!!

A Emi, por ser amigo y único varón del Team (que soporta tantas brujas!), por dar opiniones en los momentos justos, por ofrecerme su casa (en momentos difíciles), por estar en las buenas y en las malas, por su amabilidad, su objetividad y por sobre todo su humanidad. También por prestarme la cuna para Anto!!!

A Dave por su siempre presente generosidad y amabilidad; por la donación del compuesto borado GB-10!

A Betty, por ser consejera, compañera de viaje en auto, narradora de experiencias de vida, de historias de la CNEA, por las frases “editadas por Betty”, por los asesoramientos y diagnósticos telefónicos pediátricos de Kiko en cualquier día y horario (totalmente acertados!) pero sobre todo, por el cariño y respeto que le tengo. GRACIAS!

A Moni, por ser amiga (de esas amigas especiales llenas de luz y gran corazón), por su calidez, sensibilidad y por enseñarme a conocer mi interior. Quiero agradecerle principalmente, por ser de esas pocas personas que en la vida están “estoicamente” cuando uno las necesita, especialmente por haber acompañado a mi familia y a mí, en momentos difíciles. GRACIAS!

A Euge y Johana, por su amistad, por su compañerismo, por los viajes juntas, por escuchar, por los desayunos, por ser tan tiernas, amables y principalmente por ser excelentes personas!!! A Johana por ser la “oreja” de Anto para dormir. A “Uge” por ser “abuela postiza” de Anto, por animarse a ser la primera en subirse al auto y permanecer “callada”... pero muy especialmente, por sus grandiosas, únicas y deliciosas empanadas!

A Marisil, por ser amiga y “oreja” durante los viajes de avión, compañera de cuarto, excelente compañera de trabajo, por saber respetar silencios y opiniones, por ser cómplices sólo con mirarnos, por tener principios y códigos de amistad (que pocas personas conservan en la actualidad) pero por sobre todo, GRACIAS por todo el ánimo y apoyo para ésta tesis!

A Agus, y Gisele, por ser generosas, afectuosas y maravillosas personas. En especial a Gisele, por sus recetas y por el tan preciado chal azul tejido a telar! A Agus, por compartir chistes con la “misma onda”, por su sinceridad y por tomar un café juntas cuando lo necesitaba.

A Mary, por ser una persona excelente, amable, eficiente, muy tierna y por tenerme tanta paciencia en enseñarme a hacer los “benditos” expedientes!

A Coco, por ser tan bueno y por los chistes que levantan el ánimo!

A todas las “comensales” de los grandiosos almuerzos de todos los mediodías que compartieron grandes momentos!

A Ramón, por su generosidad, por ser un referente (tanto en lo humano como en lo profesional), por escuchar, por respetar opiniones, por haber confiado en mí, por todo lo que él me aprecia y respeta, por todo lo yo lo aprecio y respeto, pero en especial por haberme apoyado en todo lo que necesité en momentos delicados de mi vida. GRACIAS!

A Gustavo, por ser una de las personas más transparentes, responsables y con muy buenas intenciones que conocí. Por saber escuchar y por dejarme opinar. Por ser tan respetuoso y amable. Por el profesionalismo y pasión que pone diariamente en el trabajo. GRACIAS!

A Sarita, Rubén y Lucas, por ser tan buenas personas y excelentes profesionales. A Rubén, por los mates. A Lucas, por ser tan amable y respetuoso del prójimo. A Sarita, por las largas charlas (profesionales y de las otras!) tan divertidas. GRACIAS!

A Lucas y Jorge, por ser seres humanos admirables y fabulosos profesionales. A Lucas, por su frescura, humor, inteligencia, espontaneidad y a pesar de creer que sus enseñanzas y datos son irrelevantes, son las historias más estupendas y fantásticas que uno siempre quiere escuchar. A Jorge, por su excelencia profesional, pero particularmente por su indescriptible, distinguida y asombrosa calidad humana. GRACIAS, por haber sido mi cirujano!

A Paula y Silvia, por ser personas excelentes y maravillosas profesionales! Por todos los hamsters irradiados que compartimos juntas!!!

A Nahuel, por ser tan buena persona, responsable y extraordinario profesional. Por ser insistente en conseguir sus objetivos y lograrlos. Por compartir irradiaciones, presentaciones de pósters y haber hecho temblar a muchos hamsters! Pero por sobre todo, por sus “largas” y tediosas respuestas a los mails: OK!

A Mariel, por ser tan dulce, por dar cátedra de vida. Por ser ejemplo, tanto en lo profesional, como en lo humano. GRACIAS!

Al Dr. Cabrini, por su cariño, calidez y por sus consultas gratuitas como profesional! En particular debo agradecerle por la generosidad, el tiempo y la dedicación que tuvo para tratar de solucionar temas de salud de mi hija o míos. GRACIAS!

A Iara, por su humor, su sencillez y por ayudarme con el índice de la tesis!!!

Agradezco a la CNEA, a la Universidad de San Martín, al Instituto Dan Beninson, a la ANPCyT y el CONICET, por los recursos asignados a nuestros proyectos que sirvieron para realizar esta tesis.

Al Dr. Furnari, por darme la posibilidad de trabajar en la CNEA, prestigiosa institución nacional e internacional.

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

Al Dr. Pizarro, por haber confiado en mí, por su apoyo profesional y por ser un excelente jefe.

Al Dr. Santa Cruz, por respaldar y comprometerse con el proyecto de BNCT. Por ser un estupendo jefe.

A mi hija, el sol de todos mis días. Gracias por haberme elegido para ser tu mamá. Por las horas que pasamos viajando en auto, cambiando pañales o tomando la mamadera por la Gral. Paz. Por las veces que te dejé tempranito en el jardín y otras que te busqué tarde, porque tenía que trabajar. Porque a pesar de tu corta edad, te siento mi compañera. Porque escuchaste, junto a tus amigos (los muñecos de peluche) horas de estudios de mamá. Por dejarme aprender junto a vos, la tarea diaria de ser mamá. Porque, literalmente sos la persona “más importante de mi vida”. GRACIAS por haberme dado el mejor título! Tu mamá que te ama incondicionalmente hasta el infinito y mas allá!!!

A mi mamá, por ser esa guerrera que desde mi nacimiento luchó valientemente por nuestras vidas. Por ser modelo de mujer y madre (luego, de padre). Por enseñarme que, cuando uno se cae, hay que levantarse. Por su humor, positividad, constancia y optimismo. Por sus grandes esfuerzos (de todo tipo) para que hoy pueda ser lo que soy. Por atreverse a ser una mamá moderna, compinche, compañera, pero por sobre todo totalmente incondicional. Por todo el amor que siempre sentí y siento de ella. GRACIAS por estar siempre y ser la mejor abuela de Anto!

A mi papá, que a pesar que Dios me lo prestó por los primeros años de mi vida, siempre sentí que estaba al lado mío y eso hizo que tuviera fuerzas para seguir, en momentos difíciles. Quiero agradecerte, por todo lo que me diste, por todo lo que soy y decirte que estoy muy orgullosa de ser tu hija!

A mi hermana Claudia, por haberme salvado la vida en mi nacimiento. Por estar siempre. Por ser mi compañera. Por haber hecho muchos esfuerzos en su vida, junto a mi madre, para que hoy, Guille y yo, seamos personas honestas y de bien. Por ser una segunda mamá y la mejor (y única) tía de Anto!!

A Oscar, por haberme apoyado, ayudado y alentado a terminar mi carrera y mi tesis. Porque, aunque hoy estemos en otra etapa de nuestras vidas, luchamos y pasamos muchas adversidades juntos para ser papas. GRACIAS por nuestra hija. Sin vos, Anto no sería ella.

A Guille, Meli, Guada y Chucho, por ser personas excelentes, por tener gran corazón y porque los quiero un montón!

A mi padrino Ramón y mi tía Susana, porque desde el lugar donde estén ahora (juntos!) quiero darles las gracias por haberme querido tanto y por hacerme sentir tan orgullosa de ustedes. Gracias por enseñarme en la vida la palabra GENEROSIDAD!

A mis "primos", Clau, Anahí y Gustavo, por todos los momentos de nuestra infancia juntos. Por estar siempre, en las buenas y en las malas. Porque los quiero un montón!

A Fer, más que mi amiga, mi hermana del corazón. Por estar siempre a mi lado. Por su nobleza. Por la importancia que siempre le dio a la amistad. Por tantos momentos, lindos y no tan lindos, que pudimos compartir en éstos (36?) años de amistad. Por tener la valentía y la honestidad de decirme lo que siempre piensa y darme la libertad para hacer lo mismo con ella. GRACIAS a vos, Micky, Maca y Nico, por dejarme ser parte la "familia".

A Terry, Pancho y Flora, mi familia mascotera, aunque la vida sea injusta y sólo nos preste el amor incondicional de estos seres maravillosos, por unos pocos años.

A Alberto y Alicia, personas de enorme corazón, que siempre me alentaron en mi vida y mi carrera. GRACIAS!

A Lau y Dani, de esas amigas que uno ve poco (por la vida, tan ocupada), pero que siempre están en mi corazón.

A Clari y Maru, por su incondicional apoyo y por las largas tardes de mate, estudio y charlas de la vida!

A Pau (mamá de Malena), a Rocío, Leo y Nora (papás y abuela de Alejo y recientemente de Noah), a Flor y Pato (papás de Delfina y Martina) y a Ale (mamá de Agustina) por cuidar de Anto y aguantarme para que pudiera terminar la tesis!!! GRACIAS!!!

Por último, y especialmente, quiero agradecer a Dios.

A Antonella,
el milagro que Dios me concedió en la vida

Indice

Introducción

1. Consideraciones generales sobre el cáncer y las terapias actuales	1
1.1 Aspectos generales del cáncer y sus terapias actuales	1
1.2 Aspectos generales sobre las radiaciones	6
2. Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT)	10
2.1 Radiobiología de BNCT	14
2.2 Biodistribución de compuestos borados	18
2.2.1 Conceptos generales de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción de compuestos (ADME)	18
2.2.2 Biodistribución de compuestos borados para BNCT	24
2.3 Clasificación de compuestos borados	26
2.3.1 BPA (p-Boro fenilalanina)	36
2.3.2 BSH (Mercaptoundecahidro- <i>c/oso</i> -dodecaborato de sodio ó Borocaptato de sodio)	42
2.3.3 GB-10 (Decahidrododecaborato de sodio)	47
2.3.4 Liposomas MAC y MAC+TAC	50
2.4 Técnicas analíticas para la medición de boro y sus isótopos	52
2.4.1 Técnicas y principios de funcionamiento	52
2.4.4.1 Técnicas basadas en plasmas	54
2.4.4.2 Técnicas no basadas en plasmas	59
3. Fuente de neutrones	60
4. Historia y antecedentes clínicos de BNCT	62
4.1 BNCT a nivel mundial	62
4.2 Proyecto de BNCT en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)	66

Objetivos

1. Hipótesis y objetivos	68
2. Breve reseña de los tipos de cáncer, modelos experimentales utilizados y objetivos particulares de ésta tesis	70
2.1 Cáncer colorrectal	71
2.1.1 Metástasis hepáticas de cáncer colorrectal	71
2.1.2 Antecedentes de estudios experimentales y clínicos de biodistribución de boro para metástasis hepáticas de cáncer colorrectal	73
2.1.3 Modelo experimental de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal en ratas BDIX	78

2.1.4	Objetivo particular de ésta tesis referido al modelo de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal	79
2.2	Cáncer de pulmón	79
2.2.1	Metástasis difusas pulmonares	80
2.2.2	Antecedentes de estudios experimentales y clínicos de biodistribución de boro para metástasis difusas pulmonares	82
2.2.3	Modelo experimental de metástasis difusas pulmonares de cáncer colorrectal en ratas BDIX	83
2.2.4	Modelo pre-clínico de pulmón sano en ovinos	84
2.2.5	Objetivos particulares de ésta tesis referidos al modelo de metástasis difusas pulmonares de cáncer de colon en rata y al modelo pre-clínico de pulmón sano en ovinos	86
2.3	Cáncer de cabeza y cuello	86
2.3.1	Cáncer oral	88
2.3.2	Antecedentes de estudios experimentales , pre-clínicos y clínicos de biodistribución de boro y eficacia terapéutica de BNCT para cáncer oral	92
2.3.3	Modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster	99
2.3.4	Electroporación/Electroquimioterapia	101
2.3.5	Objetivos particulares de ésta tesis referidos al modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster	104

Materiales y Métodos

1.	Desarrollo de nódulos hepáticos en el modelo experimental de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal en ratas BDIX	106
1.1	Cultivo de células DH/DK12/TRb	106
1.2	Método de inoculación sub-capsular de células DH/DK12/TRb en hígado de ratas	106
2.	Desarrollo de metástasis pulmonares difusas en el modelo experimental de metástasis pulmonar de cáncer colorrectal en ratas BDIX	108
2.1	Cultivo de células DH/DK12/TRb	108
2.2	Método de inoculación intra-yugular de células DH/DK12/TRb para inducir metástasis difusas en pulmón de ratas BDIX	108
3.	Evaluación y optimización del procedimiento quirúrgico en el modelo ovino	109
4.	Inducción de tumores exofíticos en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster	110
5.	Preparación de las soluciones de compuestos borados	111
5.1	Soluciones de BPA (p-borofenilalanina)	111
5.2	Soluciones de GB-10 (Decahidrodecaborato de sodio)	112
5.3	Soluciones de BSH (Borocaptato de sodio)	112
5.4	Liposomas MAC y liposomas MAC+TAC	113

6. Estudios de Biodistribución	114
6.1 Estudios de Biodistribución en el modelo de metástasis hepáticas con BPA, GB-10 BPA+GB-10	114
6.2 Estudios de Biodistribución en el modelo de metástasis pulmonares difusas con BPA, GB-10 y BPA+GB-10	116
6.3 Estudios de Biodistribución en pulmón sano de oveja con BPA	117
6.4 Estudios de Biodistribución en el modelo de cáncer oral con BSH y BSH+BPA	118
6.5 Estudios de Biodistribución en el modelo de cáncer oral con liposomas MAC y liposomas MAC+TAC	121
6.6 Estudios de Biodistribución en el modelo de cáncer oral con GB-10+Electroporación	123
7. Medición de concentración de boro en sangre y tejidos	126
7.1 Procesado de las muestras para medición de la concentración de boro por ICP-OES	126
7.2 Valoración de la concentración de boro por ICP-OES	127
7.3 Procesado de las muestras para medición de la concentración de boro por ICP-MS	128
7.4 Valoración de la concentración de boro por ICP-MS	128
7.5 Autorradiografía Neutrónica Cualitativa de boro	129
8. Estudios de BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cáncer oral	130
8.1 Ensayos de BNCT/MAC+TAC	130
8.2 Ensayos de BNCT/GB-10+EP	133
9. Seguimiento <i>in vivo</i> post tratamiento con BNCT en el modelo de cáncer oral en hámster	135
9.1 Estado general de los animales y cinética del desarrollo tumoral	135
9.2 Evaluación de la mucositis	136
9.3 Análisis Estadístico de los resultados de los ensayos de biodistribución y eficacia terapéutica de BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cáncer oral en hámster	136

Resultados

1. Estudios de Biodistribución con compuestos borados	138
1.1 Estudios de Biodistribución en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX con BPA, GB-10 y BPA+GB-10	138
1.1.1 Discusión	142
1.1.2 Conclusión	144
1.2 Estudios de Biodistribución en el modelo de metástasis pulmonares difusas en ratas BDIX con BPA, GB-10 y BPA+GB-10	145
1.2.1 Discusión	147
1.2.2 Conclusión	149
1.3 Estudios de Biodistribución en el modelo de pulmón sano de oveja	150
1.3.1 Discusión	153
1.3.2 Conclusión	154

1.4	Estudio de Biodistribución en el modelo de cáncer oral en hámster con BSH	156
1.4.1	Discusión	161
1.4.2	Conclusión	165
1.5	Estudio de Biodistribución en el modelo de cáncer oral en hámster con BSH+BPA	167
1.5.1	Discusión	168
1.5.2	Conclusión	169
1.6	Estudio de Biodistribución en el modelo de cáncer oral con liposomas MAC y liposomas MAC+TAC	170
1.6.1	Discusión	175
1.6.2	Conclusión	178
1.7	Estudio de Biodistribución en el modelo de cáncer oral en hámster con GB-10 y Electroporación	179
1.7.1	Discusión	181
1.7.2	Conclusión	184
2.	Estudios de eficacia terapéutica y radiotoxicidad de BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster	185
2.1	Estudios de BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cáncer oral con liposomas MAC+TAC	185
2.1.1	Discusión	189
2.1.2	Conclusión	191
2.2	Estudios de BNCT <i>in vivo</i> en el modelo de cáncer oral con GB-10 + Electroporación	192
2.2.1	Discusión	197
2.2.2	Conclusión	198
	<u>Discusión general</u>	200
	<u>Conclusión general</u>	214
	<u>Referencias</u>	215

Introducción

1. Consideraciones generales sobre el cáncer y las terapias actuales

1.1 Aspectos generales del cáncer y sus terapias actuales

El cáncer comprende un grupo de enfermedades que comparten una serie de características comunes, principalmente fallas en la regulación del crecimiento (Gómez y Alonso, 1° edición 1998). A pesar de los años de investigación dedicados por la comunidad científica, no se ha logrado aún una cura definitiva.

Las primeras evidencias de que el cáncer era una enfermedad genética se sitúan a principios del siglo XX (1914), cuando Theodore Boveri concluyó, a partir de experimentos realizados en erizos de mar, que las alteraciones del crecimiento y desarrollo relacionadas con el cáncer en especies animales podían deberse a anomalías cromosómicas (Gómez y Alonso, 1° edición 1998). Un siglo después que Theodore Boveri presentara éste punto de vista conocido como “Teoría de la Mutación Somática de la Carcinogénesis” (Somatic Mutation Theory, SMT), otros grupos de científicos como Soto y Sonnenschein, adhirieron a una teoría alternativa, denominada “Teoría de la Organización del Campo Tisular” (Tissue Organization Field Theory of carcinogenesis and metastasis, TOFT), la cual postula que el cáncer es una enfermedad transmitida por el tejido y que la proliferación es el estado por defecto de todas las células (Soto y Sonnenschein, 2011, 2013). Aunque la SMT no ha sido comprobada fehacientemente, sigue siendo en la actualidad la teoría prevalente del origen del cáncer, que intenta explicar cómo surgen las neoplasias y como se desarrollan los tumores (Soto y Sonnenschein, 2011).

Podemos entonces definir al cáncer como una enfermedad multigénica y multicelular que puede originarse en todos los tipos celulares y órganos con una etiología multifactorial (Baskar et al., 2012). En el cáncer se producen cambios dinámicos en el genoma de las células, basados en mutaciones que producen oncogenes y genes supresores de tumores, ya sea en células cancerosas humanas y de animales (Hanahan y Weinberg, 2000). También podemos agregar que las características del cáncer no sólo son el resultado de mutaciones oncogénicas, sino que además se encuentran influenciadas por propiedades bioquímicas y biomecánicas de las estructuras que rodean al tumor (ej. matriz extracelular). Durante la progresión tumoral, los tumores se desarrollan a partir de poblaciones de células heterogéneas que contienen diferentes mutaciones oncogénicas, las cuales pueden interactuar con el microambiente tumoral de diferentes maneras (Pickup et al., 2014).

Hace más de 10 años, los investigadores Hanahan y Weinberg, enumeraron seis alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente establecen el crecimiento maligno de un tumor, a las cuales llamaron “Señas de Identidad”. Estas son: autonomía en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado y angiogénesis continua e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan

yWeinberg, 2000). En el año 2011, estos mismos autores plantearon agregar dos características más, a las seis ya existentes: capacidad de reprogramar el metabolismo celular para favorecer la proliferación y capacidad de evadir el sistema inmune. En el mismo trabajo establecieron que la mutación, la inestabilidad genómica, la promoción tumoral por parte de la inflamación y la constitución de un microambiente tumoral son elementos decisivos para la adquisición de estas “Señas de Identidad” (Hanahan y Weinberg, 2011) (Fig. 1I).

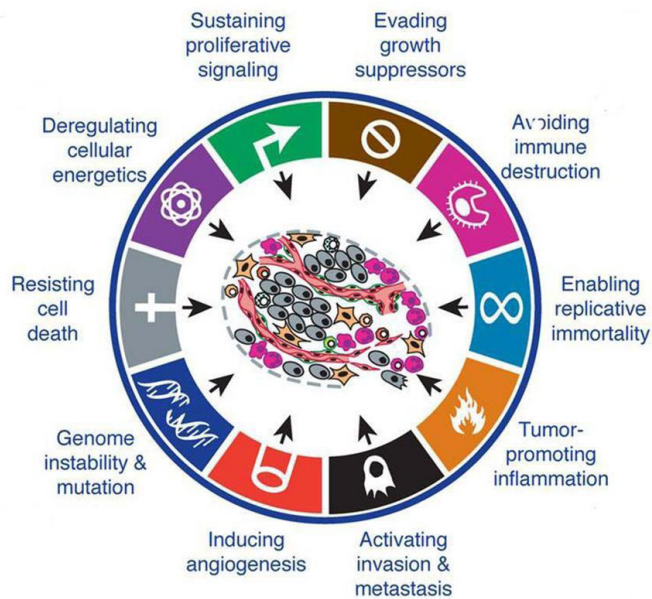


Fig.1I. Alteraciones fisiológicas en el crecimiento de un tumor maligno “Señas de Identidad” (Hanahan y Weinberg, 2011).

Sin embargo, éste modelo de señas que acepta la teoría SMT, fue criticado por investigadores que suscriben a la teoría opositora TOFT por considerarla, entre otras cosas, poco efectiva en el diseño de protocolos de tratamiento del cáncer, ya que a pesar de los avances en la reducción de las tasas de mortalidad, persisten las disparidades en los resultados de los pacientes (Soto y Sonnenschein, 2013).

La década pasada ha sido testigo de un gran salto en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis y progresión tumoral y diversas modalidades de tratamiento para controlar esta enfermedad compleja (Baskar et al., 2012). Sin embargo, el cáncer también puede asumirse como una enfermedad ambiental, ya que en el 90 - 95% de los casos se debe a modificaciones en el estilo de vida y factores ambientales; sólo el 5 - 10% de los cánceres se producen debido a una anomalía heredada de la madre o del padre. Por lo tanto, el cáncer es considerado en gran medida una enfermedad prevenible (Baskar et al., 2012).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en el año 2012. Los principales tipos de cáncer son los siguientes: pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal, mamario y esofágico (<http://www.who.int>).

La Argentina, según el Instituto Nacional del Cáncer (INC), se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172,3-242,9 x 100.000 habitantes) de acuerdo a las estadísticas de la IARC (International Agency for Research of Cancer) en el año 2012. El cáncer de mayor incidencia en mujeres es el de mama con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres, seguido por los cánceres masculinos de próstata (44 cada 100.000 hombres) y pulmón (32,5 cada 100.000 hombres) (<http://www.msal.gov.ar>).

A pesar de la disminución de las tasas de mortalidad relacionadas con el cáncer en los países desarrollados, se prevé que el número de casos de cáncer y muertes aumentará a más del doble en todo el mundo en los próximos 20 a 40 años. El incremento previsto será impulsado en gran medida por el crecimiento y el envejecimiento de las poblaciones (Baskar et al., 2012).

En los últimos años se han logrado avances notables hacia la comprensión de las características propuestas de desarrollo y tratamiento del cáncer. Sin embargo, con su creciente incidencia, el manejo clínico de esta enfermedad sigue siendo un reto para el siglo XXI (Baskar et al., 2012). En general, el tratamiento de la malignidad tumoral es complejo e implica a menudo un enfoque multidisciplinario (Wong, 2014).

Los tratamientos de cáncer existentes comprenden la cirugía y la radioterapia, la quimioterapia, la terapia biológica o inmunoterapia, la terapia hormonal y la terapia génica (una forma de tratamiento que todavía se encuentra en fase de investigación) (Chaveli-López, 2014) las cuales tienen por objetivo eliminar y/o bloquear la proliferación de células cancerosas.

En la actualidad, la cirugía ha prosperado en el tratamiento de tumores y sigue siendo uno de los métodos más comunes para tratar los tumores sólidos primarios (Wong, 2014). En la mayoría de los casos, el tratamiento se basa en la extirpación quirúrgica combinada con radioterapia convencional y/o quimioterapia, pero la extirpación de un tumor no siempre permite la remoción total de las células tumorales, las cuales en algunos casos, producirán los denominados "focos de recidiva tumoral".

La radioterapia es una modalidad no quirúrgica basada en radiación ionizante, muy utilizada en diversas aplicaciones clínicas. Para el tratamiento del cáncer es altamente eficaz y se utiliza en combinación con la cirugía y la quimioterapia para destruir células cancerosas. Tiene por objetivo reducir el volumen tumoral, lo cual implica que todos los tipos de células presentes dentro del campo de irradiación reciben la dosis de radiación prescrita (Hellevik y Martínez-Zubiaurre, 2014). Pero, a pesar de que alrededor de la mitad de los pacientes con cáncer en países desarrollados utilizan radioterapia como tratamiento en algún período de su enfermedad, su potencial curativo se encuentra limitado por la radiorresistencia intrínseca de las células cancerosas y por la toxicidad que ocurre en las células normales, ya que no siempre es factible eliminar un tumor sin dañar las células circundantes (Baskar et al., 2012). La radiorresistencia de las células tumorales, también explicaría que, a pesar de la probada eficacia de la radioterapia, muchos pacientes con cáncer sufren recurrencias locales y/o diseminación metastásica (Hellevik y Martínez-Zubiaurre, 2014). Las reacciones adversas a la radioterapia en pacientes dependen del volumen y el área que está siendo irradiado, de la dosis total suministrada, del fraccionamiento de

la dosis aplicada, de la edad y condiciones clínicas del paciente y de los tratamientos asociados. Un pequeño aumento en la dosis a tumor es suficiente para incrementar significativamente la incidencia de complicaciones (Jham y da Silva Freire, 2006).

La quimioterapia antineoplásica es otra de las estrategias más utilizadas en el tratamiento del cáncer, ya sea sola o en combinación con otros tipos de tratamientos. Basándose en su mecanismo de acción, los fármacos antitumorales que actúan en el ciclo celular pueden dividirse en tres categorías: los bloqueadores de la síntesis de ADN (Ácido Desoxirribonucleico), los que provocan daño al ADN y los que detienen la mitosis (Calderón et al., 2014). El principal inconveniente de la quimioterapia es la falta de selectividad, ya que actúa sobre las células tumorales y también sobre las células normales con elevada tasa de multiplicación, tales como células de la médula ósea, del folículo piloso y de la mucosa oral y gastrointestinal (Chaveli-López, 2014) y ésta falta de selectividad de daño provoca importantes efectos tóxicos (Ruiz Esquide et al., 2011). Los fármacos anticancerosos tienen farmacocinética y toxicidad variables en los distintos pacientes y no siempre son claras las causas de ésta variabilidad. Sin embargo, con frecuencia las mismas pueden relacionarse con diferencias interindividuales en el metabolismo de fármacos ó con interacciones medicamentosas (Goodman y Gilman, 10^o edición 2007). También se puede considerar que uno de los mecanismos de fracaso terapéutico de fármacos quimioterápicos se produce a través de un sistema denominado Resistencia a Múltiples Fármacos (RMF), en el cual las células cancerosas pueden escapar del efecto tóxico de los antineoplásicos más comúnmente utilizados, a pesar de sus diferentes estructuras químicas y distintos mecanismos de actividad intracelular (Liu, 2009).

En los últimos años, se han desarrollado nuevos sistemas de portadores de agentes terapéuticos contra el cáncer para mejorar la eficacia de entrega de las drogas antineoplásicas a las células tumorales y minimizar los efectos secundarios sistémicos. En particular, podemos nombrar a péptidos (ej. Bidwell, 2012), proteínas (Calderón et al., 2014), lipoproteínas (ej. Sabnis y Lacko, 2012), sistemas nanométricos que incluyen dendrímeros (ej. Gillies y Fréchet, 2005), nanocristales (ej. Chithrani, 2010), emulsiones (ej. ElMeshad y Tadros, 2011), liposomas (ej. Arias, 2013), nanopartículas lipídicas sólidas (ej. Doktorovova et al., 2014), micelas (ej. Jin et al., 2014), nanopartículas poliméricas (ej. Sadat Tabatabaei Mirakabad et al., 2014), nanovectores (Sakamoto et al., 2007), partículas magnéticas (Martel, 2014), entre otros.

La inmunoterapia recientemente ha comenzado a mostrarse como un potencial tratamiento para diversos tipos de cáncer. En este caso, los virus oncolíticos solos o modificados por ingeniería genética son los sistemas de entrega que pueden infectar y eliminar selectivamente a las células tumorales. La identificación de puntos de control inmunológicos sugieren que ésta estrategia de terapia puede activar la inmunidad antitumoral sostenida y que con la coadministración de un agente terapéutico tradicional puede generar mayor resultado clínico para los pacientes con cáncer. Aunque en la actualidad existen diferentes ensayos clínicos con éste tipo de terapia (ej. Suriano et al., 2013) los virus oncolíticos han tenido un éxito limitado como monoterapia para el tratamiento del cáncer debido a cuestiones en materia de seguridad (Bauzon y Hermiston, 2014).

La introducción de la hormonoterapia en el tratamiento del cáncer se basa en la observación clínica de que determinados tumores presentan un crecimiento hormonodependiente y de que su desarrollo puede ser frenado mediante manipulaciones hormonales. Las ventajas de ésta terapia incluyen menor toxicidad que la quimioterapia y la determinación de receptores hormonales en tejido tumoral, a partir de los cuales se seleccionan a los pacientes candidatos a esta modalidad de tratamiento. Las principales limitaciones de la hormonoterapia son que es una variante de tratamiento paliativo y que la respuesta suele ser tardía y frecuentemente va precedida por una fase de exacerbación. Los tres tejidos hormonodependientes por excelencia son la mama, el endometrio y el tejido prostático. La hormonoterapia tiene su principal indicación en los tumores que tienen su origen en estos tejidos(<http://www.sefh.es>)

La terapia génica se puede definir como el conjunto de técnicas que permiten vehicular secuencias de ADN o de ARN (Ácido Ribonucleico) al interior de células diana, con el objetivo de modular la expresión de determinadas proteínas que se encuentran alteradas, revirtiendo así el trastorno biológico que ello produce. En función del tipo de célula diana, existen dos modalidades de terapia génica: de células germinales y de células somáticas. La terapia génica requiere que se transfieran eficientemente los genes clonados a células enfermas, de manera que los genes introducidos sean expresados en cantidades adecuadas. Tras la transferencia génica, los genes insertados se pueden llegar a integrar en los cromosomas de la célula, o bien quedar como elementos genéticos extracromosómicos (episomas). La terapia génica fue inicialmente concebida como una forma de tratamiento de enfermedades genéticas causadas por mutación de un sólo gen (monogénicas), pero para el caso del tratamiento del cáncer, no se trata de corregir un defecto genético, sino de utilizar la manipulación génica para dotar de una nueva propiedad a las células, que permita aprovecharlas en algún aspecto de la patología oncológica con fines terapéuticos (<http://www.sefh.es>, Curiel et al., 2000).

En los últimos años se han realizado varios esfuerzos para desarrollar terapias para el tratamiento del cáncer con el objetivo de dañar específicamente y selectivamente las células tumorales, preservando el tejido normal (Chaveli-López, 2014). Dentro de ellas, podemos citar a las Terapias Binarias, las cuales combinan dos componentes que, por separado, no causan daño significativo, pero sólo cuando ambas se encuentren juntas se obtendrá un resultado terapéutico en el tumor (Barth et al., 1990). Un ejemplo de éste tipo de terapia es la Terapia Fotodinámica (PDT)(Hong et al., 2015).

BNCT o Terapia por Captura Neutrónica en Boro es parte de la generación de terapias alternativas para el tratamiento del cáncer que también puede ser descrita como una Terapia Binaria. BNCT se basa en la reacción de captura que se produce entre átomos de boro (primer componente) transportados por un agente portador, que se depositan selectivamente en el tumor y neutrones térmicos (segunda componente). Cuando el boro ¹⁰ y los neutrones térmicos reaccionan entre sí, generan partículas ionizantes, de corto alcance y letales para la célula. De esta manera se dañaría el tumor, preservando el tejido normal (Coderre y Morris, 1999). Si definimos a la hadronterapia como el tipo de terapia que emplea hadrones (partículas pesadas cargadas: protones e iones pesados) para el tratamiento de tumores, BNCT podría considerarse una

hadronterapia no convencional, ya que los principales efectores del daño tumoral son partículas de radiación ionizante.

Dado que BNCT es un tratamiento biológicamente selectivo debido al uso de compuestos borados que se acumulan preferencialmente en células cancerosas, tiene el potencial de destruir células malignas que se encuentren dispersas en el parénquima del tejido sano (Miyatake et al. 2016). Esta característica de BNCT permite un “targeting biológico” en lugar de un “targeting geométrico”, siendo una de las principales ventajas respecto de la radioterapia convencional. Esto convierte a BNCT en una de las alternativas más prometedoras, ya que no es necesario conocer a priori la localización de las células tumorales para llevar a cabo su destrucción y pueden tratarse metástasis difusas, así como tumores primarios difusos y otros tipos de tumores que son inoperables por su localización anatómica, y/o refractarios a los tratamientos convencionales (Barth et al., 2012).

Resumiendo, podemos definir a BNCT como una aplicación de la tecnología nuclear al área biomédica cuyo objetivo es dañar al tejido neoplásico, disminuyendo la toxicidad y los efectos secundarios adversos en los tejidos sanos circundantes. BNCT es una terapia binaria, que puede ser considerada como una hadronterapia no convencional, que se basa en la acumulación selectiva de compuestos portadores de ^{10}B en el tumor y la subsiguiente irradiación externa con neutrones térmicos o epitérmicos. La reacción de captura entre el neutrón térmico y un átomo de ^{10}B genera partículas ionizantes de alta transferencia lineal de energía (Lineal Energy Transfer, LET) y corto alcance en el tejido. De este modo, las partículas generadas provocan un daño significativo en el tumor, causando menor daño al tejido circundante.

1.2 Aspectos generales sobre las radiaciones

Se denomina radiación ionizante al agente físico que forma iones, es decir, partículas eléctricamente cargadas que depositan su energía en los tejidos que atraviesan. Las radiaciones ionizantes se dividen en corpusculares o electromagnéticas. Las radiaciones corpusculares están representadas por electrones, protones y neutrones, mientras que las radiaciones electromagnéticas, también llamadas fotones, comprenden los rayos X y los rayos gamma (Jham y da Silva Freire, 2006). Los rayos X y los rayos gamma son radiaciones escasamente ionizantes, consideradas de bajo LET, compuestas de partículas de energía sin masa llamadas fotones. Los rayos X son generados por un dispositivo que excita a los electrones (por ejemplo, tubos de rayos catódicos y aceleradores lineales), mientras que los rayos gamma se originan en la desintegración de sustancias radiactivas, por ejemplo cobalto-60 (^{60}Co), radio-222 (^{226}Ra) y cesio-137 (^{137}Cs) (Baskar et al., 2012).

La radiación ionizante es un agente físico que se utiliza para destruir eficazmente células cancerosas de manera no específica (Hellevik y Martinez-Zubiaurre, 2014). Los efectos biológicos ocasionados por el recorrido de partículas cargadas a través de un tejido de células de mamífero, se reconocen mediante las lesiones al ADN nuclear y las respuestas celulares que provocan (Kassis y Adelstein, 2005).

La distribución de las ionizaciones dentro del ADN y el tipo de lesiones generadas dependerán de la naturaleza de la partícula incidente y de su energía. Las partículas α producen alta densidad de ionización a lo largo de una trayectoria lineal, mientras que las ionizaciones que provocan las partículas β a lo largo de la trayectoria lineal son menos frecuentes. Los electrones de baja energía (por ejemplo electrones Auger) generan grupos de alta densidad de ionización a lo largo de un camino irregular (Kassis y Adelstein 2005). Las radiaciones sin carga, como los rayos gamma o los neutrones, interactúan con el medio biológico transfiriendo su energía a partículas cargadas del mismo medio. Luego estas partículas cargadas, denominadas secundarias, ceden su energía a la materia.

Existe un acuerdo general de que el blanco principal de los efectos biológicos de la radiación ionizante es el ADN (Kassis y Adelstein, 2005). Los daños al ADN pueden ser doble o simple cadena, y ocurren mediante dos efectos principales: efecto directo de la radiación, causado por interacción directa de la radiación con el ADN y efecto indirecto sobre el ADN, en el cual se generan radicales libres, derivados de la ionización del agua y estabilizados por el oxígeno, que difunden a pocos nanómetros de distancia (Kassis y Adelstein, 2005; Jham y da Silva Freire, 2006; Baskar et al., 2012) (Fig. 2I). Generalmente, los daños doble cadena en el ADN tienen una baja tasa de reparación y son responsables de la muerte celular, tanto de células cancerosas como normales.

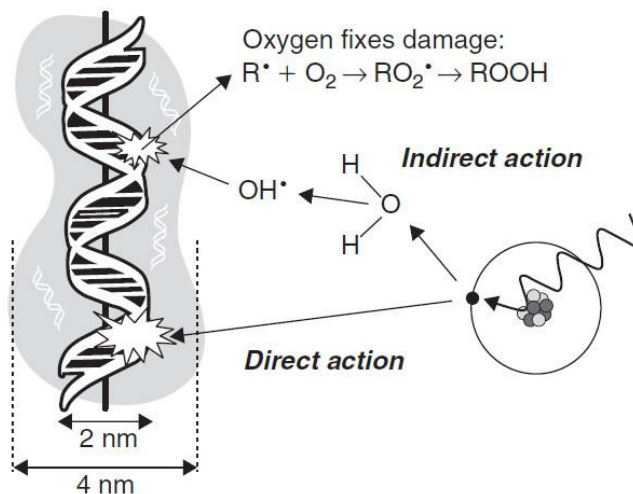


Fig. 2I Efectos (directo o indirecto) del daño al ADN por acción de la radiación ionizante en las células (Baskar et al., 2012).

Las radiaciones ionizantes actúan sobre el ADN generando mutaciones genéticas, aberraciones cromosómicas, pérdida de la capacidad reproductiva y muerte celular (Jham y da Silva Freire, 2006; Lorimore et al., 2003). Estos efectos son convencionalmente atribuidos a un cambio irreversible, resultante de la deposición de energía de la radiación ionizante en el ADN de la célula irradiada, ya sea durante el procesamiento y reparación enzimática del daño al ADN o durante la replicación del ADN. Por consiguiente, ha sido ampliamente aceptado que la mayoría de

estos cambios tienen lugar inmediatamente después de la exposición a la radiación (Lorimore et al., 2003). La radiación también puede afectar y destruir otras biomoléculas como el ARN y proteínas, las cuales influyen en la maquinaria de reparación del daño al ADN (Barth et al., 1990).

Las principales formas de muerte celular debido a la interacción con la radiación ionizante son la apoptosis y la catástrofe mitótica. Además, pueden ocurrir necrosis y autofagia, o la célula puede entrar en estado de senescencia. El mecanismo preciso por el cual se induce uno u otro tipo de muerte celular no ha podido ser dilucidado (Baskar et al., 2012).

Los efectos de la exposición a la radiación dependen del tipo de tejido expuesto (Hashibe et al., 2005). Dado que el ADN se duplica durante el proceso de mitosis, las células con un alto grado de actividad mitótica son más sensibles a la radiación que las de bajo índice mitótico (Jham y da Silva Freire, 2006). Por ejemplo, las células en proliferación, como las del sistema hematopoyético y las del epitelio intestinal, son las más sensibles a la radiación (Hashibe et al., 2005).

Debido a los efectos de la radiación ionizante sobre los tejidos descritos anteriormente, ésta puede ser utilizada, entre otras aplicaciones, para destruir eficazmente células cancerosas de manera no específica (Hellevik y Martínez-Zubiaurre, 2014). La energía depositada por las radiaciones ionizantes puede matar a las células cancerosas o causar cambios genéticos que conlleven a la muerte celular (Baskar et al., 2012).

Los tumores malignos pueden ser considerados radiosensibles (leucemia, linfomas, tiomas, seminomas), moderadamente radiosensibles (carcinomas de células basales o escamosas, adenocarcinomas) o radioresistentes (liposarcoma, neurofibrosarcoma, osteosarcoma, tumor de parótida y condrosarcoma). La radiosensibilidad o radioresistencia en tumores está determinada por diferentes factores, entre ellos podemos citar los siguientes (Fritz-Niggli, 1995):

Radorresistencia

- a. Presencia de células hipóxicas: la ausencia de oxígeno significa menor efecto de la radiación
- b. Reoxigenación: como consecuencia de la reducción del tamaño tumoral y de mejor suministro sanguíneo al tumor, ó migración de células hipóxicas a regiones con mayor contenido de oxígeno
- c. Cinética celular: los tumores de crecimiento lento son más radioresistentes
- d. Proporción de células en fases de crecimiento radioresistentes: en tumores radioresistentes diferenciados la mayoría de las células se encuentran en fase G_0

Radiosensibilidad

- a. Tamaño tumoral: cuanto más pequeño es el tumor, mayor radiosensibilidad
- b. Capacidad de reparación: cuanto mayor es la capacidad de reparación del tejido sano, mayor será la dosis que se puede administrar al tumor

- c. Tiempo de duplicación: los tumores no diferenciados radiosensibles poseen menor tiempo de duplicación celular
- d. Estadíos de diferenciación: por ejemplo, los carcinomas no diferenciados son mas radiosensibles

El primer uso clínico de la radiación para el tratamiento del cáncer se registró a finales del siglo XIX, poco después de que Röntgen describiera a los rayos X en 1895 (Baskar et al., 2012). Desde ese momento, la terapia por radiación se ha convertido en una especialidad médica reconocida como Oncología Radiológica. Hoy en día en la práctica clínica, la mayoría de los tratamientos radioterapéuticos son realizados mediante el uso de fotones (Jham y da Silva Freire, 2006). La dosis de radiación ionizante que se administra habitualmente depende de factores tales como la localización de la neoplasia, el tipo de malignidad, la sensibilidad de los tejidos normales circundantes y si la radiación se utiliza como único tratamiento (Wong, 2014). Aproximadamente un 50% de todos los pacientes con cáncer reciben terapia por radiación durante el curso de la enfermedad, pero aunque en las últimas décadas se ha avanzado en la entrega precisa de la radiación al sitio del tumor, no siempre es factible eliminar un tumor sin dañar el tejido normal circundante (Baskar et al, 2012).

Existen dos formas de administrar radiación para el tratamiento del cáncer denominadas radioterapia externa o interna. La forma más común en el ámbito clínico es la radiación externa, en la cual la radiación de alta energía (fotones, protones o radiación de partículas) es entregada desde afuera del cuerpo hacia el lugar donde se encuentra el tumor. El tratamiento con radioterapia externa administrada en un régimen fraccionado aumenta la ventaja de supervivencia de los tejidos normales sobre las células cancerosas, en gran medida, porque las mismas poseen una mejor reparación del daño sub-letal debido a la radiación. El tejido canceroso prolifera más rápidamente en comparación con las células normales, que lo hacen más lentamente y, por lo tanto, tienen más tiempo para reparar los daños antes del proceso de replicación. Las observaciones iniciales de los efectos de la radioterapia fraccionada en la década de 1920 se basaron en la comparación de diferentes esquemas de tratamiento basados en la dosis total, el número de fracciones y el tiempo de tratamiento global. Los regímenes actuales se basan en la fórmula cuadrática lineal que considera los factores de dosis-tiempo para tumores individuales y tejidos normales. Hoy en día, un régimen típico de radioterapia consiste en fracciones diarias suministradas durante varias semanas (Baskar et al., 2012).

En el caso de radioterapia interna, la radiación es entregada desde el interior del cuerpo por medio de fuentes radiactivas selladas en catéteres o semillas, directamente en el sitio del tumor. Esta modalidad, denominada braquiterapia, se utiliza en particular en el tratamiento de rutina de neoplasias ginecológicas y de próstata (Baskar et al., 2012).

Dado que BNCT es una clase de radioterapia que utiliza radiación ionizante para provocar daños selectivos al tejido neoplásico, podemos señalar que la estrategia en la que se basa, consistiría en que la radiación causante de la muerte de las células cancerosas, se genera dentro

del tumor mediante la reacción de captura neutrónica entre el ^{10}B y los neutrones térmicos, que produce partículas del alto LET, siendo éstas los verdaderos efectores del daño celular. Por lo tanto, aunque el tratamiento de BNCT y la braquiterapia son consideradas modalidades de radioterapia interna, se diferencian en el origen de la radiación ionizante.

2. Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT)

En 1932 Sir James Chadwick descubrió los neutrones y tres años después fue galardonado con el Premio Nobel de Física. Al año siguiente de esta distinción, en 1936, Gordon Locher introdujo el concepto de terapia binaria para el tratamiento del cáncer como: “en particular, existe la posibilidad de introducir pequeñas cantidades de fuertes absorbentes de neutrones en las regiones donde se desea liberar energía de ionización (por ejemplo, mediante la administración de un compuesto soluble, no tóxico de boro, litio, gadolinio u oro) en un cáncer superficial, seguido de bombardeo con neutrones lentos” (Salt et al., 2004). A partir de éste nuevo enfoque se desarrollaron las terapias NCT (Neutron Capture Therapy), de las cuales BNCT (Boron Neutron Capture Therapy) es la más utilizada hoy en día.

BNCT se basa en reacciones nucleares de captura y fisión que se producen cuando un átomo de ^{10}B (isótopo estable del boro, no radiactivo) es irradiado con neutrones de baja energía (0,025 eV) (Barth et al., 2012). Este átomo de boro, adquiere un neutrón, desencadenando una reacción de captura que da lugar a la formación de un átomo de ^{11}B que se escinde o fisiona generando una partícula alfa (^4He) y un núcleo de ^7Li , ambas de alta transferencia lineal de energía (LET), que son emitidas en direcciones opuestas (Coderre y Morris, 1999; Coderre et al., 2003). (Fig. 3I).

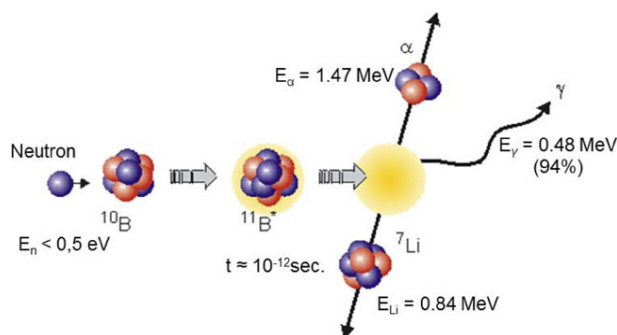


Fig. 3I Reacción de captura neutrónica entre ^{10}B y neutrones térmicos o epitérmicos (Byvaltsev et al., 2012).

La reacción de captura neutrónica que ocurre en BNCT ($[^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}]$) tiene dos vías posibles (Coderre et al., 2003):

- $^{10}\text{B} + n \rightarrow [^{11}\text{B}] \rightarrow ^4\text{He} + ^7\text{Li} + 2,3 \text{ MeV} + \gamma (0,48 \text{ MeV}) (94\%)$
- $^{10}\text{B} + n \rightarrow [^{11}\text{B}] \rightarrow ^4\text{He} + ^7\text{Li} + 2,8 \text{ MeV} (6\%)$

En el 94% de los casos el ${}^7\text{Li}$ queda en estado excitado y regresa a su estado fundamental tras la emisión de un rayo gamma (γ), mientras que en el 6% restante es emitido en su estado fundamental.

El LET es una medida de densidad de las ionizaciones producidas cuando una radiación interactúa con el tejido (Coderre y Morris, 1999). A mayor LET habrá mayor número 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 et al., 1984; Baskar et al., 2012). Las partículas emitidas por la reacción de captura tienen una trayectoria definida, independientemente del espesor de la muestra. Dado que estas partículas de alto LET recorren un camino corto en el tejido irradiado (partícula α : 9 μm y litio: 5 μm), comparable al diámetro celular, los efectos de las mismas se encuentran limitados a las células que contengan boro (Barth et al., 2005). Dado que se emplean compuestos portadores de ${}^{10}\text{B}$ que se incorporan preferencialmente al tejido tumoral (ej. Coderre y Morris, 1999), estas reacciones de captura ocurrirán mayormente en el tejido tumoral. Las partículas de alto LET, generadas a partir de la reacción de captura entre el ${}^{10}\text{B}$ en el tejido neoplásico y los neutrones térmicos, deben ser suficientes para causar un daño letal o esterilizar las células donde se produce la reacción. En las células normales, que contienen menor concentración de boro que las células tumorales, se producirán menos reacciones de captura. Entonces, en teoría, es posible irradiar selectivamente un tumor y células tumorales infiltrantes asociadas, con dosis únicas de radiación de alto LET, sin afectar significativamente el tejido normal adyacente (Coderre et al., 2003) (Fig. 4I).

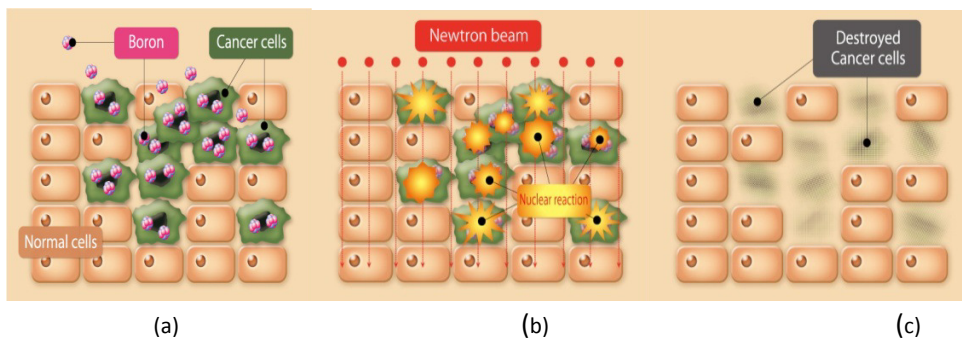


Fig. 4I. Esquema de la reacción de captura de ${}^{10}\text{B}(n, \alpha){}^7\text{Li}$ en un tejido. Se representa: (a) la captación diferencial de ${}^{10}\text{B}$ en células cancerosas (verdes) vs células normales (marrones); (b) la irradiación con neutrones de baja energía y las reacciones de captura entre ellos y el ${}^{10}\text{B}$ dentro de las células; (c) destrucción de las células cancerosas como resultado de la reacción de captura neutrónica de boro (<http://bnct.kek.jp/eng/target.html>)

En todas las modalidades de terapia de radiación convencional, la sensibilidad de los tejidos normales es el factor limitante que determina la dosis que puede ser entregada al tumor. Un problema particular en la terapia del cáncer por radiación es el tratamiento de las micrometastásis. Esto se puede deber a que las mismas son demasiado pequeñas para ser

detectadas por técnicas de imágenes habituales ó de medicina nuclear, y/o la enfermedad micrometastásica es demasiado extensa y difusa y el tratamiento causa daño inaceptable a los tejidos normales. En este contexto, BNCT es una terapia que tiene el potencial de brindar solución a estas limitaciones ya que las partículas de radiación de alto LET dañan selectivamente al tumor preservando al tejido normal y además la entrega de ésta radiación puede producirse en células individuales o sitios micrometastásicos (Coderre et al., 2003).

Como mencionamos anteriormente, hace 80 años Locher introdujo el concepto de BNCT, y lo definió como una modalidad de tratamiento binario que puede actuarselectivamente sobre un tejido neoplásico (Miyatake et el., 2016). También por aquél entonces se precisó que la sección eficaz térmica (σ_{th}), definida como una magnitud escalar de la probabilidad de un núcleo de absorber o capturar neutrones térmicos, expresada en unidades de barn, donde $1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$, era independiente de la masa nuclear, pero estaba relacionada con la estructura del núcleo. Inicialmente, se habían considerado para las terapias de captura neutrónica (NCT) varios otros nucleídos con secciones eficaces elevadas, tales como el ^6Li y el ^{235}U . Sin embargo, ninguno de ellos ha sido ampliamente investigado (Tabla 1I). Cuando el ión Li^+ es administrado con el objetivo de ser incorporado en forma específica a tumor, una de las principales desventajas es su facilidad de dispersión a través del cuerpo, mientras que el ^{235}U es inadecuado debido a su toxicidad inherente y radiactividad.

Isótopo	$\sigma_{th} / \text{barn}$	Reacción de Captura Neutrónica
^3H	5333	(n,p)
^6Li	941	(n, α)
^{10}B	3838	(n, α)
^{113}Cd	20600	(n, γ)
$^{135}\text{Xe}^*$	2720000	(n, γ)
^{147}Sm	40140	(n, γ)
^{151}Eu	9200	(n, γ)
^{155}G	60900	(n, γ)
^{157}Gd	255000	(n, γ)
^{174}Hf	561	(n, γ)
^{199}Hg	2150	(n, γ)
$^{235}\text{U}^*$	681	(n,f)
$^{241}\text{Pt}^*$	1380	(n,f)
$^{242}\text{Am}^*$	8000	(n,f)

Tabla 1I. Secciones eficaces de captura neutrónica (σ_{th}) aproximadas y tipos de reacciones de captura neutrónica para isótopos estables y radioactivos (*)(Salt et al., 2004).

Otro aspecto a considerar en las terapias NCT son las σ_{th} de los elementos mayoritarios que constituyen el cuerpo humano, tales como hidrógeno (H), oxígeno (O), carbono (C) y nitrógeno (N) (Tabla 2I). Aunque las secciones eficaces para neutrones térmicos de éstos elementos individuales son bastante insignificantes, la gran cantidad de estos átomos en todos los tejidos hace que este aspecto se convierta en un factor a tener en cuenta, cuando se consideran las dosis de radiación absorbidas por los tejidos sanos.

Isótopo	σ_{th} /barn	% en tejidos mamíferos
³ H	0,333	10,00
¹² C	0,0035	18,00
¹⁴ N	1,83	3,00
¹⁶ O	0,00019	65,00
²³ Na	0,43	0,11
²⁴ Mg	0,0053	0,04
³¹ S	0,18	1,16
³² S	0,53	0,20
³⁵ Cl	32,68	0,16
³⁹ K	2,1	0,20
⁴⁰ Ca	0,4	2,01
⁵⁶ Fe	2,57	0,01

Tabla 2I. Secciones eficaces de captura neutrónica (σ_{th}) aproximadas de los átomos mayoritarios en los tejidos de mamíferos.(Salt et al., 2004).

El ¹⁰B tiene unasección eficaz de captura (σ_c) de3842,37barn (1 barn = 10^{-24} cm²) para la reacción (n, α)con neutrones térmicos de 0,0253 eV (www-nds.iaea.org). Es un elemento no tóxico, no radiactivo, que luego de la reacción de captura con neutrones térmicos genera un núcleo excitado de ¹¹B, que se divide instantáneamente en partículas alfa y litio de alta transferencia lineal de energía y corto alcance. Esto haceque el ¹⁰B sea un isótopo altamente atractivo para el tratamiento de células neoplásicas. Por éste motivo ha sido el nucleído deelección en el desarrollo de la Terapia por Captura Neutrónica, dando origen al tratamiento de BNCT (Salt et al., 2004).

Para que BNCT sea exitoso, es decir queproduzca daño significativo en las células cancerosas y dañelo menos posible a las células normales contiguas, debe existir un alto contenido de átomos de ¹⁰B en las células neoplásicas (aproximadamente 20 μ g ¹⁰B/g de tejido ó 20 ppm ¹⁰B) como así también un número suficiente de neutrones térmicos (aproximadamente 10⁷ neutrones/seg.cm²) que al ser absorbidos por los átomos de boro desencadenarán la reacción letal¹⁰B(n, α)⁷Li (Barth et al., 2005; Moss et al., 2014). La importancia de que el boro esté confinado preferencialmenteen

las células tumorales se debe a que el haz de neutrones atraviesa todas las células en el volumen de tratamiento y las partículas alfa, generadas por la reacción del ^{10}B con los neutrones térmicos, tienen una alta eficacia biológica relativa (RBE). Se ha demostrado, mediante experimentos con fuentes de partículas alfa isotópicas planares, que el número de recorridos nucleares de partículas alfa, requeridas para inducir una lesión letal en una célula, no es constante y varía entre 2 y 6. La variación puede atribuirse a las diferencias en el espesor de los núcleos de las diversas líneas celulares. Para una exposición en tejido con 10^{12} neutrones térmicos/cm², se requiere la presencia de alrededor de 10^9 átomos de ^{10}B por célula tumoral para producir 2 ó 3 eventos de captura de neutrones en esa célula. Una fluencia de 10^{12} neutrones térmicos/cm² en presencia de una menor concentración de boro en tejido normal causa un efecto tolerable pero no despreciable (Coderre et al., 2003). La dosis de fondo (irradiación sin administración del compuesto borado) causa un efecto similar en tejido tumoral y tejido normal. Por ello, se busca maximizar la componente boro de la dosis y minimizar la dosis de fondo. Una alta concentración de boro en tumor permite reducir el tiempo de irradiación, reduciendo la dosis de fondo (Coderre y Morris, 1999).

2.1 Radiobiología de BNCT

La radiobiología de BNCT es compleja debido al campo mixto de radiaciones de alto y bajo LET. Sin embargo, gran parte de esta complejidad ha sido aclarada mediante la combinación de la experimentación traslacional, pre-clínica y el aumento de la experiencia clínica (Coderre et al., 2003).

La Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) produce una combinación de componentes de dosis de radiación en los tejidos, con diferentes energías y LET característicos (Coderre et al., 2003; Hopewell et al., 2011). Dichas componentes pueden clasificarse en:

- a) Componentes de dosis derivadas de la reacción del ^{10}B con los neutrones térmicos (Componente Boro):
 1. Partículas α de 1,47 MeV, rango 9 mm, LET: 196 KeV/m
 2. Partículas de ^7Li de 0,84 MeV, rango 5 mm, LET: 162 KeV/m
 3. Rayos γ de 0,48 MeV (94% de las reacciones)

- b) Componentes de dosis derivadas de otras reacciones (Componente Fondo ó Inespecífica):
 1. Rayos γ de 2,2 MeV, producidos por la captura de neutrones térmicos en el hidrógeno presente en los tejidos, provenientes de la reacción $^1\text{H}(n,\gamma)^2\text{H}$
 2. Protones de alto LET de 590 KeV, producidos por la captura de los neutrones térmicos en nitrógeno, provenientes de la reacción $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$

3. Protones “recoil” o de retroceso (energía cinética > 10 KeV) generados por la colisión de neutrones rápidos del haz epitérmico con los núcleos de hidrógeno de los tejidos, provenientes de la reacción $^1\text{H}(n, n') p$
4. Componente γ del haz de neutrones.

Se asume que éstas diferentes componentes del campo mixto de irradiación actúan de modo totalmente independiente, aunque existe alguna evidencia de sinergismo (Hopewell et al., 2011).

La dosis de fondo inespecífica, generada por la inevitable interacción de los neutrones con los núcleos de diversos elementos del tejido, está relacionada directamente con la duración de la exposición en el reactor, y es independiente de la concentración de boro. Debido a las componentes de la dosis de fondo que dependerán de la fuente de neutrones que se emplee, la dosis en el tumor y en tejido normal no aumenta directamente con la concentración de boro. Por lo tanto, para maximizar la ventaja terapéutica de BNCT, a igual relación de concentración de boro en tumor/tejido normal y tumor/sangre, será más favorable tener mayores concentraciones absolutas de boro en tumor. Esto permite disminuir el tiempo de exposición al haz de neutrones, obteniendo como resultado una reducción de la dosis inespecífica que afecta de manera similar al tumor y a los tejidos normales (Coderre et al., 1996).

La dosis total de BNCT en un tejido dado es la suma de las diferentes componentes (Componente Boro+ Componente inespecífica), y comúnmente se expresa como dosis absorbida en unidades de radiación llamadas Gray (Gy), definida como $1 \text{ Gy} = \text{Joule/Kg}$. Sin embargo, dado que la proporción de las componentes de dosis en BNCT depende de la fuente de neutrones, una dosis absorbida total expresada en Gy no necesariamente es igual en dos centros de tratamiento distintos. Por lo tanto, es necesario especificar cada una de las componentes de dosis por separado, ya que el efecto biológico para una misma dosis dependerá del aporte proporcional de cada una de ellas.

Con el fin de estimar el efecto de un tratamiento de BNCT, la dosis física debe ser convertida a dosis biológica (Horiguchi et al., 2014). El Factor de Eficacia Biológica Relativa ó RBE permite expresar la dosis absorbida total de BNCT en unidades equivalentes a fotones ó Gray equivalentes (Gy-Eq), denominada dosis total equivalente, y así aplicar un factor de corrección a la dosis de acuerdo a su eficacia biológica. Para el cálculo de la “dosis equivalente a fotones”, clásicamente se multiplica la dosis absorbida en Gy de cada una de las componentes de dosis por un RBE, que se determina sobre la base de criterios clínicos o experimentales. 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 (Coderre et al., 2003). Las dosis expresadas de esta manera equivalente, permiten: (1) comparar los efectos de BNCT en diferentes animales ó modelos biológicos, para los cuales los efectos de la irradiación con fotones son conocidos y (2) el uso de Gy-Eq permitiría comparar las dosis entregadas por distintas instituciones en las que se aplica BNCT.

Los valores de RBE dependen principalmente de:

- a. El tipo de tejido a ser irradiado: composición química y radiosensibilidad
- b. Neutrones de irradiación: espectros de energías, alcance y LET
- c. Dosis de irradiación: tasa de dosis neutrónica y componentes de dosis
- d. Parámetro elegido para la evaluación del efecto biológico ó “end point”: ej. descamación, daño vascular

Sería de gran utilidad establecer valores universales para el RBE de todos los componentes de dosis en BNCT. Sin embargo, éste tema aún es controversial y a la vez muy interesante como objeto de estudio para ampliar los conocimientos, ya que actualmente no todas las variaciones del RBE son consideradas en la planificación para tratamientos en BNCT (Horiguchi et al., 2014). Según las condiciones mencionadas existen diferentes formas de estimar valores de RBE (ej. Gabel et al., 1984; Coderre et al., 1993; Morris et al., 1994; Coderre et al., 1995; Bond et al., 1995; Fukuda et al., 1996; Santa Cruz et al., 2004; Gonzalez et al., 2012; Suzuki et al., 2013; Liu et al., 2014). Distintos datos han sido aportados por diversos centros internacionales con respecto al comportamiento de las diferentes componentes de la radiación, que deberían tenerse en cuenta al momento de concluir resultados. En éste contexto, se ha descrito el fenómeno denominado “supra-aditividad” que se refiere al hecho de que existen evidencias de que los rayos γ en un ambiente de radiación de alto LET se comportan como si fueran radiación de alto LET en lugar de bajo LET (Morris et al., 1996).

Las componentes de dosis con diferentes LET tienen distintos grados de eficacia biológica en tumor y en tejidos normales. Dado que la eficacia terapéutica de 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 en 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 y Kanda, 1982). Debido a la variación en la localización de diferentes agentes de captura dentro de los tejidos, se considera más apropiado el uso del término Eficacia Biológica del Compuesto ó CBE, el cual contempla al transportador de boro utilizado. La forma de administración del compuesto borado, el patrón de distribución dentro de la célula, la dosis administrada y también el volumen del núcleo en la población celular pueden influir sobre la determinación experimental del factor CBE. Los CBE son diferentes a los RBE, ya que están influenciados básicamente por el tipo y la distribución particular del compuesto borado en las células y/o tejido, entre otros factores. Es importante que las condiciones experimentales para la determinación de los factores de CBE sean lo más cercanas que sea posible a las situaciones clínicas (Coderre et al., 1999).

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

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

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

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

Podemos decir entonces que, para expresar las dosis entregadas al tumor y los tejidos normales en Gy-Eq para tratamientos con BNCT, son necesarios los siguientes cálculos:

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

Recientemente, González y Santa Cruz propusieron un formalismo para el cálculo de la dosis isoefectiva (IsoE) como alternativa al tradicional cálculo de dosis "equivalente a fotones o pesada". En ese trabajo, el formalismo considera la reparación de primer orden de las lesiones sub-letales por medio del factor generalizado de Lea-Catcheside en el modelo lineal cuadrático modificado, y también considera el sinergismo de las interacciones entre las diferentes radiaciones. La propuesta parte de conocimientos básicos ampliamente aceptados, y se presenta como un enfoque más realista que esencialmente emplea toda la información experimental disponible a partir de experimentos biológicos, a la vez que se presenta como una alternativa de uso simple que puede ser incluida en los sistemas de planificación de tratamientos utilizados comúnmente en BNCT (González y Santa Cruz, 2012).

A pesar que la radiobiología de BNCT ha sido y está siendo estudiada, uno de los desafíos que persiste es el de estimar con precisión la dosis de radiación absorbida por el tumor y los tejidos normales durante la irradiación (Ono, 2016). Aún con la última tecnología disponible (ej. Kobayashi et al., 2016), es difícil seguir las concentraciones de ^{10}B en los tumores durante la irradiación con neutrones, generando así un problema en el cálculo de la dosis de radiación a tumor. Para garantizar el efecto terapéutico con BNCT, los tumores deberían ser erradicados utilizando dosis tolerables a los tejidos normales circundantes al tumor (Fukuda et al., 1999).

2.2 Biodistribución de compuestos borados

2.2.1 Conceptos generales de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción de compuestos (ADME)

La absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de un compuesto o fármaco suponen su paso a través de las membranas celulares (Fig. 5I). Es indispensable conocer los mecanismos por medio de los cuales los compuestos las atraviesan, así como las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y las membranas que modifican esta transferencia, para comprender la disposición de los compuestos en el organismo.

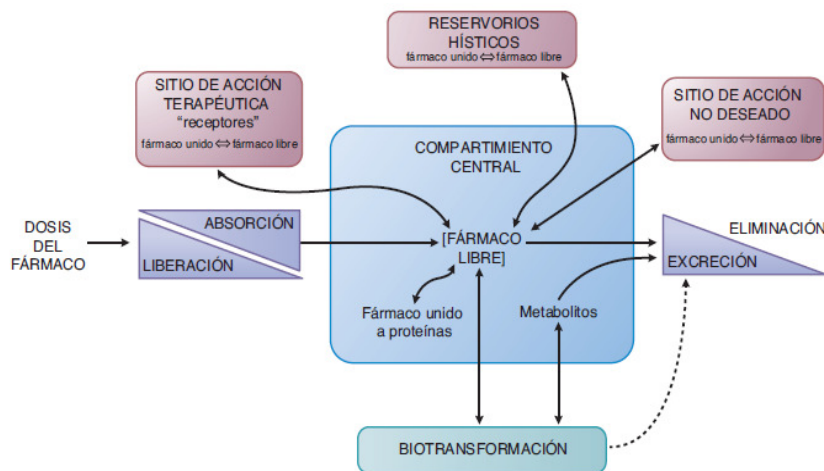


Fig. 5I. Interacción entre la absorción, distribución, fijación, metabolismo y excreción de un compuesto y sus concentraciones en el sitio de acción (Goodman & Gilman, 12ª edición 2012).

Las características del compuesto que permiten pronosticar su desplazamiento y disponibilidad en los sitios de acción son su tamaño y formas moleculares, grado de ionización, solubilidad relativa en lípidos de sus variantes ionizada y no ionizada y su enlace con las proteínas séricas e hísticas (tisulares). En la mayor parte de los casos, el fármaco o compuesto debe atravesar las membranas plasmáticas de varias células para alcanzar su sitio de acción. Si bien las barreras para el desplazamiento de los compuestos pueden ser una sola capa de células (ej. epitelio

intestinal) o varias capas de células y proteínas extracelulares adjuntas (ej. piel), la membrana plasmática representa la barrera más común para la distribución de los compuestos (Goodman y Gilman, 12ª edición 2012).

Las drogas o compuestos atraviesan las membranas ya sea por transporte pasivo o por mecanismos que comprenden la participación activa de ciertos componentes de la misma (Fig. 6I). En el transporte pasivo, la molécula del fármaco penetra por difusión siguiendo un gradiente de concentración gracias a su solubilidad en la bicapa lipídica. Este tipo de transferencia es directamente proporcional a la magnitud del gradiente de concentración a través de la membrana, al coeficiente de reparto entre lípidos y agua del fármaco y a la superficie de la membrana que tiene contacto con el fármaco. Cuando mayor es el coeficiente de reparto, mayor será la concentración del fármaco en la membrana y más rápida su difusión. Una vez que se alcanza un estado de equilibrio, la concentración del fármaco libre es la misma en ambos lados de la membrana, siempre y cuando el fármaco no sea un electrolito. Para los compuestos iónicos, las concentraciones de equilibrio dependen del gradiente electroquímico para el ión y de las diferencias en el pH a través de la membrana, que modifican el estado de ionización de la molécula de manera desigual a ambos lados de la membrana y que pueden atrapar el fármaco en un lado de la misma. La difusión pasiva a través de la bicapa lipídica de la membrana celular es el mecanismo predominante en la eliminación de casi todos los fármacos, aunque también pueden intervenir de modo importante mecanismos mediados por transportadores (Fig. 6I).

El transporte activo se caracteriza por la necesidad de energía, desplazamiento contra un gradiente electroquímico, capacidad de saturación, selectividad e inhibición competitiva por compuestos transportados en forma conjunta (Fig. 6I). La proteína de transporte $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPasa}$, es un ejemplo importante de mecanismo de transporte activo. En el transporte activo secundario se utiliza la energía electroquímica almacenada en un gradiente para desplazar a otra molécula en contra de un gradiente de concentración. El término difusión facilitada describe un método de transporte a través de un portador en el que no existe aporte de energía y, por lo tanto, el desplazamiento de la sustancia implicada se realiza siguiendo el gradiente electroquímico (Goodman y Gilman, 12ª edición 2012).

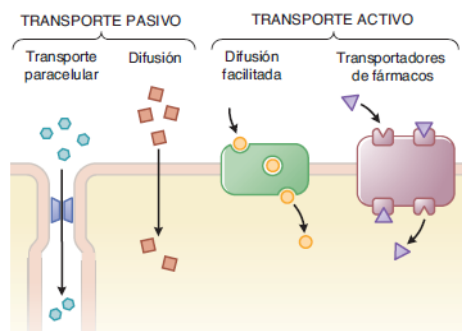


Fig. 6I. Diversas formas en las que un compuesto puede atravesar las membranas celulares (Goodman y Gilman, 12ª edición 2012).

Como mencionamos anteriormente, las drogas deben atravesar múltiples barreras biológicas para alcanzar con éxito el sitio de acción y así lograr el objetivo para el cual fueron diseñadas. Dentro de éstas barreras podemos mencionar a la barrera placentaria y a la hematoencefálica (BHE). En el contexto de ésta tesis, sólo nos detendremos en la BHE.

La distribución de fármacos en el sistema nervioso central, a partir de la sangre, es un fenómeno peculiar. Una de las razones es que las células del endotelio de los capilares encefálicos muestran uniones estrechas continuas y, como consecuencia, la penetración de fármacos ó compuestos al tejido encefálico depende del transporte transcelular y no del paracelular. Las células del endotelio capilar encefálico y las células gliales pericapilares con sus características peculiares constituyen la barrera hematoencefálica. Como consecuencia, la liposolubilidad de las formas no ionizada y libre del compuesto constituye un factor determinante en su captación por el encéfalo, es decir, cuanto más lipofílico sea, con mayor facilidad cruzará la BHE. Algunos fármacos penetran en el SNC (Sistema Nervioso Central) gracias a ciertos transportadores que normalmente participan en el transporte de nutrientes y compuestos endógenos desde la sangre hasta el cerebro (ej. glucoproteína P) (Goodman y Gilman, 12° edición 2012).

La biodisponibilidad es un concepto farmacocinético que alude a la fracción del total de droga administrada que está disponible y la velocidad a la cual alcanza su diana, es decir el tejido sobre el que debe actuar. Dado que ésta cuantificación es imposible de hacer, se considera que la biodisponibilidad es equivalente a los niveles alcanzados en la circulación sistémica. Por lo tanto, se define a la biodisponibilidad como el porcentaje de compuesto que aparece en el plasma (Godman y Gilman, 12° edición 2012).

Las vías de administración de compuestos son las rutas de entrada al organismo y es de suma importancia conocer las ventajas y desventajas de cada una de ellas y evaluar cuál es la más apropiada para ser utilizada en una situación particular. La Tabla 3I muestra las vías de administración más frecuentes. Aunque los desarrollos de medicamentos más recientes se centran en la administración oral, la administración intravenosa (iv) sigue siendo la ruta más directa y eficiente para entregar compuestos, ya que en la sangre venosa la biodisponibilidad es completa y rápida (Desai, 2012; Godman y Gilman, 12° edición 2012).

Vía de Administración	Patrón de Absorción	Ventajas	Desventajas
Intravenosa (iv)	Se evita la absorción	Biodisponibilidad completa y rápida. Se pueden administrar grandes volúmenes, sustancias irritantes o mezclas complejas	Aumenta el riesgo de efectos adversos. Debe administrarse lentamente. No es apropiado para soluciones poco solubles o aceitosas
Subcutánea (sc)	Absorción inmediata a partir de una solución acuosa. Absorción lenta y sostenida a partir de preparados de depósito	Adecuada para suspensiones poco solubles	No es adecuada para volúmenes grandes. Posible dolor o necrosis cuando la sustancia es irritante
Intramuscular (im)	Absorción inmediata a partir de una solución acuosa. Absorción lenta y sostenida a partir de preparados de depósito	Adecuada para volúmenes moderados, vehículos aceitosos y sustancias irritantes. Adecuada para autoadministración	Prohibida durante el tratamiento con anticoagulantes
Intraperitoneal (ip)	Absorción inmediata debido a la abundante vascularización en la superficie en el peritoneo	Útil en investigaciones en modelos animales	Puede producir irritaciones, perforación de órganos, infecciones, adherencias, no se utiliza con frecuencia en seres humanos
Oral	Absorción variable	Cómoda, segura y económica	Biodisponibilidad errática e incompleta

Tabla 3I. Características, ventajas y desventajas de las vías de administración más frecuentes de compuestos (Adaptación de Goodman y Gilman, 12ª edición 2012).

A pesar de existir diferentes estrategias de administración de un compuesto, uno de los desafíos en el suministro de agentes terapéuticos es lograr la mejor entrega de fármacos a tumores sólidos. La dificultad en el caso de tumores sólidos se debe a varios factores. Entre ellos podemos mencionar que la vasculatura tumoral no es simplemente una línea proveedora de nutrientes para los tumores, sino que gobierna la fisiopatología de los tumores sólidos, es decir su crecimiento, invasión, metástasis y respuesta a diferentes terapias (Fukumura y Jain, 2007). Además, es ampliamente conocido que los vasos sanguíneos tumorales son heterogéneos con respecto a su organización, función y estructura (Nagy et al., 2009) y muy permeables. 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 (Fukumura y Jain, 2007; Nagy et al., 2009). Los vasos tumorales generalmente exhiben un curso serpenteante, ramificaciones irregulares y forman anastomosis arteriovenosas. El flujo sanguíneo a través de los tumores no sigue un camino

constante y unidireccional (Nagy et al., 2009). Asimismo, la estructura de las paredes vasculares también es anormal dentro de los tumores (Jain, 2005). Todas estas anomalías contribuyen a un flujo sanguíneo heterogéneo, a una hipertensión intersticial (elevada presión hidrostática fuera de los vasos sanguíneos), hipoxia y acidosis, lo cual añade barreras para la entrega del compuesto (Jain, 2005; Duda et al., 2007; Desai, 2012).

Otro factor a considerar en la entrega de compuestos a tumores sólidos es la presencia de una alta densidad de células tumorales y un estroma tumoral denso que puede obstaculizar aún más el movimiento de drogas dentro de los tumores. En particular, la presencia de colágeno en la matriz extracelular del tumor es un factor importante de limitación en la penetración del fármaco en el intersticio del mismo. Aunque los tumores plantean estas barreras para la administración de fármacos, la patología y los mecanismos biológicos naturales de los tumores, aún sin explorar, dejan grandes oportunidades para optimizar el suministro de drogas en este tipo de tumores (Desai 2012).

Dentro de las vías de administración, la inyección intratumoral es la mejor vía de administración de compuestos para lesiones pobremente vascularizadas. En el caso de tumores múltiples o lesiones grandes, generalmente está aceptado que las formas más convenientes de administración son la inyección intravenosa (iv) e intra-arterial (ia), aunque ésta última se ha demostrado que causa efectos adversos (Mevio et al., 2012).

Después de su absorción o administración en el torrente circulatorio general, un compuesto se distribuye en los líquidos intersticiales e intracelulares. Los factores que rigen la rapidez de "llegada" y la posible cantidad del fármaco que se distribuye en los tejidos son el gasto cardíaco, la corriente sanguínea regional, permeabilidad capilar y el volumen sanguíneo. Con excepciones como el cerebro, la difusión del fármaco en el líquido intersticial se hace con gran rapidez, por la naturaleza altamente permeable de la membrana del endotelio capilar. Por tal razón, la distribución en los tejidos depende del coeficiente de reparto del fármaco entre la sangre y el tejido particular. El factor determinante más importante en el coeficiente de reparto sangre/tejido es la unión relativa del fármaco a las proteínas plasmáticas (ej. albúmina, glucoproteína ácida α_1) y macromoléculas plasmáticas (ej. globulina) (Goodman y Gilman, 12ª edición 2012).

Los compuestos se eliminan del organismo sin cambios, mediante el proceso de excreción, o se transforman en metabolitos. Los órganos excretores (excluido el pulmón) eliminan compuestos polares con mayor eficacia que sustancias de gran liposolubilidad. Por tal razón, los compuestos liposolubles no se eliminan de manera fácil, hasta que se metabolizan a compuestos más polares. Los riñones son los órganos más importantes para excretar compuestos y sus metabolitos. Otro tipo de eliminación de sustancias del organismo incluye: heces, sudoración, leche materna o eliminación pulmonar (Goodman y Gilman, 12ª edición 2012). La biotransformación o metabolismo de compuestos, que principalmente ocurre en el hígado, se refiere al conjunto de reacciones químicas del tipo enzimáticas y no enzimáticas, por medio de las cuales los tejidos modifican la estructura química de los compuestos, generando metabolitos más polares y por

ende más solubles y más fácilmente eliminables por orina. El metabolismo o biotransformación de compuestos, al igual que la absorción, distribución y excreción, se realizan a través de los mecanismos normales del organismo, ya que no existen mecanismos específicos para cada uno de los compuestos.

Por último, podemos mencionar que el método corriente más utilizado para la caracterización farmacocinética de un compuesto consiste en representar al organismo como un sistema de compartimentos, aún cuando frecuentemente éstos compartimentos no tengan realidad anatómica o fisiológica manifiesta. Existen varios modelos compartimentales, pero la mayoría de los compuestos confieren al organismo las características de un modelo bi-compartimental. Cualquier representación del organismo como modelo bi-compartimental tras una inyección intravenosa (iv), dará por resultado una caída bi-exponencial de los niveles plasmáticos en función del tiempo. Existen tres tipos posibles de sistemas bi-compartimentales (Fig. 7I), que se diferencian entre sí por el hecho de que la eliminación se realiza en el compartimento central, en el compartimento periférico o en ambos. Basándose en datos experimentales (concentración plasmática y/o eliminación urinaria del compuesto) estos modelos son matemáticamente indistinguibles. En ausencia de información que indique lo contrario, normalmente se da por sentado que en los sistemas bi-compartimentales, la eliminación del compuesto solo se realiza en el compartimento central (Fig. 7I a) (Gibaldi y Perrier, 1982).

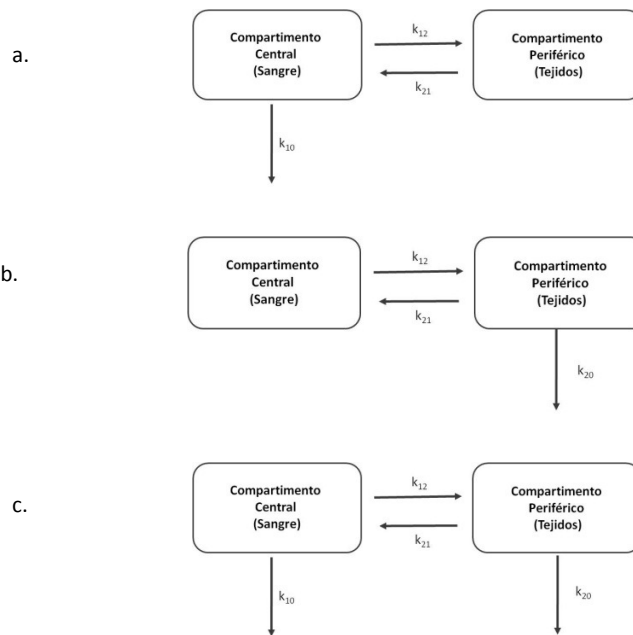


Fig. 7I. Representación esquemática de los tres tipos posibles de sistemas bi-compartimentales, constituidos por un compartimento central y uno periférico. a. Eliminación del compartimento central, b. eliminación del compartimento periférico y c. eliminación de ambos compartimentos. (k_{12} y k_{21} : constantes de velocidad de distribución inter-compartimentales de primer orden; k_{10} : constante de velocidad de eliminación de primer orden aparente del compartimento central; k_{20} : constante de velocidad de eliminación de primer orden aparente del compartimento periférico).

En el contexto de los conceptos generales de ADME explicados previamente, en BNCT resulta indispensable conocer el contenido de boro en los diferentes tejidos y sangre. Se debe establecer si existe un contenido de átomos de ^{10}B en las células neoplásicas (aproximadamente $20 \mu\text{g } ^{10}\text{B/g}$ de tejido ó $20 \text{ ppm } ^{10}\text{B}$) que garantice que ocurra un número suficiente de reacciones $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ que produzca daño significativo en las células cancerosas y perjudique lo menos posible a las células normales en el volumen de tratamiento. En el inciso siguiente se realiza una descripción de las características, forma de realización e importancia de los estudios de biodistribución con compuestos borados para la terapia con BNCT.

2.2.2 Biodistribución de compuestos borados para BNCT

Los estudios de biodistribución con compuestos borados para BNCT nos brindan información acerca de:

- a. Los valores absolutos de concentración de B en los tejidos con relevancia clínica, como sangre, tumor y tejidos limitantes de dosis.
- b. El grado de selectividad en la incorporación del compuesto borado al tejido tumoral (Tumor/Tejido Normal, Tumor/Sangre).
- c. La selección del tiempo post-administración del compuesto borado al cual se realizaría la irradiación con neutrones para BNCT que maximiza la concentración absoluta y relativa de boro en tumor.
- d. La determinación de la componente boro de la dosis total de BNCT administrada, establecida a partir de cálculos dosimétricos en función de la[B].

En base a los estudios radiobiológicos de BNCT realizados por nuestro grupo de trabajo en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster empleando diferentes compuestos borados (Kreimann et al., 2001b; Trivillin et al., 2004; Heber et al., 2004, 2006; Pozzi et al., 2009; Garabalino et al., 2011), nosotros establecimos una guía para la selección de compuestos borados y protocolos de administración con potencialidad terapéutica, según los siguientes criterios:

- a. Sin manifestación de toxicidad
- b. Concentración absoluta de boro en tumor $\geq 20 \text{ ppm}$
- c. Relación de concentración de boro Tumor/Tejido normal (T/N) ≥ 1
- d. Relación de concentración de boro Tumor/Sangre (T/S) ≥ 1

La selección de un protocolo con potencialidad terapéutica para BNCT, no sólo se basa en los criterios anteriores, sino que también depende de la microdistribución del compuesto borado en tejido. Los estudios de microdistribución nos brindan información acerca de la distribución espacial del boro en las distintas estructuras tisulares de tumores sólidos o tejidos sanos. Dado el corto alcance de las partículas de alto LET que constituyen la componente boro de la dosis, la

microdistribución del boro tiene gran relevancia terapéutica. La microdistribución de boro puede ser estudiada mediante la técnica de autorradiografía neutrónica (ARN) (Portu et al., 2015).

En general, los estudios de biodistribución *in vivo* que se realizan para estudiar el comportamiento farmacocinético de un compuesto en un organismo involucran los siguientes pasos:

- Generación del modelo experimental de la patología a estudiar
- Preparación de la solución del compuesto
- Administración del compuesto a diferentes dosis y por distintas vías de administración
- Toma de muestra de tejidos relevantes a distintos tiempos post administración
- Medición del compuesto o metabolito por medio de técnicas cuali o cuantitativas
- Análisis de los resultados experimentales

La Fig.8 muestra el esquema de estudios de biodistribución realizados en los modelos experimentales utilizados en ésta tesis doctoral. Cada uno de los pasos involucrados en los estudios de biodistribución se encuentra detallado en Materiales y Métodos.

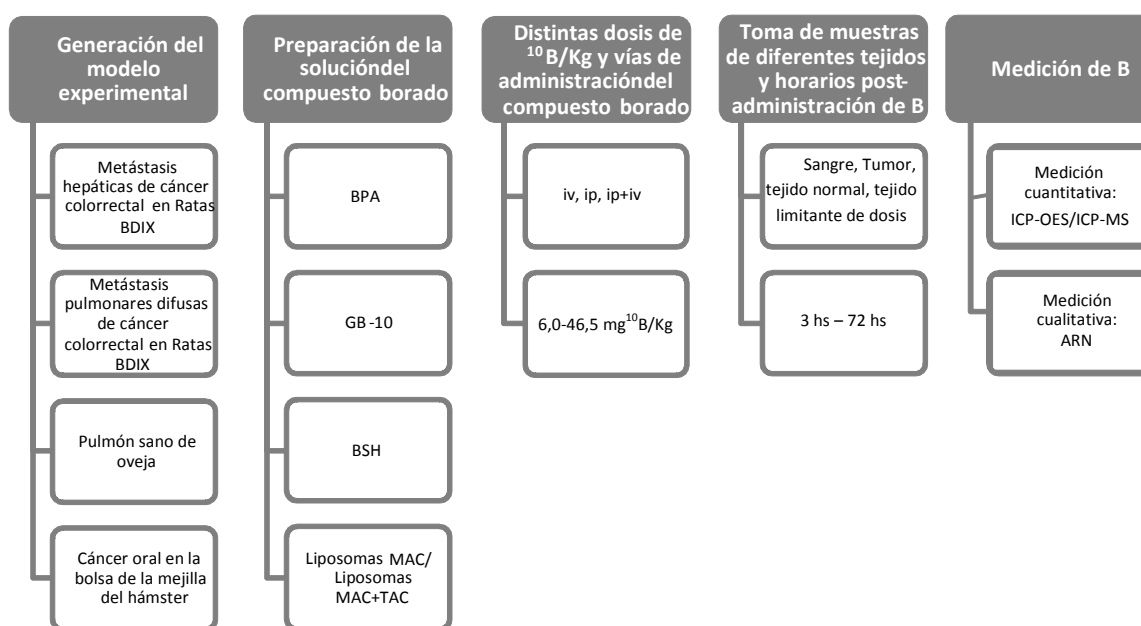


Fig. 8I. Representación esquemática de los pasos involucrados en los estudios de biodistribución de boro en diferentes modelos experimentales. Las dosis de $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ y tiempos post-administración mostrados son valores mínimos y máximos utilizados en nuestros experimentos. BPA (borofenilalanina); GB-10 (decahidro decaborato de sodio); BSH (borocaptato de sodio); iv (intravenoso); ip (intraperitoneal); ICP-OES (Espectrometría Óptica por Plasma Inductivo); ICP-MS (Espectrometría de Masa por Plasma Inductivo); ARN (Autorradiografía Neutrónica).

2.3 Clasificación de compuestos borados

El boro (B) es un elemento no metálico, el cual posee cinco protones en su núcleo junto con cinco o seis neutrones, generando así dos formas de isótopos estables: ^{10}B (con abundancia del 19,8%) y ^{11}B (con abundancia del 80,2 %), con un peso atómico promedio de 10,81 Da. En la naturaleza el boro se presenta en forma de ácido bórico (H_3BO_3) ó boratos, principalmente borato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) también conocido como Bórax (Farhat et al., 2013). 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 B y el C son los únicos dos elementos capaces de generar familias de compuestos químicos uniéndose entre ellos, propiedad conocida como concatenación (Grimes 2004) o a otros elementos debido a sus estructuras electrónicas (Hawthorne y Lee, 2003; Das et al., 2013). A diferencia de las estructuras de anillos y cadenas que forman los átomos de C, el B, debido a los 3 últimos electrones de su capa de configuración externa (CEE: $1s^2 2s^2 1p^1$), adopta diversas formas tipo clusters que dan lugar al desarrollo de una amplia variedad de compuestos boranos poliédricos (Grimes 2004). Además, la química del boro permite que sea incorporado en muchas estructuras diferentes debido a las uniones estables que se producen entre los átomos de boro y otros elementos como el C, oxígeno (O) y nitrógeno (N) y a su pequeño número atómico que le permite reemplazar al C en muchas estructuras orgánicas y formar uniones covalentes con heteroátomos que pueden ser muy estables (Barth et al., 1990).

La mayoría de los reactivos de boro trivalente (B^{+3}) son electrófilos. Sin embargo, cuando un átomo de boro trigonal acepta un par de electrones de una especie nucleofílica, adopta una configuración tetraédrica (sp^3), y se completa la regla del octeto (Fig. 9I). Esta configuración favorece las aplicaciones biológicas del boro (Das et al., 2013).

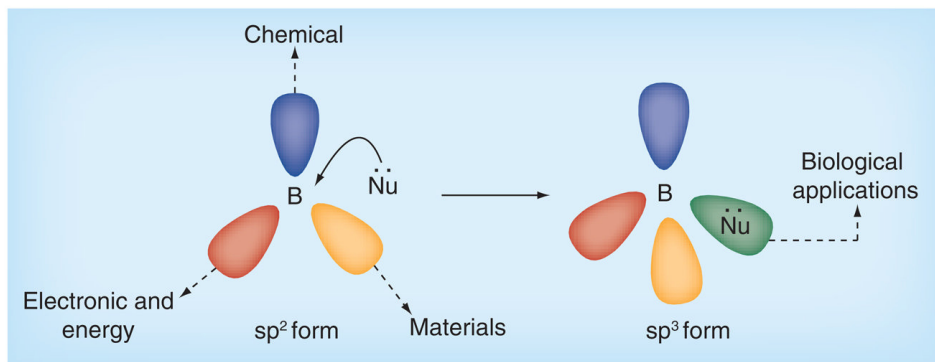


Fig. 9I. Modificaciones en la configuración electrónica externa (CEE) del Boro. La configuración sp^3 favorece las aplicaciones biológicas del átomo de Boro (Das et al., 2013).

BNCT utiliza el isótopo de B-10 no sólo debido a sus características químicas sino también a sus propiedades radioquímicas. Por ejemplo, su alta sección eficaz de captura neutrónica (www-nds.iaea.org) le brinda la ventaja de poseer alta probabilidad para la reacción de captura con neutrones térmicos [$^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$], emitiendo partículas de alto LET y corto alcance. De esta manera,

se limita el efecto de la radiación a aquellas células que incorporaron suficiente cantidad de ^{10}B (células tumorales), sin generar un daño significativo a las células normales circundantes.

Para que BNCT sea potencialmente exitoso, el compuesto transportador de Boro, debe cumplir las siguientes características:

1. Presentar baja toxicidad sistémica, de modo que la dosis administrada sea bien tolerada por animales y, eventualmente, pacientes (Barth et al., 2005).
2. Debe ser un portador eficiente y estable de átomos de boro. La eficiencia se refiere a que pueda “portar” y “entregar” una gran cantidad de átomos de boro.
3. La cantidad absoluta de átomos de boro incorporada al tumor debe ser suficiente para dar lugar a la cantidad necesaria de reacciones de captura con neutrones térmicos para producir un daño importante al tumor (se considera necesaria la incorporación en tumor de aproximadamente 10^9 átomos de ^{10}B /célula ó $20\ \mu\text{g}\ ^{10}\text{B}/\text{g}$ ó $20\ \text{ppm}\ ^{10}\text{B}$) (Barth et al., 2005). Estos valores son orientativos y dependerán, entre otros factores, de la eficacia biológica de cada compuesto borado (CBE) y de las patologías a tratar.
4. La microlocalización del compuesto borado debe favorecer el daño a los blancos subcelulares tumorales más radiosensibles. El mayor efecto letal se lograría si la partícula de alto LET producida impactara en el núcleo de la célula, particularmente en el ADN. Por lo tanto, es deseable que los compuestos borados se acumulen dentro o cerca del núcleo (Kobayashi et al., 1982; Gabel et al., 1987; Hartman et al., 1994). Otros potenciales blancos subcelulares son la mitocondria, lisosomas, retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Barth et al., 2005).
5. El compuesto borado debe poseer un clearance rápido de la sangre y tejidos normales y alta persistencia en tumor durante el tratamiento con BNCT (Barth et al., 2005).
6. La solubilidad en agua es un factor importante para un agente transportador de boro que se administra en forma sistémica. En el caso que sea necesario que el compuesto atraviese la barrera hematoencefálica (tumores de cerebro o metástasis cerebrales), el compuesto debe poseer la característica química de lipofilia para que cruce la barrera defectuosa entre cerebro y tumor (Barth et al., 2005).
7. El peso molecular del agente portador que contiene el boro también es un factor importante, ya que determina la tasa de difusión tanto en tejidos normales como en el tumor (Barth et al., 2005).

En la actualidad todavía no existe un único compuesto que cumpla con todos estos requisitos (Barth et al., 2005). Sin embargo, diferentes grupos de investigación trabajan en la síntesis de nuevos compuestos borados, con el objetivo de mejorar la eficacia terapéutica de BNCT mediante distintas estrategias químicas, biológicas y farmacológicas (ej: Nizioł et al., 2014; Achilli et al., 2014; Goszczyński et al., 2015). Debido a que cada compuesto borado puede acumularse en diferentes sub-poblaciones de células tumorales de manera distinta, el uso de la combinación de

múltiples agentes de entrega de boro es probablemente una de las mejores opciones para alcanzar no sólo diferentes sub-poblaciones de células tumorales sino también distintos sitios subcelulares. Cuando se administran en forma combinada, los compuestos podrían ser utilizados con dosis individuales menores, reduciendo la toxicidad sistémica y, al mismo tiempo, mejorando los niveles de boro y la homogeneidad en el targeting de boro en tumor para optimizar el efecto terapéutico (Barth et al., 2005).

Los primeros ensayos clínicos de BNCT para tratar tumores cerebrales, en la década de 1950 y comienzos de 1960, utilizaron ácido bórico (H_3BO_3) y algunos de sus derivados (bórax $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) como agentes de entrega, pero éstos simples compuestos químicos, llamados de primera generación, eran no selectivos, tenían pobres retenciones en las células tumorales de glioblastoma multiforme y las relaciones de concentración de boro en tumor/cerebro eran bajas (Barth et al., 2005).

También por aquellos años, otros tres compuestos de boro de bajo peso molecular surgieron de varias investigaciones: el (L)-4-dihidroxi-borilfenilalanina, también llamado BPA (Fig.10I, compuesto 1), basado en ácido arilborónico; el mercaptoundecahidro-*closo*-dodecaborato de sodio, denominado BSH (Fig.10I, compuesto 2), basado en un nuevo anión borano poliédrico (Barth et al., 2005) y el decahidro-*closo*-borato de sodio llamado GB-10 (Fig.10I, compuesto 3). Estos compuestos denominados de segunda generación poseían baja toxicidad, persistían más tiempo dentro de los tumores en modelos animales (comparados con moléculas similares) y tenían relaciones de concentración de boro en tumor/cerebro y tumor/sangre mayores o iguales a 1.

Los compuestos borados denominados de tercera generación consisten principalmente de un grupo de átomos de boro estable o *cluster* unido a través de un enlace hidrolíticamente estable a un arreglo molecular, tal como biomoléculas de bajo peso molecular, anticuerpos monoclonales (mAb), liposomas o nanopartículas, los cuales están dirigidos al tumor. Los nuevos agentes de bajo peso molecular de ésta generación, diseñados y sintetizados para la entrega de boro, pueden ser clasificados en:

(a) Aminoácidos borados y boranos poliédricos: son derivados de BPA y otros aminoácidos borados, tales como glicina (G), alanina (A), ácido aspártico (D), tirosina (Y), cisteína (C) y metionina (M), como así también aminoácidos de origen no natural (ej. Kabalka et al., 2009). La ventaja de los aminoácidos no naturales es que su capacidad para penetrar en el núcleo puede reducir los requerimientos de dosis para BNCT y proporcionar una elevada relación de concentración de boro Tumor/Tejido Normal. Sin embargo, la desventaja es que sólo proporciona un único átomo de boro por molécula (Luderer et al., 2015). Con respecto a los compuestos boranos poliédricos, éstos se caracterizan por ser incorporados rápidamente a moléculas orgánicas, poseer alto contenido de boro, ser estables química e hidrolíticamente, ser hidrófobos y en la mayoría de los casos tener carga negativa. Aunque éstos compuestos han mostrado poca especificidad por el tumor se los considera buenos candidatos para ser encapsulados, por ejemplo en liposomas (ej. Hawthorne et al., 1996). También se han estudiado compuestos borados en base

a di-péptidos, los cuales han demostrado baja toxicidad y buenas propiedades de localización tumoral (ej. Takagaki et al., 2001).

(b) Precursores bioquímicos y agentes de unión a ADN: se han sintetizado y evaluado en estudios *in vitro* e *in vivo* varios precursores bioquímicos borados análogos de ácidos nucleicos, incluyendo purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos (ej. Fig. 10I, compuestos 4 y 5). El mecanismo propuesto de captación para éstos compuestos se basa en la formación de nucleótidos intracelulares, lo cual aumentaría la retención de éstos compuestos borados en los tumores (ej. Al-Madhoun et al., 2004; Barth et al., 2004). Los precursores borados ensayados mostraron baja toxicidad, captación selectiva en tumor y tasas significativas de fosforilación en los nucleótidos. Otra clase de agentes de entrega de boro debajo peso molecular son las moléculas de unión al ADN (ej. Tietze et al., 2002), tales como agentes alquilantes, intercaladores, moléculas de unión a surcos del ADN ("groove binders"), y poliaminas (ej. Fig. 10I, compuesto 6). Una limitación de éstos compuestos es la frecuente presencia de toxicidad a nivel *in vitro* e *in vivo*, aunque recientemente se han sintetizado nuevos compuestos de unión al ADN con baja citotoxicidad, que no han sido evaluados biológicamente (Barth, 2012).

(c) Porfirinas boradas y otras estructuras relacionadas: varios colorantes fluorescentes borados, incluyendo acridinas, fenantridinas, porfirinas y derivados de ftalocianinas han sido sintetizados y evaluados (ej. Evstigneeva et al., 2003; Smilowitz et al., 2013). Estos compuestos poseen la ventaja de ser detectados fácilmente y ser cuantificables por microscopía de fluorescencia. Debido a sus estructuras aromáticas planas éstos compuestos tienen el potencial de interactuar con el ADN de las células. Entre éstos macrociclos, las porfirinas boradas (ej. Fig.10I, compuesto 7) han motivado especial atención debido a que poseen baja toxicidad sistémica (comparada con otros colorantes), sus procesos de síntesis son fáciles (obteniéndose elevados contenidos de boro > 44% en peso) y son altamente estables (ej. Fronczek et al., 2005). Las porfirinas boradas tienen excelentes propiedades de incorporación preferencial a tumor (ej. Kreimann et al., 2003). No sólo se han propuesto para estas porfirinas aplicaciones como agente de entrega de boro sino también como fotosensibilizador para la terapia fotodinámica de tumores cerebrales (Asano et al., 2014).

(d) Otros compuestos borados de bajo peso molecular: se han sintetizado una gran variedad de carbohidratos derivados de BSH y otras moléculas como glucosa, manosa, ribosa, gulosa, fucosa, galactosa, maltosa (ej. Fig.10I, compuesto 8) y lactosa boradas, algunas de las cuales han sido evaluadas en estudios *in vitro* e *in vivo* (ej. Marepally et al., 2013). Estos compuestos son por lo general altamente solubles en agua, y como una posible consecuencia de ello, han demostrado tener baja toxicidad y escasa incorporación a las células tumorales. Se ha sugerido que sus derivados hidrófilos de bajo peso molecular tienen poca capacidad para atravesar las membranas celulares del tumor. Sin embargo, podrían acumularse selectivamente dentro de la bicapa de la membrana glicerosfolípida y en otras áreas del tumor, tales como la vasculatura. Otras moléculas boradas de bajo peso molecular que se han diseñado y sintetizado, son las de unión a receptores, principalmente los antagonistas de hormonas esteroides, tales como derivados de tamoxifeno, 17H-estradiol, colesterol y ácido retinoico (ej. Valliant et al., 2002).

Las propiedades biológicas de estos agentes dependen de la densidad de los sitios receptores específicos, aunque hasta la fecha se han reportado muy pocos datos biológicos. Otros compuestos borados de bajo peso molecular desarrollados incluyen fosfatos, fosfonatos (ej. Fig. 10I, compuesto 9), fenilureas, tioureas, nitroimidazoles, aminas, benzamidas, isocianatos, nicotinamidas, azuleno y derivados de decualinios (ej. Fig.10I, compuesto 10).

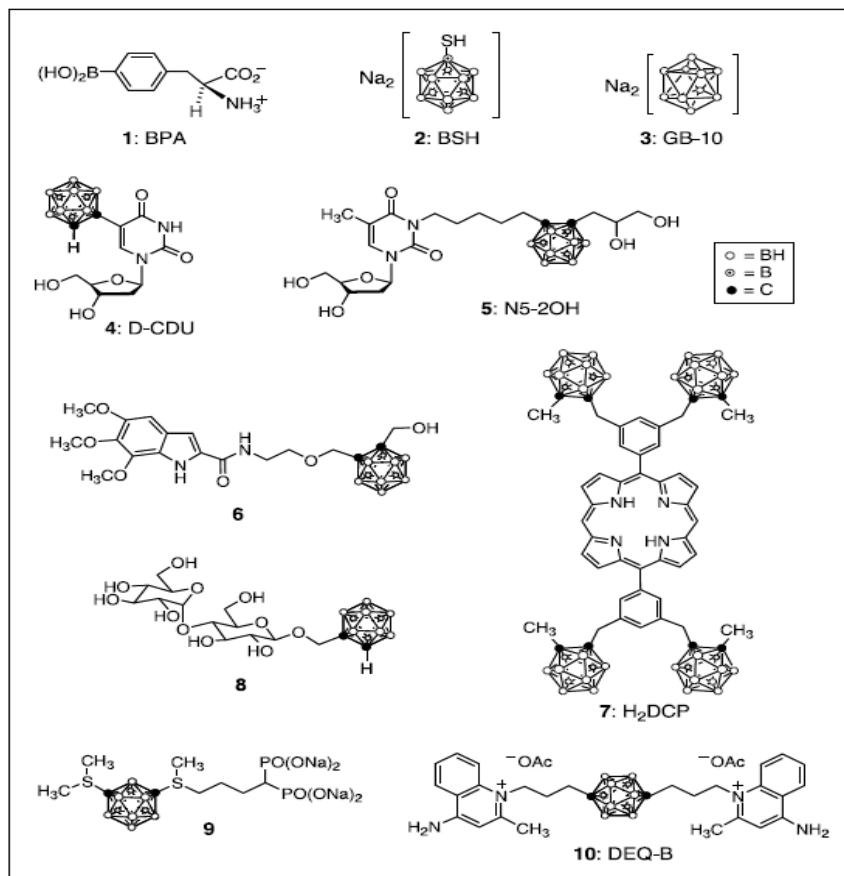


Fig. 10I. Estructura química de distintos compuestos borados desarrollados para BNCT (Barth et al., 2005).

Dentro del grupo de compuestos borados denominados de tercera generación existen, además de los de bajo peso molecular descritos anteriormente, los llamados agentes borados de alto peso molecular. Estos pueden ser clasificados en:

- (a) Anticuerpos monoclonales (Monoclonal antibodies: mAb) (Fig. 11I): los anticuerpos monoclonales y sus fragmentos, que pueden reconocer un epítipo asociado a tumores, son de interés como agentes de entrega de boro (ej. Yang et al., 2009). Los anticuerpos monoclonales borados son muy específicos pero poco eficientes, ya que pueden “cargar” pocos átomos de boro (Barth et al., 1990). Respecto a la estabilidad, el compuesto en sí

podría ser específico para el tumor, pero si es inestable cedería boro a todos aquellos tejidos por los cuales circule. Los mAb borados administrados sistémicamente se incorporan a cerebro y tumores cerebrales sólo en cantidades muy pequeñas, debido a su rápida eliminación por el sistema reticuloendotelial y la barrera hematoencefálica (BHE), lo que limita efectivamente su capacidad para cruzar las células endoteliales vasculares (Luderer et al., 2015).

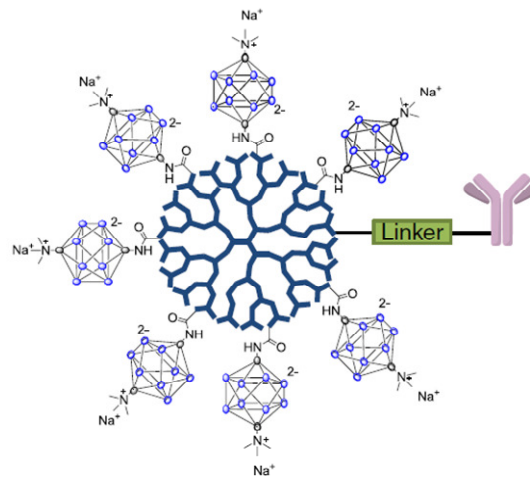


Fig. 11I. Ejemplo de la estructura química de un anticuerpo monoclonal conjugado a un dendrímero poliaminoamida borano (Luderer et al., 2015).

(b) Polímeros catiónicos (Fig. 12I): se han utilizado polímeros catiónicos borados para tratar pólipos de cáncer de colon en un modelo experimental en ratas (Azab et al., 2005). Los polímeros borados fueron administrados localmente por perfusión directa de la solución en el lumen del colon dando lugar a una concentración alta de boro en los pólipos, mientras que los niveles de boro detectados en sangre, ganglios linfáticos, riñón, hígado y bazo fueron significativamente más bajos. Los polímeros tienen múltiples ventajas para ser utilizados en BNCT: proporcionan alta carga de boro al tumor y tienen una distribución sistémica no específica menor cuando se administran directamente en el tracto intestinal. La farmacocinética de un polímero puede ajustarse con precisión según la relación de los monómeros que lo componen. Además, los polímeros pueden estar enlazados a varios grupos diana para ayudar a mejorar su selectividad ($> T/TN$). Las principales desventajas de los polímeros son que la administración sistémica puede llevar a la acumulación de los mismos en órganos filtrantes y que tienen baja penetración a través de la BHE, en el caso de tratar gliomas (Luderer et al., 2015).

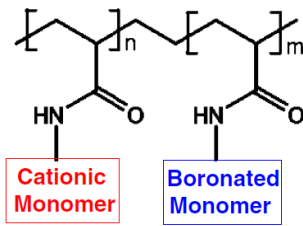


Fig. 12I. Ejemplo de la estructura química de un polímero borado utilizado como potencial agente para BNCT. El copolímero contiene un esqueleto de acrilamida, un monómero borado ácido y un monómero catiónico (Luderer. et al., 2015).

- (c) Péptidos penetrantes de membrana celular (cell-membrane penetrating peptide: CPP) (Fig.13I): La ventaja de un CPP es que mejora la captación de agentes con un alto porcentaje de boro en su composición que típicamente tienen una pobre acumulación intracelular (ej. BSH).La incorporación celular mejorada del Boro se atribuye en parte a la porción rica en arginina cargada positivamente del CPP (11 residuos de arginina) que promovería la acumulación intracelular de BSH aniónico.Sin embargo, un CPP puede causar captación inespecífica en otros órganos, lo cual es indeseable durante la irradiación de neutrones.

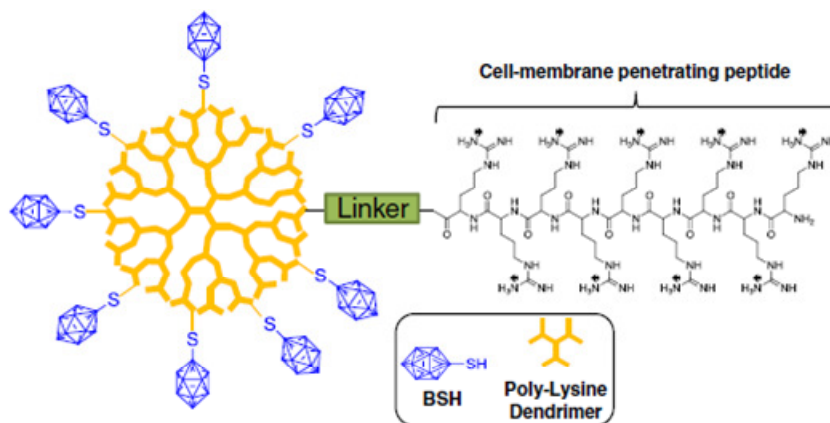


Fig. 13I. Ejemplo de la estructura química de un dendrímero con BSH unido a un péptido penetrante de membrana celular (Luderer. et al., 2015).

- (d) Liposomas: la nueva era de compuestos borados para BNCTse inició en la década de 1990 cuando se propuso un nuevo enfoque de entrega de agentes con boro, diferentes al BPA y al BSH, situados dentro de núcleos hidrofílicos de liposomas (Safronov, 2014). Los liposomas (Fig. 14I) son conocidos como vesículas lipídicas esféricas que se forman a través de la acumulación de lípidos que interactúan entre sí de una manera energicamente favorable y que pueden encapsular un fármaco de interés (Luderer et al., 2015; Khodabandehloo et al., 2016). Los liposomas son vesículas que consisten en una o más bicapas de fosfolípidos sintéticos o naturales como esfingomielina, fosfatidilcolina o glicerofosfolípidos (Craparo et al., 2011;

Mc Carthy et al., 2015; Khodabandehloo et al., 2016). Las propiedades físicas y químicas de un liposoma, incluyendo su permeabilidad, densidad de carga e impedimento estérico, dependerán de los fosfolípidos que lo constituyen (Khodabandehloo et al., 2016). Existen liposomas pequeños unilamelares (< 100 nm), grandes unilamelares (> 100 nm) ó multilamelares (> 500 nm) (Veszeka et al., 2015). La estructura de los liposomas es similar a las membranas plasmáticas de las células. El uso de liposomas como sistemas de suministro de fármacos presenta varias ventajas, incluyendo diversidad en la morfología, composición, capacidad para encapsular y proteger muchos tipos de biomoléculas terapéuticas, ausencia de inducción de respuesta inmunológica, bajo costo y características de liberación diferencial (Tros de Iarduya et al., 2010). Los liposomas pueden entregar grandes cantidades de agentes tóxicos a las células tumorales ya que se acumulan en la vasculatura dañada de los tumores, poseen rápida eliminación de la sangre y una alta acumulación en hígado (Coderre et al., 2003). Incluso sin direccionamiento celular los liposomas pueden mejorar la administración de fármacos y reducir la citotoxicidad de compuestos (ej. Doxorubicina) (Wicki et al., 2015). Al igual que las nanopartículas, la superficie de los liposomas también puede modificarse para incluir estructuras dianas (por ej. PEG, polietilenglicol) (Luderer et al., 2015).

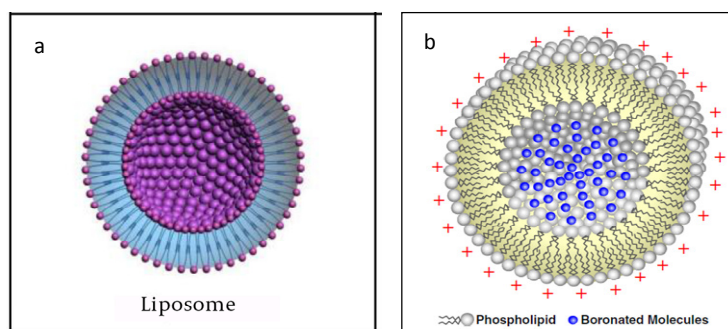


Fig. 14I. Ejemplo de la estructura química de un liposoma no modificado (a) y positivamente cargado en la superficie conteniendo moléculas de boro. (Luderer et al., 2015; Khodabandehloo et al., 2016).

Se cree que los liposomas se acumulan dentro de los tumores debido al efecto de permeabilidad y retención mejorada (Enhanced Permeability and Retention effect: EPR) (Desai, 2012). La mayoría de los tumores sólidos tiene una arquitectura de vasos sanguíneos defectuosos, acoplada a una amplia producción de factores de permeabilidad vascular (Fang et al., 2012; Maeda, 2015). Esta combinación contribuye al efecto EPR y facilita el transporte de macromoléculas al tumor (Fig. 15I). Específicamente, las macromoléculas de más de 40 kDa pueden salir selectivamente de los vasos tumorales y quedan retenidas en el tejido tumoral (Fang et al., 2012). La acumulación intratumoral de liposomas depende significativamente del EPR. Dentro de los liposomas se han encapsulado distintos compuestos, por ejemplo cationes carboranos lipofílicos deslocalizados que se acumulan selectivamente en las mitocondrias de las células tumorales (Theodoropoulos et al., 2013).

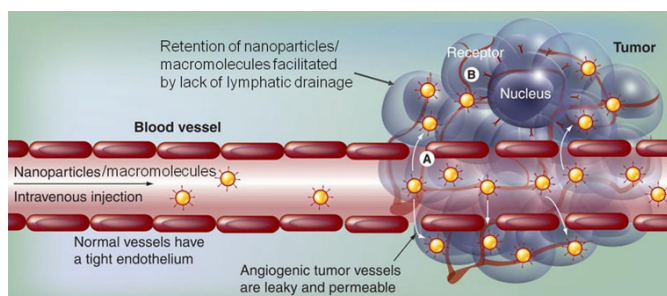


Fig. 15I. Administración de fármacos mejorada para tumores sólidos usando nanopartículas o macromoléculas: efecto mejorado de permeabilidad y retención (Enhanced Permeability and Retention effect: EPR). Después de la administración intravenosa, las nanopartículas o liposomas se acumulan en los tumores a través de fugas y permeabilizaciones en la vasculatura tumoral y fallas del sistema de drenaje linfático (Desai, 2012).

También se ha investigado la eficacia de los liposomas en la administración de compuestos empleando composiciones liposomales variables, usando formulaciones de lípidos catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos (Altieri et al., 2009). La encapsulación liposómica de agentes para BNCT ofrece varias ventajas potenciales ya que los liposomas son capaces de mejorar la incorporación absoluta y relativa de boro a tumor. Adicionalmente, los fármacos con baja solubilidad en agua pueden ser más adecuados para la administración dentro de una formulación de liposomas. Sin embargo, los liposomas pueden tener un potencial clínico limitado para los tumores cerebrales debido a restricciones de tamaño. Sólo los liposomas con diámetros inferiores a aproximadamente 40 nm son capaces de penetrar la BHE. En la actualidad, existen veintiún fármacos basados en liposomas que están siendo probados en ensayos clínicos (Chang et al., 2012; Ming-Kung, 2012).

- (e) Nanopartículas (NPs) (Fig. 16I): existe una amplia diversidad de nanopartículas boradas, de las cuales podemos mencionar las derivadas de polímeros (Sumitani et al., 2011; 2012), nanopartículas de sílice mesoporosas (MSNs) (Lai et al., 2013), nanocompuestos magnéticos (Zhu et al., 2010), nanopartículas de boro modificadas con dopamina (Gao et al., 2012), nanopartículas de carburo de boro (Mortensen et al., 2006), nanotubos de nitruro de boro (BNNT) (Ciofani et al., 2009) y nanopartículas de dextrano ricas en boro (Zhang et al., 2011), entre otras. De forma similar a los liposomas, la ventaja de las NPs cargadas con boro es la captación intracelular mejorada y la selectividad de incorporación a los tumores. Sin embargo, las NPs pueden tener un potencial clínico limitado para tumores cerebrales debido a que son incapaces de penetrar adecuadamente la BHE y también pueden quedar atrapadas en órganos filtrantes (Luderer et al., 2015). Una de las principales barreras que enfrenta el suministro de fármacos con partículas como vehículos de suministro de compuestos, tales como los liposomas y NPs, es la captación por el sistema reticuloendotelial (Reticuloendothelial System: RES). La absorción de partículas por el RES está en parte mediada por el hígado, el bazo y los pulmones (Brannon-Peppas et al., 2004). El aumento de la hidrofobicidad de las partículas o el tamaño se correlaciona a menudo con una mayor absorción por el RES. La eliminación de las partículas mediada por macrófagos (proceso conocido como opsonización) puede ser

minimizado mediante la creación de partículas con una superficie hidrófila y un diámetro inferior a 100 nm (Brigger et al., 2002; Khodabandehloo et al., 2016). Por lo tanto, para prolongar la circulación de portadores *in vivo* y aumentar la probabilidad de éxito en la entrega del compuesto al sitio diana, es necesario minimizar la opsonización. Esto es posible mediante dos procedimientos, que incluyen el recubrimiento superficial de las NPs con polímeros hidrófilos tales como PEG, y la construcción de portadores de polímeros de bloques biodegradables con dominios hidrofílicos e hidrófobos (Khodabandehloo et al., 2016). En cuanto al tamaño de las NPs, podemos decir que deben ser lo suficientemente grandes para evitar que se produzcan fugas en los capilares sanguíneos normales y por otro lado, deben ser suficientemente pequeñas para poder escapar de los macrófagos localizados en los RES (Khodabandehloo et al., 2016).

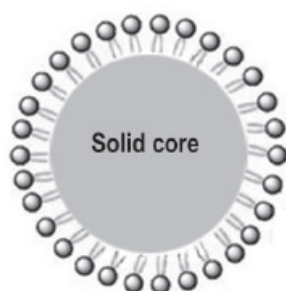


Fig. 16I. Ejemplo de la estructura química de una nanopartícula con núcleo sólido (Veszeka et al., 2015).

Aunque en éste inciso de la introducción de la presente tesis se intentó realizar un breve resumen de los compuestos borados o sistemas transportadores de ^{10}B para BNCT que existen actualmente, se puede percibir que a pesar que el desarrollo de los primeros compuestos borados comenzó hace unos 50 años, aún es una tarea difícil que continúa siendo de alta prioridad para lograr una mayor eficacia de la terapia (Moss, 2014). Cabe destacar que en la actualidad, existe una amplia variedad de compuestos borados sintetizados para BNCT que todavía no han sido ensayados en estudios *in vitro* y/o *in vivo* (ej. Xiong et al., 2015). Dado que el potencial terapéutico de un portador de ^{10}B para BNCT solamente puede ser interpretado fehacientemente en estudios radiobiológicos de BNCT *in vivo*, uno de los grandes desafíos es no sólo desarrollar agentes borados, sino evaluar su potencial ventaja terapéutica y toxicidad mediante estudios en modelos biológicos.

Hasta el presente, pocos compuestos de boro han sido aceptados para su uso en tratamientos clínicos. Sólo tres han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA, USA) bajo la categoría de IND (Investigational New Drug): el BPA (p-borofenilalanina), el GB-10 (decahidrodecaborato de sodio) y el BSH (borocaptato de sodio). Sin embargo, sólo el BPA y el BSH son utilizados en ensayos clínicos. A continuación describiremos las propiedades físicas, químicas y farmacéuticas de los compuestos borados utilizados en ésta tesis: BPA, GB-10, BSH y Liposomas

MAC y MAC+TAC, como así también haremos un breve resumen de los ensayos *in vitro* e *in vivo* experimentales, preclínicos y clínicos, con dichos compuestos.

2.3.1 BPA (p-Boro fenilalanina)

El enantiómero L-BPA ó 4 hidroxiboril-fenilalanina (Fig.17I) se asemeja estructuralmente a los aminoácidos L-fenilalanina (Phe) y L-Tirosina (Tyr), y se utiliza clínicamente debido a su mayor acumulación en células cancerosas en comparación con el enantiómero D o la mezcla racémica (Luderer et al., 2015). Su peso molecular es de 208,21 gr/mol.

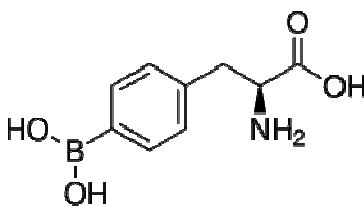


Fig. 17I Estructura química del BPA ($C_9H_{12}^{10}BNO_4$). (<http://www.katchem.cz/>)

El BPA es el compuesto borado más estudiado, dada su capacidad de llevar cantidades absolutas significativas de ^{10}B al tumor con una buena relación tumor/tejido normal y tumor/sangre. El aminoácido p-borofenilalanina (BPA) fue sintetizado a fines de la década de 1950 con la posibilidad de ser usado en BNCT (Snyder et al., 1958). En esos años los esfuerzos se concentraban en encontrar compuestos que no atravesaran la barrera hematoencefálica (BHE) 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 et al., 2001), y el hecho que sea un aminoácido podría ser la causa de que alcance altos niveles de persistencia en melanomas (Soloway et al., 1998).

Los primeros estudios de biodistribución con BPA, en un modelo de melanoma en hamster, mostraron relaciones de concentración de boro 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 farmacocinética del compuesto en pacientes con melanoma que se sometían a cirugía. Nuevamente, se encontraron buenas relaciones 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 et al., 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 preferencialmente en tumores no melanómicos, como gliosarcoma de rata, aunque atraviesa la barrera hematoencefálica del cerebro normal (Coderre y Morris, 1999). Usando la experiencia de los químicos japoneses, quienes descubrieron como solubilizar el BPA usando fructosa (Mori et al., 1989) se inició un ensayo clínico de BNCT para tratar glioblastomas con BPA como agente de captura (Sweet, 1997).

Posteriormente, el BPA se utilizó como portador de boro para el tratamiento del glioblastoma multiforme (ej. Kageji et al., 2011; Koivunoro et al., 2015), cáncer de cabeza de cuello (ej. Kankaanranta et al., 2012, Haapaniemi et al., 2016; Wang et al., 2016) y metástasis colorrectales en hígado (Zonta et al., 2006). Nuevos estudios de biodistribución en hígado con metástasis colorrectales siguen apoyando la utilización del BPA como compuesto borado para futuros ensayos clínicos (Cardoso et al., 2009). En cuanto a ensayos pre-clínicos, nuestro grupo demostró el potencial terapéutico de BNCT mediado por BPA en tumores de cabeza y cuello, en felinos domésticos con carcinomas de células escamosas espontáneos (Rao et al., 2004; Trivillin et al., 2008). Además, evaluamos diversos protocolos de BNCT/BPA y su radiotoxicidad asociada en tumores de la cavidad oral en el modelo experimental en hamsters (ej. Kreimann et al. 2001b, Trivillin et al. 2006; Molinari et al. 2011, 2012).

Así mismo, se realizaron diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* para estudiar y aumentar la captación del BPA en las células tumorales (Wittig et al., 2000; Capuani et al., 2008) y analizar su potencial utilización en otros tipos de tumores no ensayados sistemáticamente a nivel clínico como: osteosarcomas (Ferrari et al., 2009), tiroides (Perona et al., 2011), sarcoma de células claras (Fujimoto et al., 2011), próstata (Yasui et al., 2012) y pulmón (Bortolussi et al., 2011).

En cuanto a las propiedades químicas del BPA, éste compuesto presenta menor solubilidad a valores de pH fisiológicos pero ésta se incrementa significativamente a valores bajos o altos de pH (Coderre et al 1990). Para que el BPA sea lo suficientemente soluble a pH fisiológico, debe ser administrado en forma de complejo con fructosa. Mori y colaboradores (1989) estudiaron la formación de complejos entre el BPA y algunos monosacáridos, analizando el comportamiento del BPA en agua y determinando las constantes de disociación y las diferentes especies en las soluciones. Para ello, ensayaron la solubilidad del compuesto borado en mezclas con los diferentes monosacáridos, variando el pH de cada solución y observaron que con la fructosa el pH de disolución era el que poseía el valor más bajo (pH=7,98), muy cercano al valor del pH fisiológico de la sangre (7,45±0,05). Por otro lado, analizaron la formación de complejos, estudiando los espectros de ¹¹B-RMN (Resonancia Magnética Nuclear de boro-11) y UV (Espectros en Luz Ultravioleta) de las mezclas y así pudieron estimar las constantes de formación de las mismas. Estos resultados mostraron que el complejo BPA-Fructosa (1:1) presentaba la mayor constante de formación (k=2,43) a pH 7,4 y temperatura de 25º C. Por lo tanto, concluyeron que emplear las condiciones óptimas de solubilidad y estabilidad del complejo BPA-Fructosa (1:1) es la forma más adecuada para administrar la solución de manera endovenosa o intraperitoneal. Sin embargo, en la sangre el complejo es hidrolizado espontáneamente en BPA y fructosa (Kulvik et al., 2003). Recientemente, estudios de estabilidad sobre el complejo BPA-fructosa demostraron que la solución puede ser utilizada para infusión en pacientes hastaal menos una semana luego de su preparación (Heikkinen et al., 2011).

Se conoce que existe un equilibrio entre la hidrofiliidad del BPA y su citotoxicidad debido a que con el aumento de la solubilidad en agua hay una marcada disminución de la citotoxicidad en células de melanoma (Nemoto et al., 1995). Aunque el BPA hidrófilo aumenta la solubilidad en agua mediante el complejo BPA-fructosa y permite su administración por vía intravenosa (iv), esto

disminuye su capacidad de penetración de la barrera hematoencefálica (BHE) intacta, a diferencia de los compuestos liposolubles (Luderer et al., 2016).

Los valores de pH empleados en el proceso de solubilización del BPA para su administración intraperitoneal o endovenosa son mayormente los responsables de los efectos adversos en los estudios de toxicidad realizados en animales, en los cuales se ha observado que la LD50 (Dosis Letal 50) del BPA administrada en forma intraperitoneal es de 640 mg/kg a pH 1,0; 3000 mg/kg a pH 7,0 (Taniyama et al., 1989) y de 1520 mg/kg a pH 10,0 administrado en forma endovenosa (Soloway et al., 1961, LaHann et al., 1993). La solubilidad del L-BPA a pH fisiológico ($7,45 \pm 0,05$) es de sólo 1,6 g/l, lo cual es muy bajo para su administración en pacientes por vía endovenosa. A partir de la combinación con fructosa (F), BPA-F demostró ser la fórmula más estable, obteniéndose una solubilidad aproximada de 100 g/l, permitiendo así su administración en pacientes humanos (Kulvic et al., 2004, LaHann et al., 1999).

En cuanto a la toxicidad del BPA, se han realizado diferentes estudios en animales para su evaluación. En Japón se estudiaron las toxicidades agudas y sub-agudas en ratas. Se aplicaron inyecciones intraperitoneales y subcutáneas con altas dosis de BPA. De acuerdo a los resultados de los estudios de la toxicidad aguda se determinó que la LD50 a pH 7,0 es de más de 3000 mg/kg. Además los animales no mostraron diferencias significativas en la variación de peso debido a la administración de altas dosis de BPA respecto al grupo control. En cuanto a los resultados de la toxicidad sub-aguda, no se observaron diferencias en los parámetros hematológicos estudiados entre animales del grupo control y los animales tratados con bajas y medianas dosis (300 mg/kg y 700 mg/kg respectivamente). Sin embargo, se observó una disminución del nivel de hemoglobina, acompañada por un aumento en el recuento de reticulocitos y un aumento del peso del bazo a altas dosis de BPA (1500 mg/kg). A partir de los resultados obtenidos en este trabajo y debido al margen existente entre los niveles de dosis para alcanzar toxicidades agudas y sub-agudas y las dosis empleadas en BNCT, se consideró aceptable el uso de BPA en el tratamiento de melanomas (Taniyama et al., 1989).

En otro estudio en Estados Unidos, se evaluó la toxicidad aguda y crónica en distintos grupos de ratones y conejos administrando 525 y 1000 mg/kg para los estudios agudos, mientras que para los estudios crónicos se administró una dosis de BPA durante dos semanas, completando una dosis total de 5000 mg/kg de BPA vía oral. Se realizaron estudios histopatológicos de diferentes tejidos como cerebro, corazón, bazo, hígado, riñón, pulmón y colon, y además se tomaron muestras de sangre. El reporte histopatológico no mostró alteraciones relacionadas con la BPA en ningún tejido, mientras que los resultados de los análisis de sangre no mostraron variaciones significativas respecto de los valores encontrados en el grupo control (Coderre et al., 1990).

También se han estudiado los efectos de altas dosis de BPA en la función de los sistemas cardiovascular y pulmonar de ratas, para la infusión endovenosa del complejo BPA-fructosa. Se determinó que la administración endovenosa de BPA-F de hasta 3000 mg/kg es bien tolerada cuando es administrada durante un período de infusión de 1h a ratas mínimamente

instrumentadas. La infusión de más de 4000 mg/kg durante un periodo de 3 h resultó en muerte, probablemente como resultado de una disminución de la función cardiovascular inducida por la BPA; se observaron arritmias y fallas cardíacas. Estos valores de dosis de BPA están muy por encima de los valores usuales empleados para estudios de biodistribución o BNCT, e incluso superan los valores de dosis empleados en los estudios toxicológicos mencionados anteriormente.

El BPA fue aprobado para su uso por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), bajo IND # 46176 (IND, Investigational New Drug), en base a los estudios pre-clínicos realizados en el Laboratorio Nacional de Brookhaven (BNL, Brookhaven National Laboratory) que incluyeron: la demostración de la acumulación selectiva en melanoma murino (Coderre, 1987); el reporte de la aplicación exitosa de BNCT en melanoma murino luego de la administración de BPA (Coderre, 1988); y los reportes toxicológicos/histopatológicos en los cuales la dosis alcanzada fue de hasta 5000mg/kg administrados en forma oral en ratones y conejos (Coderre, 1990). También se incluyeron los resultados de los estudios realizados en Japón en animales y posteriormente en humanos (Coderre et al., 2003).

En Finlandia se realizaron estudios de toxicidad en ratas previo a la fase clínica en humanos. Los animales fueron infundidos con 2,8 g/kg de BPA, se midieron distintos parámetros como nivel de glucosa, colesterol, triglicéridos, albumina y α -, β -, γ - globulina, además de niveles de hemoglobina y leucocitos. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo infundido con BPA-F. A partir de los resultados obtenidos, sumados a la experiencia previa de otros grupos, se comenzaron los estudios clínicos en pacientes con tumores de cerebro (Kulvik et al., 2003). En cuanto a las reacciones adversas en pacientes humanos, debidas a la administración de BPA, no se han observado efectos severos en los distintos ensayos clínicos realizados.

Luego de los estudios de toxicidad realizados en animales por el grupo de Finlandia, se realizaron estudios clínicos en pacientes con tumores de cerebro. Se administraron distintas concentraciones de BPA-F por vía endovenosa a pacientes con diferentes tumores cerebrales. Se realizaron análisis de laboratorio antes de las infusiones y los pacientes fueron monitoreados en forma continua durante las infusiones y las posteriores cirugías. Se tomaron muestras de sangre antes de la infusión y 48 h después de la misma, se estudiaron parámetros como niveles de leucocitos, hemoglobina, plaquetas, creatinina y proteína C-reactiva. Los resultados de los exámenes de laboratorio mostraron incrementos que fueron clínicamente no significativos y que usualmente están presentes en pacientes que son sometidos a una craneotomía. A pesar de la pérdida de sangre sufrida durante la cirugía, los valores de eritrocitos y hemoglobina disminuyeron sólo entre 11 y 19 %. Los exámenes neurológicos luego de la operación y los resultados de los monitoreos clínicos no revelaron efectos adversos clínicamente significativos atribuibles a la infusión de BPA-F. Estos datos se consideraron suficientes para comenzar los ensayos clínicos fase III de BNCT en Finlandia (Kulvik et al., 2003).

En una serie de estudios clínicos en Suecia, se incluyeron 17 pacientes con glioblastoma que sólo habían sido tratados quirúrgicamente. Con el objetivo de aumentar la relación de

concentración diferencial de ^{10}B (tejido tumoral/tejido sano), los pacientes recibieron una infusión vía endovenosa de 900 mg/kg de BPA-F durante 6 h. En algunos pacientes se observaron casos de diarrea, dolor abdominal y cansancio, los cuales pudieron deberse a la concentración de BPA-F infundida y a los tiempos de infusión; no se observaron toxicidades serias relacionadas a la administración de BPA-F (Capala et al., 2003).

Por otra parte, en Alemania, se han realizado estudios de biodistribución con BPA-F como parte de los ensayos clínicos para tratar metástasis hepáticas con BNCT. Tres pacientes fueron infundidos con 100mg/kg de BPA-F durante 1 h y luego se tomaron muestras de tejido hepático sano y tumoral. En cuanto a la toxicidad no ocurrieron efectos adversos serios; se reportaron dolor, náusea y debilidad, los cuales fueron atribuidos a la cirugía. Se registró un caso de coagulopatía y un caso de infección en el sitio del catéter central con inflamación y fiebre. Todos los eventos se resolvieron dentro de las cuatro semanas posteriores. Con el nivel de dosis empleado en este ensayo, no se registraron casos de toxicidad luego de la infusión del complejo BPA-F (Wittig et al., 2008a).

Si bien no se han observado efectos adversos serios en los ensayos clínicos realizados en humanos, se plantea la existencia de dos criterios de exclusión de pacientes a ser tenidos en cuenta en los protocolos de administración de BPA-F: fenilcetonuria e intolerancia hereditaria a la fructosa (HFI, hereditary fructose intolerance). La disociación de la fenilalanina del BPA puede resultar en altos niveles de acumulación de fenilalanina, pudiendo ser perjudicial en pacientes con fenilcetonuria. Por otra parte, en pacientes con HFI la ingestión de fructosa produce dolores abdominales y náuseas, asociados con hipoglucemia y acidosis metabólica. La acumulación de fructosa en pacientes con HFI puede resultar en daño hepático y renal, con daños irreversibles ante una ingestión de sólo 30-40 g de fructosa. Los pacientes con fenilcetonuria y HFI forman parte del criterio de exclusión en los protocolos de BNCT basados en el uso de BPA-F (Laakso et al., 2003).

En cuanto a la acumulación selectiva del BPA en células tumorales, podría estar asociada al sistema de transporte de aminoácidos del tipo L (LAT: L Aminoacid Transport), en particular por LAT-1 y LAT-2. Los sistemas LAT-1 son una de las principales rutas a través de las cuales las células tumorales incorporan aminoácidos ramificados o aromáticos. En cambio, los sistemas LAT-2 están presentes en células normales, preferencialmente en el riñón, colon e intestino (Wongthai et al., 2015). Una característica notable de los sistemas L es su amplia selectividad de sustrato. Debido a esta propiedad, el sistema L se considera un transportador de fármacos que transporta no sólo aminoácidos naturales sino también fármacos relacionados con aminoácidos tales como L-dopa, melfalán, hormonas tiroideas y gabapentina (Kim et al., 2002). Los sistemas LAT-1 y LAT-2 son transportadores heterodiméricos, sodio-independientes localizados a nivel de la membrana plasmática en varios tejidos, que incluyen cerebro, placenta y tumores (del Amo et al., 2008). En general son intercambiadores de aminoácidos con estequiometría 1:1, es decir transfieren un aminoácido fuera de la célula y al mismo tiempo otro aminoácido es transportado dentro de la misma (del Amo et al., 2008).

El sistema LAT-1 transporta preferencialmente aminoácidos neutros grandes como leucina, isoleucina, valina, tirosina, triptófano, metionina, histidina y fenilalanina, con gran afinidad (del Amo et al., 2008). Por lo tanto, desde esta perspectiva, al ser el BPA un análogo de la fenilalanina, su transporte a las células estaría vinculado a los sistemas LAT-1. Además, el transportador LAT-1 ha sido asociado con el crecimiento, proliferación y desarrollo de los tejidos y se encuentra altamente expresado en tumores malignos y líneas celulares tumorales (Detta y Cruickshank, 2009). Por consiguiente, en base a lo mencionado anteriormente, la incorporación preferencial del BPA a las células tumorales se debería a una mayor necesidad o requerimiento de aminoácidos debido a su mayor actividad metabólica (Coderre y Morris, 1999).

Por otro lado, el hecho que los sistemas LAT-2 se expresan en las membranas de células normales (principalmente en las membranas basolaterales del intestino y riñón)(Wongthai et al., 2015) y el BPA se transporta mayoritariamente por el sistema LAT-1 (Wittig et al., 2000), contribuiría a la incorporación preferencial de BPA a tumor.

Respecto de su micro-localización, el BPA se distribuye uniformemente entre el núcleo y el citoplasma, según se determinó por microscopía iónica luego de exponer las células al BPA *in vitro* (Bennet et al., 1992; Bennet et al., 1994; Chandra et al., 1997) e *in vivo* en tejidos de ratas inyectadas con BPA (Smith et al., 1996; Smith et al., 1997). También podemos mencionar que, en estudios previos realizados de microdistribución de BPA mediante la técnica de autorradiografía neutrónica, en el modelo de la bolsa de la mejilla del hámster (Portu et al., 2015), se observó que la concentración de BPA en los tumores orales era mayor que en tejido normal. Además de ésta diferencia de concentración de B, se observó que dentro del tumor la distribución de ¹⁰B era heterogénea, de modo que existía mayor captación en el parénquima tumoral comparado con el estroma tumoral.

Actualmente, se encuentran en estudio, diferentes procedimientos orientados a potenciar la incorporación de BPA en las células malignas. Una estrategia es el pretratamiento de células con un análogo del BPA, tal como el L-DOPA (L-3,4- Dihidroxifenilalanina) (Fig.18I).

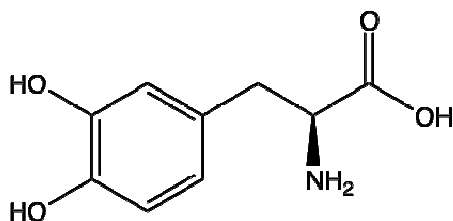


Fig. 18I. Estructura química de L-DOPA.

Como se mencionó anteriormente el L-DOPA es estructuralmente similar al BPA, y ambas moléculas pueden entrar a la célula a través de los transportadores de aminoácidos L (LAT). Por lo tanto, el pre-tratamiento con un aminoácido específico tal como L-DOPA puede mejorar la

acumulación subsiguiente de BPA a través del mecanismo de intercambio entre L-DOPA y BPA. Este mecanismo ha sido validado en estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando células de glioma C6. Por ejemplo, el grupo de Capuani (2008) demostró que la precarga con L-DOPA indujo un aumento masivo de la concentración de BPA en células C6 de glioma *in vitro*. *In vivo*, el pre-tratamiento con L-DOPA en gliomas en ratas condujo a un aumento significativo en la acumulación de BPA en tejido tumoral, 2,7 veces más que el grupo tratado sólo con BPA. En cambio, no ocurrió lo mismo en tejido normal ni en sangre (Capuani et al., 2009).

En cuanto a la “precarga” con L-tirosina, se demostró un aumento de la concentración de BPA en células de melanoma en ratón (Papaspyrou et al., 1994) así como también en gliomas en ratas (Wittig et al., 2000) y en células tumorales hepáticas y de colon (Iffland et al., 2011).

Otra estrategia utilizada para mejorar la acumulación de boro a nivel del sistema nervioso es la alteración de la BHE por medio de un agente hiperosmótico, tal como el manitol. Se demostró que las relaciones tumor/cerebro con la administración de BPA y manitol llegaron a valores de 7,5 (Barth y Soloway, 1997). Subsecuentemente, los estudios demostraron que la co-administración de BPA con manitol aumentó el tiempo de supervivencia promedio de las ratas portadoras de gliomas tratadas con BNCT (Barth et al., 2000, 2011). Sin embargo, la alteración de la BHE por la acción del manitol tiene efectos no específicos y puede tener limitaciones ya que esta técnica también puede favorecer la incorporación de boro en el tejido cerebral sano (Barth et al., 2011). Además de ésta estrategia, se ensayó otra alternativa enfocada a mejorar la captación de BPA por la BHE alrededor del tumor mediante la técnica de ultrasonido, la cual demostró que existe una mejora significativa de la relación de concentración de boro tumor/cerebro en tumores sonicados, lo cual favorecería la eficacia de BNCT (Yang et al., 2012).

2.3.2 BSH (Mercaptoundecahidro-closo-dodecaborato de sodio ó Borocaptato de sodio)

El mercaptoundecahidro-closo-dodecaborato de sodio, borocaptato de sodio o BSH ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) pertenece al grupo de compuestos químicos denominados ciclo carboranos (Fig. 19I). El BSH es un derivado de carborano aniónico, administrado bajo la forma de sal de sodio, que fue sintetizado por primera vez en el año 1964 por el Dr. Knoth W H. Su peso molecular es de 210,30 gr/mol (Knoth et al., 1964).

Una diferencia notable del BSH comparado con el otro compuesto borado utilizado habitualmente en los ensayos clínicos (BPA), es la cantidad de átomos de B por mol. El BSH contiene 12 átomos de boro por molécula, mientras que el BPA contiene sólo uno. Por lo tanto, se supone que dada una acumulación molar igual de BSH y BPA, el BSH habrá entregado una concentración 12 veces mayor de átomos de boro en comparación con BPA, facilitando así que se alcancen los niveles concentración de ^{10}B requeridos para que BNCT sea eficaz ($[^{10}\text{B}] \geq 20$ ppm).

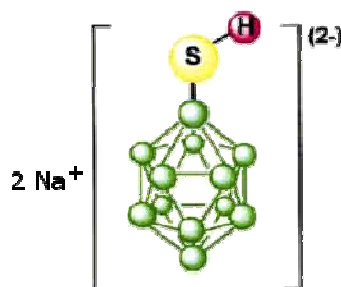


Fig. 19I Estructura química del BSH o borocaptato de sodio (<http://www.katchem.cz/>)

Debido a su naturaleza aniónica, se cree que el BSH se acumula preferentemente en los tumores cerebrales en comparación con el parénquima de cerebro normal, debido a que es un compuesto difusivo que no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) 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 BHE (Soloway et al., 1967).

Los primeros estudios de BNCT realizados en Japón por el Dr. Hatanaka en 1967 con BSH se asociaron al tratamiento de glioblastomas multiformes. Las dosis de BSH utilizadas en los pacientes fueron entre 50-140 mg BSH/Kg (30-80 mg ^{10}B /Kg) y en ellos observó que algunas veces los niveles de boro en el cerebro normal no llegaban a ser detectables (Soloway et al., 1967), pero los niveles de boro en tumor brindaban efectividad al tratamiento de ésta patología cuando se empleaba como portador de boro para BNCT (ej. Kageji et al., 2011). Luego de 12 hs de la administración del BSH se realizaron las irradiaciones y los resultados fueron interesantes. Excepto un paciente que recibió altas dosis de radiación, en los demás pacientes no se observó necrosis en cerebro normal debido al tratamiento con BNCT. Luego del tratamiento tres pacientes sobrevivieron más de 10 años, y hasta 1986 parecían haber sido curados (Hatanaka y Nakagawa, 1994).

Desde entonces, el BSH ha sido investigado ampliamente en ensayos *in vitro* e *in vivo* para diferentes líneas celulares y en distintos modelos de diversas patologías neoplásicas (ej. Petterson et al., 1992; Mehta et al., 1995; Ono et al., 1996; Yoshida et al., 2002; Chou et al., 2009; Lin et al., 2012). Además, en un ensayo comparativo realizado en ratones, ratas, conejos y seres humanos con BSH, se demostró que los parámetros farmacocinéticos obtenidos de los modelos experimentales pueden ser utilizados para generar aproximaciones farmacocinéticas en seres humanos (Metah y Lu, 1995).

Podemos mencionar que la biodistribución de BSH en diversos modelos de cáncer *in vivo* y en ensayos clínicos alcanzaron en general, relaciones de concentración de boro Tumor/Sangre de $0,9 \pm 0,4$ a $1,2 \pm 0,4$; de Tumor/Tejido Normal de $0,7 \pm 0,1$ a $3,6 \pm 0,6$; y valores de concentración de boro en tumores de 0,7 a 84,2 ppm (ej. Neumann et al., 2003; Wittig et al., 2008b; Chou et al., 2009), confirmando que no es un compuesto de alta selectividad en cuanto a su incorporación a tumor.

Con el objetivo de mejorar la incorporación selectiva a tumor del BSH se han ensayado una gran variedad de estrategias que incluyen a modo de ejemplo, formulaciones de liposomas con BSH en ratones (Mehta y Lu, 1996), inmunoliposomas con BSH para el tratamiento de cáncer pancreático (Yanagie et al., 1997), combinación de electroporación y BSH para carcinomas de células escamosas (SCC) en modelos murinos (Ono et al., 2000), administración de BSH con lipiodol en el modelo de cáncer hepático en ratas (Suzuki et al., 2004), combinación de BSH con sulfoximina butionina en el modelo de tumores subcutáneos en ratas (Yoshida et al., 2008), uso de gelatina cationizada y BSH para tumores de hígado en ratones (Fujii et al., 2011), entre otros. En la mayoría de estos estudios se consiguió incrementar significativamente las concentraciones de B en tumor. Sin embargo, a pesar de éstos resultados, la tarea de aumentar la incorporación selectiva a tumor del BSH continúa en desarrollo.

Debido a que se conoce que el tejido tumoral está compuesto de diversos tipos celulares, uno de los objetivos de BNCT, en cuanto a la captación de los compuestos borados, es alcanzar una acumulación selectiva de boro en el mayor número de células tumorales posibles, garantizando de esa manera un daño significativo a las células tumorales en comparación a las células normales, por parte de las partículas de alto LET (alfa y ^7Li) generadas de la reacción de captura entre el ^{10}B y los neutrones térmicos. En éste contexto, se han realizado ensayos *invitro*, *in vivo* y clínicos, combinando BSH + BPA. En estos trabajos, la hipótesis de trabajo fue que dado que ambos compuestos poseen mecanismos de incorporación distintos, la combinación de ambos favorecería una mayor acumulación de B en las diferentes poblaciones celulares de tumores heterogéneos (ej. Kato et al., 2004; Yokoyama et al., 2006; Wittig et al., 2009). Algunos de estos estudios arrojaron resultados significativos, tanto en el aumento de la concentración de boro en tumor, como así también en las relaciones de concentración de boro tumor/tejido normal, comparados con la administración de los compuestos BPA y BSH de manera separada.

Además de utilizarse para el tratamiento de glioblastoma multiforme, se intentó ampliar su uso en la clínica a tumores de cabeza y cuello, combinado con la administración de BPA (Kato et al., 2004). A su vez, se realizaron diversos experimentos *in vivo* e *in vitro* para estudiar su potencial utilización en otros tipos de tumores como melanoma (Carpano et al., 2015); mejorar su selectividad para el tratamiento con BNCT del carcinoma hepatocelular (Yanagie et al., 2011), tumores múltiples en hígado (Fujii et al., 2011), y células de glioma (Feng et al., 2009).

Con respecto a su microdistribución, mediante ensayos de inmunohistoquímica, se demostró que el BSH estaba localizado preferencialmente cerca de las membranas celulares, membranas nucleares, dentro del núcleo y en los espacios intracelulares de células de gliomas de pacientes (Neumann et al., 2002, 2003). Además, se demostró en un estudio realizado en la mucosa oral de lengua en ratas Fisher, mediante la técnica de microscopía iónica, que el BSH se acumulaba selectivamente en la lámina propia de la mucosa oral en comparación con el epitelio y el músculo, cuyos valores eran similares (Morris et al., 2000).

El BSH es un compuesto relativamente tóxico y debido a su naturaleza iónica es muy soluble en agua. Sin embargo, el intercambio del catión sódico con algún catión orgánico, como el

tetrametilamonio o tetrabutilamonio, hace que este compuesto sea soluble en disolventes orgánicos menos polares. El grupo sulfhidrilo (SH) del BSH tiene un pK_a de 13,4. Esto podría explicar por qué el BSH se comporta como un ácido débil. En presencia de una base, el BSH puede formar derivados con carga positiva acumulada sobre el átomo de azufre ($B_{12}H_{11}S^{-1}$) y esto hace que el BSH y su ion muestren habilidades nucleofílicas. El BSH reacciona fácilmente con haluros de alquilo y cloruros de ácido (Gabel, 1993) que permiten unirlo a muchos otros sistemas orgánicos y además vincularlo a un gran número de agentes químicos, aumentando así sus capacidades de localización tumorales.

El BSH en condiciones ácidas y en presencia de oxígeno puede formar el dímero disulfuro ó BSSB (color azul), que luego puede ser oxidado en presencia de oxígeno atmosférico, formando el disulfuro oxidado BS(O)SB (incoloro) (Fig. 20I). Para evitar esta reacción no deseada, es necesario llevar a cabo la síntesis y posterior preparación de su solución en ausencia de oxígeno y a pH ácido (Ratajski and Wielkopolska, 2005).

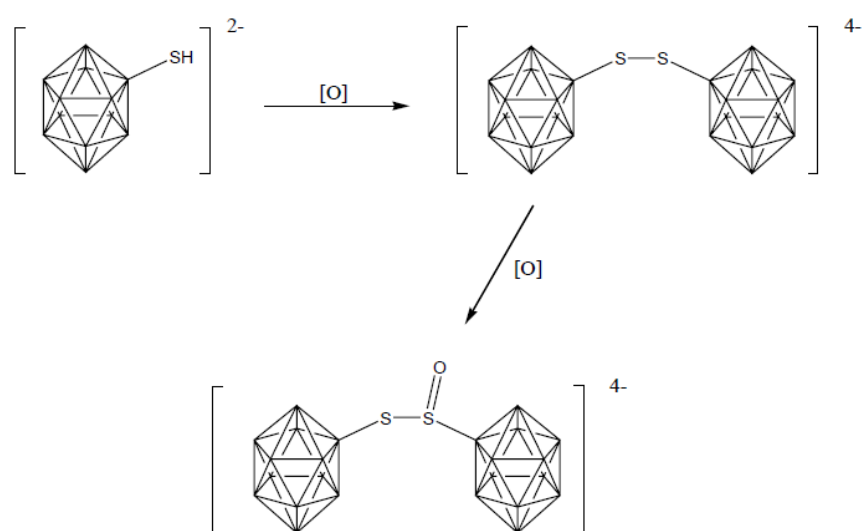


Fig. 20I Formación de los dímeros de BSH – BSSB y BS(O)SB en condiciones ácidas y en presencia de oxígeno atmosférico (Ratajski and Wielkopolska, 2005)

A diferencia del BPA que utiliza un tipo de transporte activo para ingresar a las células (Sistemas LAT), el BSH es un compuesto que emplea el mecanismo difusión simple (transporte pasivo) para acumularse en las células (Kawabata et al., 2009). También se ha propuesto que la acumulación de aniones boranos, como el BSH, dentro de las células podría ser atribuido a la posible interacción con fosfatidilcolina de las membranas celulares (Kageji et al., 1998) o por formación de enlaces nucleofílicos con proteínas de la sangre, como la seroalbúmina (McVey et al., 2008). En particular, se ha demostrado que el BSH se une a la albúmina de la sangre a través de uniones iónicas, a diferencia del dímero BSSB que lo hace con uniones fuertes del tipo puente

disulfuro (S-S), lo cual explicaría la mayor retención de éste compuesto en sangre (Tang et al., 1995).

A pesar de que los dímeros BSSB y sus formas oxidadas presentan hasta el doble de captación de boro en las células tumorales vs el monómero BSH (ej. Slatkin et al., 1986; Joel et al., 1989, Elhanati et al., 2001) varios trabajos han reportado acerca de su toxicidad, lo cual es un factor limitante cuando es utilizado como portador de B en ensayos para BNCT. Slatkin y colaboradores, estudiando la distribución de BSH en un modelo de melanoma en ratones observaron mediante la técnica de TLC (Thin Layer Chromatography: Cromatografía en Capa Delgada) la presencia del dímero BSSB en la solución de BSH luego que la misma había sido administrada por infusión lenta. En el año 1986, los mismos autores realizaron estudios de biodistribución y toxicidad con soluciones del monómero BSH y del dímero BSSB, administradas por infusión intraperitoneal durante 9 días ó en bolo en una sola aplicación, con concentraciones de ^{10}B entre 147-240 $\text{mg}^{10}\text{B}/\text{Kg}$. En éstos estudios observaron que el dímero había producido concentraciones de boro más altas en los melanomas de ratón y mayor relación de concentración de boro tumor/sangre que el monómero BSH, cuando ambas soluciones habían sido infundidas intraperitonealmente durante 8-9 días. Además fueron analizados los plasmas provenientes de las sangres de las ratas.,Se observó que luego de la infusión lenta con el dímero de BSSB, la mayor parte del boro estaba ligado a proteínas del plasma, en particular albúmina y betaglobulinas. También sugirieron que el dímero podría llegar a causar hepatotoxicidad, debido a que la captación del mismo en el hígado era alrededor de 5 veces mayor que en los demás tejidos (Slatkin et al., 1986).

Luego en el año 1989, Marshall y colaboradores, estudiaron en ratones albinos la toxicidad de soluciones de BSH y BSSB mediante infusión intraperitoneal durante 14 días. Ellos observaron una severa disminución del peso corporal ($\cong 12\%$) de los ratones inyectados con la solución de BSSB, 3 días después de haber comenzado la infusión, pero a los 14 días post-infusión, al finalizar los experimentos, el peso corporal de los animales se había recuperado en un 99%, relativo al peso corporal inicial. Al repetir el mismo ensayo con tiempos de seguimiento post-infusión más prolongados (77 días post-infusión), observaron que la disminución de peso ocurría antes de los 16 días de haber comenzado la infusión con la solución de BSSB y que a partir del día 22 hasta el final del experimento, los pesos de los animales fueron incrementándose paulatinamente hasta alcanzar valores superiores al peso inicial, aproximadamente un 39%. Por lo tanto, concluyeron que la variación de peso corporal luego de la administración de BSSB era transitoria. Además, notaron que no hubo modificación de la fórmula leucocitaria ni de las concentraciones de hemoglobina en la sangre, tanto con BSH como con BSSB. De manera contraria, apreciaron una diferencia en la tasa de regeneración hepática cinco días después de haber finalizado la infusión en los ratones tratados con el dímero. Estos resultados fueron confirmados a través de los niveles de ALT (alanina aminotransferasa) medidos en plasma, que indicaron mayor daño hepatocelular en los animales infundidos con BSSB (Marshall et al., 1989).

En estudios realizados en conejos en el año 1993 (Janku et al., 1993) en Checoslovaquia con BSH, se demostró la potencial nefrotoxicidad del compuesto. Se realizaron durante siete días,

dos inyecciones diarias de dos concentraciones distintas de BSH (25 ó 50 mg/Kg) en bolo. Luego de 17 hs de haber finalizado la última administración del compuesto borado, se realizaron estudios bioquímicos de sangre y luego los animales fueron sacrificados para obtener muestras de diferentes tejidos para ser analizadas histológicamente. Durante los días de infusión se observó un aumento de la salivación y mayor relajación muscular, poco después de la administración con BSH 50 mg/Kg, pero éstos síntomas desaparecían a los pocos minutos luego de la inyección. Con respecto a la variación de peso corporal, se observó que para ambas dosis de BSH existía una disminución del mismo comparado con el grupo control, pero ésta era más evidente con la dosis de 50 mg BSH/Kg, provocando una disminución de los valores de peso corporal de hasta 14%. En cuanto a los resultados de los análisis bioquímicos, no se advirtieron cambios en los niveles de ALT, bilirrubina, glucosa, colesterol y creatinina 7 días después de la administración con ambas dosis de BSH ensayadas. En cambio, en los valores de úrea sérica se notaron aumentos entre los niveles pre y post-tratamiento, para las dos dosis de BSH, que alcanzaron valores de 29% y 164%, para la dosis de 25 y 50 mg BSH/Kg, respectivamente. Con respecto al hemograma, se observó que hubo una disminución de los glóbulos rojos para los dos tratamientos y un incremento de los glóbulos blancos, sólo para el caso de menor dosis de BSH. Los estudios histopatológicos revelaron cambios sólo en riñón y cerebro, para ambas dosis de BSH. También, en éste estudio se reportaron tres casos de mortalidad: dos de ellos con la dosis de 25 mg/Kg y uno con la dosis 50 mg/Kg, todos 5 días después de haber comenzado los ensayos. Los resultados de toxicidad a corto plazo en conejos demostraron que el borocaptato de sodio no puede ser considerado un agente completamente desprovisto de actividad en el tejido sano y que podría ser considerado nefrotóxico. Como consecuencia de la nefrotoxicidad, éste compuesto podría inducir una anemia aplásica, advirtiendo un posible riesgo en el tratamiento con BNCT mediado por BSH de pacientes con gliomas. Además, estos cambios en la función renal estarían vinculados a deficiencias en la función del sistema cardiovascular, según lo describió La Hann y colaboradores en sus estudios acerca de la toxicidad cardiovascular asociada a la administración de BSH, el cual provocaría hipertensión arterial (LaHann et al., 1996).

2.3.3 GB-10 (Decahidrodecaborato de sodio)

El GB-10 (decahidrodecaborato de sodio, $\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) (Fig. 21I) es un di-anión borado poliédrico estable que contiene 10 átomos de boro por molécula, siendo su peso molecular igual a 156,19 gr/mol.

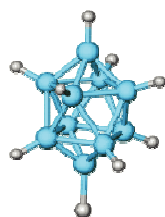


Fig. 21I Estructura química del GB-10 o decahidro decaborato de sodio (<http://www.katchem.cz/>)

El GB-10 fue sintetizado por primera vez en 1959 por Hawthorne y análogamente al BSH, fue propuesto para el tratamiento de tumores de cerebro ya que no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) intacta.

Fue utilizado en el segundo grupo de ensayos clínicos de BNCT para el tratamiento de gliomas en 1961 (Luderer et al., 2015). En éste caso, una solución de GB-10 a una dosis de 30 mg/Kg (19 mg¹⁰B/Kg) fue administrada a dos pacientes vía intracarótida. Luego fueron irradiados, previa realización de craneotomía, en el reactor MIT del Massachusetts General Hospital. Una vez más, los resultados de los estudios no fueron exitosos. Las autopsias de los pacientes revelaron presencia de necrosis con lesiones cardiovasculares de diferentes tipos en el tejido cerebral. Estos resultados fueron atribuidos a la presencia de altos niveles de boro durante la irradiación y concluyeron además que la eliminación del compuesto de la sangre, antes de la irradiación, era esencial.

En 1967 Soloway encontró que la DL50 (Dosis letal 50) para GB-10 en ratones es de 1025 mg/Kg. Posteriormente, en el año 1972, Asbury y colaboradores, reportaron los resultados de toxicidad encontrados en el estudio de BNCT/GB-10 de 1961. Ellos observaron, en el tejido cerebral de uno de los pacientes, la presencia de necrosis extensa por radiación, mientras que en el otro notaron tumores recurrentes. A nivel de vasos sanguíneos, informaron que habían ocurrido cambios distintivos en los mismos, y que a tiempos tempranos después de la radiación, había presencia de lesiones agudas por necrosis en vasos sanguíneos de distinto calibre. Estos resultados fueron vinculados a la relación de concentración de boro entre el tumor y la sangre, cuyo valor fue de 0,79. Se propuso que la concentración de boro en las paredes endoteliales de las células podría contribuir a dosis peligrosas de radiación cuando se irradia con neutrones (Asbury et al., 1972). De igual manera, se podría señalar que los resultados poco satisfactorios obtenidos en éstos estudios de BNCT mediados por GB-10, podrían deberse al poco conocimiento sobre la biodistribución del compuesto que existía en ese entonces, entre otros factores.

Luego, se demostró que el compuesto GB-10 no era tóxico en estudios de biodistribución en 15 pacientes voluntarios con glioblastoma multiforme y cáncer de células no pequeñas de pulmón, realizados en la Universidad de Washington (Diaz et al., 2002). En éstos estudios se realizaron infusiones con soluciones de GB-10 a una dosis de 51 mg¹⁰B/Kg durante 10-20 minutos, seguidas de infusiones continuas en las siguientes dos horas, con el objetivo de mantener durante irradiaciones futuras, altas relaciones de concentración de boro en sangre vs tumor. Los resultados determinaron que el tiempo promedio de vida media del compuesto fue de $5,5 \pm 1,2$ hs, con un promedio de excreción de los metabolitos en orina del 86%.

En base a los estudios realizados, los cuales no mostraron toxicidad aparente, el GB-10 fue aprobado para su uso en estudios de biodistribución por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), bajo IND # 56565 (IND, Investigational New Drug).

Si bien el GB-10 fue uno de los primeros compuestos borados ensayados en estudios clínicos, debido a los resultados obtenidos, su uso fue dejado de lado y se continuó la tarea de experimentar con otros compuestos desarrollados para BNCT. Pero en los últimos quince años, se

ha reanudado la investigación de GB-10 en modelos animales. Se utilizó por primera vez en estudios *in vivo* en perros con cáncer de células no pequeñas de pulmón, tratados con BNCT/FNT (BNCT enhanced Fast Neutron Therapy ó terapia por neutrones rápidos potenciada por BNCT). La concentración media de boro en sangre, luego de 1 h de infusión con GB-10 a una dosis de 25 mg/Kg (16 mg¹⁰B/Kg) en los tres perros fue de 177 ± 35 ppm. En este trabajo se consideró que en el tumor la concentración de boro era similar a la de la sangre. Luego de realizadas las irradiaciones, se obtuvieron resultados alentadores en términos terapéuticos, sin toxicidad originada por el compuesto en sí (Stelzer et al., 2001).

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo realizó diversos estudios de toxicidad y biodistribución con GB-10 y demostró ausencia de toxicidad y su potencial terapéutico empleado en BNCT en tumores de la mucosa oral en hámsters, un tejido no protegido por la BHE (ej. Heber et al. 2004, 2006; Trivillin et al., 2004, 2006). En cuanto a su biodistribución, demostramos que se acumula de forma homogénea en diferentes áreas del tumor. Esto sería una ventaja en cuanto a la posibilidad de evitar focos refractarios a la terapia. Sin embargo, no se verificó la incorporación selectiva a tumor versus tejido normal y sangre. Estos hallazgos estarían correlacionados con su propiedad difusiva (Heber et al., 2004).

También con el objetivo de aumentar la incorporación selectiva del GB-10 a las células tumorales, Masunaga y colaboradores (2006) realizaron estudios de biodistribución *in vivo* e *in vitro* utilizando liposomas con GB-10. Ellos concluyeron que, en términos de características de biodistribución y efecto de destrucción de células tumorales en BNCT, los liposomas portadores de GB-10 podrían ser considerados como promisorios vehículos de ¹⁰B para BNCT (Masunaga et al., 2006).

Respecto de su micro-localización, en base a estudios previos realizados mediante la técnica de autorradiografía neutrónica en el modelo de la bolsa de la mejilla del hámster se pudo observar que la incorporación del GB-10 en los tumores orales era menor en comparación a los tumores infundidos con BPA (Portu et al., 2015). También se observó que la distribución cualitativa de trazas en el tejido tumoral post-administración de GB-10 era muy similar al tejido normal. Además, dentro del tumor la distribución de ¹⁰B era heterogénea (aunque en menor grado que el BPA), de modo que existía mayor captación en el estroma tumoral comparado con el parénquima tumoral.

Con respecto al éxito terapéutico, nuestros resultados de BNCT mediado por GB-10 en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster proponen un nuevo paradigma para BNCT. A pesar de no observarse incorporación selectiva de GB-10 en tejido tumoral, BNCT resultó terapéuticamente efectivo, causando daño a tumor y preservando el tejido normal. Demostramos, a nivel histológico, que el control tumoral selectivo por BNCT mediado por GB-10 se debería al daño selectivo en los vasos sanguíneos tumorales aberrantes, versus los vasos en tejido normal. Esta mayor radiosensibilidad de los vasos tumorales podría deberse a su estructura y función anormal (Trivillin et al., 2006).

2.3.4 Liposomas MAC y MAC+TAC

Los liposomas MAC y los liposomas MAC+TAC fueron sintetizados por el grupo de investigación del International Institute of Nano and Molecular Medicine (I²NM²), de la Universidad de Missouri, Columbia, EE.UU., liderado por el Dr. F. Hawthorne.

En el año 1994 el grupo Hawthorne sintetizó un compuesto borano poliédrico soluble en agua, a partir de boro no enriquecido al que denominaron TAC ($\text{Na}_3 [\text{ae-B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3]$) (Fig. 13I). El compuesto TAC es una sal sódica de un ión hidrofílico que posee 20 átomos de boro por mol. El mismo fue encapsulado en liposomas unilamelares, compuestos de diestearoilfosfatidilcolina /colesterol (1:1), con el objetivo de analizar su potencialidad como agente portador de boro para la terapia BNCT (Feakes et al., 1994). Los ensayos de biodistribución realizados en un modelo de adenocarcinoma mamario en ratones BALB/c, presentaron una buena captación y selectividad tumoral con bajas dosis de administración, logrando concentraciones de B en tumor entre 30-40 ppm y relaciones de concentración de boro tumor/sangre de aproximadamente 5. Los autores atribuyeron la mejora en la captación de boro, a la oxidación intracelular del compuesto TAC, generando el ión $[\text{n-B}_{20}\text{H}_{18}]^{-2}\text{NH}_3$ sustituido, altamente susceptible al ataque nucleofílico de los grupos amino (NH_2) de las proteínas intracelulares. En otro experimento, el compuesto TAC fue encapsulado en la membrana de liposomas preparados con 5% PEG (Polietilenglicol) y di-estearoil fosfatidilcolina, debido a que la presencia de PEG genera estabilización de los liposomas. Como era de esperar, en los ensayos de biodistribución *in vivo*, estos nuevos liposomas exhibieron un mayor tiempo de circulación sanguínea resultando en una acumulación continua de boro en tumor durante 48 horas y alcanzando valores máximos de boro en tumor de 47 ppm (Feakes et al., 1994).

Al año siguiente, en 1995, sintetizaron el compuesto borado MAC ($\text{K} [\text{nido-7-CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{-7,8-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]$) a partir de boro no enriquecido (Fig. 13I). El compuesto MAC es una sal aniónica anfifílica de un nido carborano sustituido por un grupo alquilo, con 9 átomos de boro por mol. El mismo fue encapsulado dentro de la membrana de liposomas unilamelares compuestos de di-estearoilfosfatidilcolina/colesterol (1:1) con el objetivo de aumentar el contenido de boro aproximadamente en 2-5% versus los liposomas TAC. Los ensayos de biodistribución realizados en el modelo de adenocarcinoma mamario en ratones BALB/c, con inyecciones de 5-10 mg B/Kg, arrojaron concentraciones máximas de boro en tumor de 35 ppm y relaciones de concentración de boro tumor/sangre de alrededor de 8. Además, intentando aumentar la entrega de boro y debido a que los liposomas compuestos de bicapas permiten encapsular en su interior soluciones concentradas acuosas de compuestos borados hidrofílicos, Hawthorne y colaboradores incorporaron dentro de los liposomas MAC, el compuesto borado previamente sintetizado TAC, generando así el liposoma MAC+TAC (Fig. 22I). Con ésta nueva formulación de liposomas realizaron estudios de biodistribución en el mismo modelo de ratones utilizado previamente, logrando valores de concentración de boro en tumor de aproximadamente 50 ppm y relaciones de concentración de boro tumor/sangre de 6 (Feakes et al., 1995).

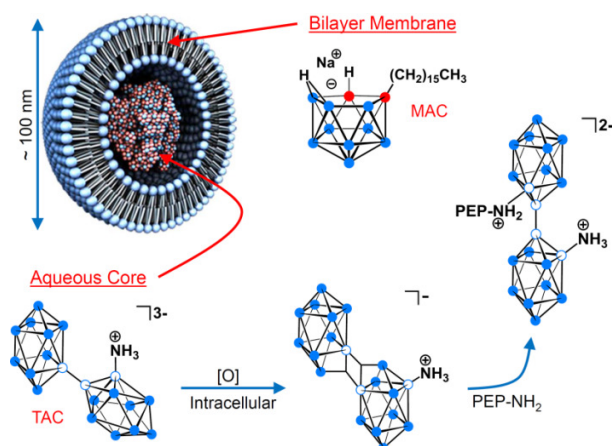


Fig. 22 Diagrama representativo de la composición de los liposomas MAC y liposomas MAC+TAC y su posible mecanismo de incorporación de boro a la célula (tomado de Hawthorne y Shelly, 1997).

Con el objetivo de extender la posible eficacia terapéutica de BNCT a otras patologías diferentes a las neoplásicas, en 1998 el grupo de Hawthorne realizó estudios de biodistribución con los liposomas MAC+TAC en un modelo de artritis reumatoidea inducida por colágeno en ratas Louvain. La concentración tisular de boro se determinó mediante la técnica de ICP-OES después de la administración intravenosa de liposomas MAC+TAC con bajas dosis de boro (13-18 mg B/Kg). La concentración máxima de boro observada en el tejido sinovial artrítico fue 29 ppm y la mayor relación de concentración de boro entre la sinovial artrítica y la normal fue de 3. En un intento por aumentar la selectividad en la incorporación a la membrana sinovial patológica y disminuir la concentración sanguínea de boro, se modificó la ubicación del compuesto TAC, creando un liposoma nuevo MAC+TAC, donde ambos compuestos se encontraban incorporados dentro de la membrana vesicular. Los resultados con ésta nueva formulación mostraron una eliminación de boro en sangre más rápida, pero también una menor acumulación de boro en la membrana sinovial (Watson Clark et al., 1998).

Finalmente, en el año 2013, se realizaron los primeros ensayos de biodistribución y eficacia terapéutica de BNCT con liposomas MAC+TAC, enriquecidos en ^{10}B , en el modelo de adenocarcinoma mamario en ratones BALB/c (Kueffer et al., 2013). En los estudios de biodistribución se ensayaron dos protocolos utilizando dosis de suspensión MAC+TAC equivalentes a $17 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{Kg}$, administradas en la vena de la cola de los ratones, en una sola dosis o en dos dosis, con un intervalo de 24 hs entre sí. Los resultados de concentración de boro con la única administración de liposomas medidos entre 18 y 50 hs post administración, demostraron que se alcanzaban valores de concentración de B en tumor de $\cong 28 \text{ ppm}$, entre las 18 y 30 h. Sin embargo, la mayor relación de concentración de boro tumor/sangre (2,76: 1) no se alcanzó hasta 48 h después de la administración, cuando la concentración de ^{10}B en el tumor era de sólo 18 ppm. Con el protocolo de inyección doble, se obtuvieron mayores concentraciones máximas de boro en

todos los tejidos en comparación con una sola dosis, debido a la eliminación más lenta de los liposomas con este protocolo de administración. Esta eliminación tardía del boro causó que los niveles de boro en tumor alcanzaran un valor máximo 54 h después de la primera inyección. Las concentraciones de boro en el hígado y en el bazo también alcanzaron su punto máximo a las 54 h. Por el contrario, los niveles de boro en sangre estaban disminuidos a las 48 h. A las 54 h, la concentración de boro en los tumores fue de 68 ppm y la relación de concentración de boro tumor/sangre fue de 1,9. Debido a que la eliminación de boro en sangre ocurrió más rápidamente que la pérdida de boro en los tumores, la relación tumor/sangre continuó aumentando después de las 54 h post primera administración, de tal forma que a las 72 y 96 hs, las relaciones fueron de 2,8 y 5,7, respectivamente. Por otro lado, las concentraciones de boro en tumor a las 72 y 96 h fueron de 57 y 43 ppm, respectivamente.

Para los estudios de BNCT con liposomas MAC+TAC, se irradiaron ratones portadores de tumores, 54 h después de la administración de una única dosis del compuesto, en el Reactor de Investigación de la Universidad de Missouri, USA. Asumiendo una concentración de ^{10}B en tumor de 60 ppm se administró una dosis absorbida de boro de 7,75 Gy. Se observó a los 14 días post irradiación una supresión significativa del crecimiento tumoral en ratones tratados con BNCT/MAC+TAC versus el control de animales no tratados (424% de aumento en el volumen tumoral vs 1551% en controles no tratados). En el protocolo de doble dosis de administración de la suspensión MAC+TAC, 14 días después de la irradiación se observó una disminución del crecimiento tumoral (aumento del volumen tumoral del 186% vs 1551%). Si bien estos resultados distan mucho de un éxito terapéutico indican algún grado de respuesta tumoral inducido por BNCT mediado por liposomas MAC-TAC, sin toxicidad en tejido normal.

Estos resultados sugieren que las nanopartículas, como los liposomas MAC+TAC, pueden ofrecer una alternativa para BNCT como portadores de boro.

2.4. Técnicas analíticas para la medición de boro y sus isótopos

2.4.1 Técnicas y principios de funcionamiento

Un número de técnicas analíticas, que van desde un sencillo método potenciométrico a un método que requiere un reactor nuclear se han utilizado para la determinación de Boro (B). La evolución de la metodología para la valoración de B en diferentes muestras ha seguido el curso del avance en la tecnología analítica instrumental (Sah y Brown, 1997).

La mayoría de los métodos anteriores utilizaban espectrofotometría, lo cual implicaba la utilización de reacciones de formación de color y, en forma limitada, reacciones fluorimétricas. La invención de la espectrometría de emisión atómica (AES) y de absorción atómica (AAS) inició la era atómica de los métodos de espectrometría de determinación B. Sin embargo, la sensibilidad y la precisión de la determinación de estos métodos estaban condicionadas por los efectos memoria y por las interferencias (Sah y Brown, 1997).

La introducción del plasma como fuente de ionización y el desarrollo de la espectrometría de emisión óptica por acoplamiento inductivo (ICP-OES) resultó en una mejora significativa en la tecnología para la determinación de B. Los ICP-OES proveen mayor sensibilidad y capacidad de detección para determinaciones de B de baja concentración, que las cuantificaciones por métodos espectrofotométricos.

Los niveles de detección y, aún más de precisión, mejoraron como resultado del acoplamiento de un espectrómetro de cuadrupolo de masas en un detector con plasma para formar un nuevo instrumento, llamado Espectrómetro de Masas con fuente de Plasma Inductivo (ICP-MS), el cual tiene la ventaja de poder determinar y cuantificar la abundancia de los isótopos de B (Sah y Brown, 1997).

Las técnicas para la detección y cuantificación de boro y sus isótopos estables que se utilizan actualmente se resumen en la Tabla 4I.

Técnicas		Principio de funcionamiento
Basadas en Plasma	ICP-OES (Espectrometría de Emisión Óptica por Acoplamiento Inductivo)	La ionización de boro a iones B^+ excitados producen determinadas emisiones de longitudes de onda, a partir de las cuales se determina la presencia de Boro, independientemente de la isotopía (isótopo ^{10}B y isótopo ^{11}B)
	ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Inductivo)	Luego de la ionización de boro a iones B^+ excitados, se puede medir la abundancia isotópica (^{10}B ó ^{11}B) en función de la relación masa/carga (m/z)
Espectrometría de masa por ionización térmica (TIMS: Thermal Ionization Mass Spectrometry)	PTIMS (Espectrometría de masa por ionización térmica positiva)	Se produce la conversión de B a cationes alcalinos ($Na_2BO_2^+$ ó $Cs_2BO_2^+$) ó metálicos y luego se mide la abundancia isotópica (^{10}B ó ^{11}B) en función de la relación masa/carga (m/z)
	NTIMS (Espectrometría de masa por ionización térmica negativa)	Se produce la conversión de B a aniones metaboratos (BO_2^-) y luego se mide la abundancia isotópica (^{10}B ó ^{11}B) en función de la relación masa/carga (m/z)
No basadas en Plasma	Espectrofotometría	Se adicionan reactivos específicos para boro, que desarrollan un determinado color y a continuación se miden las absorbancias a las longitudes de onda correspondientes
	Nuclear	Se bombardea la muestra con neutrones, produciendo partículas α y partículas γ , midiendo luego la abundancia isotópica del ^{10}B

Tabla 4I. Principios de funcionamiento de técnicas analíticas actuales para la medición de boro y sus isótopos.

Nosotros describiremos sólo las técnicas utilizadas en ésta tesis, que incluyen las basadas en plasma (ICP-OES, ICP-MS) y no basadas en plasma (Nucleares: Autorradiografía neutrónica).

2.4.1.1 Técnicas basadas en plasmas

El plasma es un estado de la materia similar al gas. Se describe como una mezcla gaseosa eléctricamente conductiva formada por cationes, aniones y electrones de carga neta cero (Farhat et al., 2013). El argón es el gas que se utiliza con mayor frecuencia para generar el plasma, pero también se han utilizado otros gases o sus mezclas (Evans y Giglio, 1993). La mayoría de los instrumentos comerciales de fuente de plasma utilizan argón para la ionización del analito. Sin embargo, existen otros tipos de plasma, tal como plasma de corriente continua (DCP) (Brennan y Svehla, 1989; Urasa, 1984), plasma de microondas inducido (MIP) (Evans y Caruso, 1993) y plasma de descarga (PIB) (Sheppard y Caruso, 1994). Un ICP trabaja a altas temperaturas (8.000-10.000K), y es una excelente fuente de ionización para las técnicas de espectrometría de emisión óptica (ICP-OES) como así también para la técnica de masa (ICP-MS) (Sah y Brown, 1997).

La técnica de plasma acoplado inductivamente (ICP) es la más utilizada para el análisis de boro. El ICP es un tipo de fuente de plasma formado a partir de corrientes eléctricas originadas por la inducción electromagnética en un gas rarificado, como el argón (Farhat et al., 2013). En un ICP-OES, las muestras se preparan para obtener un líquido que se introduce en el plasma del instrumento a través de un nebulizador y una cámara de nebulización (Fig. 23I). El nebulizador es el responsable de la aerosolización de la muestra en finas gotas. Puede ocurrir que aparezcan gotas grandes de muestra que no pueden disociarse por la descarga de plasma y para ello existe una cámara de nebulización que sólo permite la entrada de pequeñas gotas en la antorcha del plasma (Farhat et al., 2013). La muestra, en forma de aerosol, es entonces transportada por el argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radiofrecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas, la muestra es desolvatada (remoción del solvente o del aerosol que contiene la muestra, generando así partículas microscópicas de sales), vaporizada (descomposición de las partículas de sal en un gas de moléculas individuales), atomizada (disociación en átomos individuales) y/o ionizada por el plasma, generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características.

Este tipo de espectroscopia de emisión detecta la radiación electromagnética emitida de átomos excitados e iones producidos por la fuente de plasma, donde la longitud de onda de la radiación emitida es característica de un elemento. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por un sistema informático adecuado (Adaptado de <http://www.eaglabs.com/mc/inductively-coupled-plasma-spectroscopy.html> y <http://laboratorioteccnicasinstrumentales.es/analisis-gumicos/espectroscopia-de-plasma-icp-oes>).

La muestra es analizada en forma cuali o cuantitativa. Para el análisis cualitativo, es necesario detectar las longitudes de onda características del elemento y, en general, deben leerse

al menos tres líneas espectrales para garantizar que la emisión observada no esté interferida por la emisión de otros elementos presentes en la muestra. Para realizar el análisis cuantitativo, es necesario realizar una curva de calibración, relacionando la intensidad de la emisión de luz de las líneas espectrales con la concentración del elemento, que es una función lineal creciente. Para dicha curva se utilizan soluciones estándar de concentraciones conocidas y se mide la intensidad de emisión característica de la señal para el elemento en cuestión. Para determinar cuantitativamente la concentración de uno o varios elementos de una muestra incógnita, las intensidades encontradas se comparan con las intensidades del o los elementos de la curva de calibración (Adaptado de <http://www.eaglabs.com/mc/inductively-coupled-plasma-spectroscopy.html>). En general para las mediciones de [B] en muestras de agua mediante la técnica de ICP-OES se utilizan las longitudes de onda (ó líneas espectrales de medición) de 182.52 nm, 249.678 nm y 249.773 nm y el límite de detección varía entre 0,005 a 0,01 mg/L (Kmiecik et al., 2016).

En el método de ICP, la muestra digerida que contiene boro es atomizada, produciéndose así la conversión de los compuestos borados y otros boratos en boro elemental (B), e ionizada en B⁺. Finalmente, se analiza a través de diferentes tipos de detectores. La utilización de ésta técnica como método estándar para la medición de boro fue publicada en 1996, como método ISO 11885: 1996 (Farhat et al., 2013).

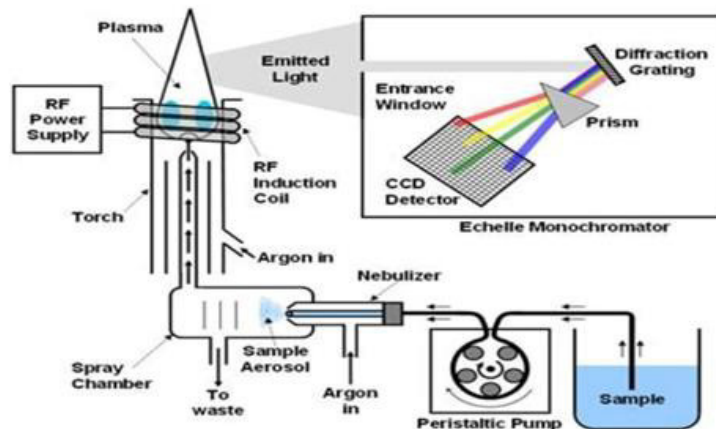


Fig. 23I Esquema representativo del funcionamiento del ICP-OES. Cuando la energía del plasma incide sobre la muestra a analizar, se excitan los elementos componentes de la misma (átomos). Luego, los átomos excitados vuelven a un nivel de baja energía y se emiten rayos espectrales que corresponden a una dada longitud de onda del fotón generado. El tipo de elemento se determina en función de la posición de los rayos espectrales y el contenido de cada elemento se determina en función de la intensidad de los rayos (<http://www.rohs-cmet.in/content/icp-oes>).

El acoplamiento al ICP de un detector espectral de masas (MS), introducido por D.C. Gregory en 1987, denominado Espectrómetro de Masas con fuente de Plasma Inductivo (ICP-MS), revolucionó la determinación de boro, ya que con el mismo se puede medir en forma simultánea la concentración de boro y la abundancia isotópica de una muestra (¹⁰B ó ¹¹B), lo cual conduce a límites de detección más bajos y mayor sensibilidad (Fig. 24I). En lugar de evaluar las emisiones de

las longitudes de onda específica de los iones excitados, como en el caso del ICP-OES, el método de ICP-MS mide los iones excitados en función de la relación masa/carga (m/z). De ésta manera se mide concentración y abundancia isotópica (Farhat et al., 2013). El ICP-MS posee al menos un cuadrupolo electromagnético (también puede ser hexapolo u octupolo) que comúnmente actúa como un filtro de masas y permite que sólo una determinada relación de masa/carga pase al detector. Los iones que pasan a través de éste cuadrupolo son desviados a un detector de iones que convierte la energía iónica de los mismos en energía eléctrica, constituyendo así la base para la medición de la concentración del analito.

Las ventajas de ICP-MS sobre otros métodos se basan en la alta sensibilidad, medición de concentraciones de los isótopos de B (^{11}B , ^{10}B) y límites de detección más bajos (10^{-6} mg/l), comparada con otras técnicas analíticas convencionales, por ejemplo espectrometría atómica o de emisión, fluorescencia de rayos x, etc. (Kmiecik et al., 2016).

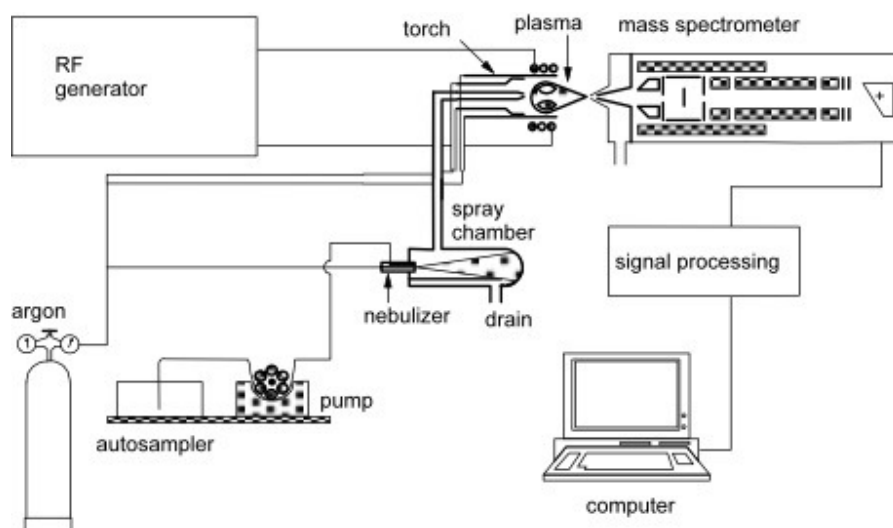


Fig. 24I Esquema representativo del funcionamiento del ICP-MS (<http://www.chromedia.org>)

A pesar de todas las ventajas mencionadas de ésta técnica de medición de boro, las principales desventajas de los métodos basados en plasma son: interferencias físicas, interferencias espectrales, interferencias de masa, efecto memoria, efecto matriz y contaminación externa de las muestras (Kmiecik et al., 2016).

Las interferencias físicas están asociadas a procesos físicos que intervienen en el transporte de la muestra al plasma, proceso de conversión y en el caso del ICP-MS, además pueden ocurrir interferencias en la transmisión de iones de la interfase del plasma al espectrómetro de masas. Las interferencias físicas pueden ocurrir en la transferencia de la muestra al nebulizador (viscosidad, presencia de partículas), en la formación del aerosol y transporte al plasma (tensión superficial) y durante el proceso de atomización e ionización en el plasma. Generalmente, las muestras con abundante carga orgánica (ej. biológicas) que van a ser

medidas mediante la técnica de ICP son transformadas a estado líquido, mediante diferentes técnicas de digestión (microondas, baños de agua, sonicadores, etc.), que incluyen el uso de distintos ácidos solos o combinados en diferentes concentraciones (ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido perclórico, etc.) o ácidos más peróxidos (ácido nítrico + peróxido de hidrógeno) (Sah y Brown, 1997). Habitualmente no se utiliza ácido fluorhídrico (HF) en soluciones metanólicas, ya que genera disminución de las emisiones de las señales de las longitudes espectrales por el reemplazo de la unión B-OCH₃ por B-F y la formación del complejo fluoruro de boro, volátil. El proceso de digestión de las muestras es uno de los pasos determinantes de las mediciones de analitos por las técnicas de ICP, ya que a pesar que las muestras son previamente digeridas y diluidas antes de realizar las mediciones, podrían quedar en ellas partículas de diverso origen que pueden perturbar la introducción de la muestra al sistema de medición, obstruyendo el nebulizador de la cámara de nebulización y de ésta forma generar mediciones erróneas o incluso causar el apagado del equipo. En algunas ocasiones, para evitar éstos inconvenientes, se realizan filtraciones de las muestras, previo a las mediciones. Para minimizar los efectos de las interferencias físicas se recomienda que la concentración de ácidos sea la misma para los estándares, blancos y muestras. También un aspecto importante para compensar éstas interferencias, es el uso de la técnica de estándar interno (STD), cuya hipótesis se basa en que las derivas relativas de sensibilidad son las mismas para el analito que para los patrones de la curva de calibración. La técnica del STD interno se realiza mediante el agregado en alícuotas de una solución con uno o más elementos de concentración conocida, tanto en las muestras como en la curva de calibración y en los blancos. Los analitos del STD interno no deben estar presentes en la matriz de las muestras. El método del STD interno se utiliza para corregir las derivas instrumentales que pueden ocurrir a lo largo del proceso de medición. Para el caso del ICP-OES, nosotros utilizamos itrio (Y) y estroncio (Sr), ya que sus líneas espectrales no interfieren con las líneas medidas para el Boro. Para el caso de las mediciones con ICP-MS se utiliza un analito con características de masa, potencial de ionización, estado de carga y concentración, lo más similar posible al analito de interés (ej. ⁹Be, ⁶Li). En nuestro laboratorio utilizamos una solución de 1 ppm del isótopo ⁶Li como STD.

En el caso de las interferencias espectrales, éstas ocurren sólo en las mediciones con ICP-OES. Las longitudes de onda monitoreadas típicamente para el análisis de boro en muestras biológicas son 208.889 nm, 208.957 nm, 249.677 nm, y 249.773 nm, entre otras (Farhat et al., 2013). La interferencia más importante para éste analito es la presencia de hierro (Fe), debido a que algunas de sus longitudes de onda espectrales se encuentran cercanas a las boro (Kmiecik et al., 2016). Por ejemplo, las líneas espectrales de Fe 249.782 nm y 249.653nm se superponen con las de B 249.773 nm y 249.678 nm, respectivamente. La determinación de B por la técnica de ICP-OES está afectada además por otros analitos, como cromo (Cr), silicio (Si), níquel (Ni), aluminio (Al), vanadio (V), manganeso (Mn), titanio (Ti), molibdeno (Mo) y altas concentraciones de sodio (Na) (Sah y Brown, 1997).

En el caso del ICP-MS, que no posee interferencias espectrales, las interferencias pueden ser del tipo isobáricas, poliatómicas, de óxidos y de iones de doble carga. Las interferencias isobáricas son causadas por isótopos de otros elementos o especies poliatómicas que tienen la

misma masa/carga (m/z) nominal que el analito a estudiar. Para solucionar éste tipo de interferencias se pueden llevar a cabo correcciones mediante un software adecuado, debido a que los solapamientos isobáricos se predicen exactamente a partir de las tablas de abundancia de cada isótopo. Las interferencias del tipo poliatómicas son más difíciles de eliminar que las isobáricas. Las especies poliatómicas se forman por interacciones entre las especies del plasma y las especies de la matriz o de la atmósfera y se producen para valores de $m/z < 82$. Se pueden solucionar con el uso del método de STD interno o midiendo blancos de muestra en la corrida de medición.

El tipo de interferencia más importante en ICP-MS corresponde a los óxidos e hidróxidos que se forman a partir del propio analito, de los componentes de la matriz, del disolvente y los gases del plasma. Casi todas estas especies forman iones MO^+ y MOH^+ y los picos de estas especies se superponen con el pico de uno de los iones del analito. La formación de los óxidos depende de variables experimentales como: la velocidad del flujo del inyector, la potencia de radiofrecuencia, el espaciado del separador del muestreador, la composición de los gases del plasma, la eliminación del oxígeno y la eficacia de la eliminación del disolvente. La reducción de la formación de óxidos e hidróxidos en plasmas es el centro de muchas de las investigaciones actuales.

Otra de las desventajas de la técnica de ICP es el efecto matriz. El efecto matriz produce una reducción en la señal del analito, llegando a ser evidente a concentraciones superiores a 500-1.000 $\mu\text{g/mL}$. Se minimiza utilizando disoluciones más diluidas, alterando el procedimiento de introducción de la muestra, separando las especies que lo provocan, adicionando STD interno ó cambiando a uno más apropiado y en el caso del ICP-MS utilizando un STD interno aproximadamente de la misma masa y potencial de ionización que el analito.

Por último, podemos mencionar el efecto memoria. Este puede ocurrir cuando se miden altas concentraciones de algunos analitos (B, Hg, Ag, Sb) y se producen debido a las contribuciones de señales de analitos medidos previamente en la muestra. El efecto memoria puede ser el resultado de la deposición de la muestra en varios componentes del sistema de introducción de muestra, por ejemplo en las mangueras de la bomba peristáltica, en la cámara de ionización y en la antorcha. Este efecto puede ser minimizado de varias maneras: lavar entre mediciones con una solución adecuada (ej. ácido nítrico, amoníaco, tritón), utilizar cámaras de nebulización de material inerte (ej. téflon o cuarzo), realizar esquemas de mantenimiento y limpieza del equipo, utilizar agua de calidad miliQ, minimizar las contaminaciones externas de B mediante la utilización de ácidos provenientes de envases libres de borosilicato (ej. téflon ó PVC), utilizar métodos químicos de purificación de ácidos (método de sub-boiling) ó tomar recaudos en la manipulación de los materiales utilizados en las mediciones.

Otras técnicas basadas en plasma incluyen Plasma de Corriente Continua (DCP), que es menos sensible y requiere mayor mantenimiento en comparación con ICP, Plasma de Microondas (MIP) y Plasma de Descarga Luminiscente. Los equipos correspondientes se encuentran menos disponibles comercialmente para análisis elementales en general y no son utilizados para el análisis de boro (Farhat et al., 2013).

2.4.1.2 Técnicas no basadas en plasmas

El análisis de boro es de interés en la industria nuclear, donde se usa ácido bórico en el refrigerante primario para controlar la reacción nuclear. Debido a las altas concentraciones de boro que se emplean se pueden generar óxidos metálicos que se depositan en las barras de combustible. Con el fin de controlar la concentración de boro, se desarrollaron varias técnicas analíticas nucleares (TAN), que pueden ser empleadas en diversos sitios de los reactores, con una preparación mínima de la muestra (Farhat et al., 2013).

En las TAN las muestras que contienen Bson bombardeadas con neutrones que causan la producción de partículas α y partículas γ (una o ambas), las cuales son monitoreadas para hacer la correlación con la abundancia isotópica del ^{10}B estable (Farhat et al., 2013).

El análisis por activación neutrónica (AAN) se lleva a cabo colocando la muestra bajo un flujo de neutrones térmicos (0,025 eV) y midiendo los productos de reacción. Cuando la muestra contiene isótopos de ^{10}B , ocurre la reacción de captura neutrónica entre el boro y los neutrones, generando átomos de ^7Li , partículas α (2,31 MeV) y rayos γ (478 keV).

Todos los métodos de determinación de B basados en AAN miden los productos de reacción, ya sean partículas α ó rayos γ , y se denominan Radiografía o Autorradiografía de Captura Neutrónica (ARN) ó Análisis por Activación de rayos gamma o Prompt gamma, respectivamente.

Estas técnicas permiten determinar boro en muestras intactas, pero se requiere el acceso a un reactor nuclear.

La distribución y concentración de átomos de ^{10}B en muestras de tejidos procedentes de estudios de biodistribución de compuestos borados para BNCT pueden determinarse a través de la cuantificación y el análisis mediante la técnica de ARN (Portu et al., 2016). En la técnica de ARN las muestras (generalmente biológicas) están en contacto con un film detector colocado bajo un haz de neutrones. Luego de la irradiación, el film es teñido, revelado y atacado químicamente con KOH o NaOH, para obtener la imagen microscópica de la distribución de las trazas generadas en la muestra que contenía ^{10}B . Esta técnica permite conocer cuali y/o cuantitativamente la concentración de boro (ej. Molinari et al., 2012; Portu et al., 2015). Un aspecto a considerar de ésta técnica, entre otras variables, es el espesor de las muestras. Generalmente se utiliza un criostato para obtener muestras de 1- 10 micrones, con el objeto de evitar pérdidas en la detección de trazas debido a la auto-absorción de las partículas α , dentro de la misma muestra. A pesar de ser una técnica de revelado destructivo, la principal ventaja de éste método es que permite la medición de la distribución de boro en tejidos intactos (Sah y Brown, 1997).

Más recientemente Portu y col. (2016) propusieron que la localización de átomos de boro en la estructura celular de muestras biológicas podría ser conocida con mayor precisión por la visualización simultánea de las trazas nucleares y la imagen de la muestra en el detector, utilizando luz UV-C. La sensibilización del detector por la irradiación con luz UV C produce una foto-degradación del polímero del detector. Como consecuencia, se forma una huella del material biológico, que reproduce los contornos celulares y nucleares, permitiendo así la visualización de la microlocalización de B a nivel de estructura celular (Portu et al., 2016).

Dado que un factor importante en BNCT es conocer la concentración y distribución de boro en tumor, tejido normal y/o tejido limitante de dosis, cuyos valores son utilizados para la planificación de tratamientos, recientemente se desarrollaron técnicas para medir la concentración de boro *in vivo*, en el tumor y tejido normal después de la administración del compuesto borado, permitiendo así una mejor cuantificación de la dosis administrada. Dentro de los métodos nucleares, un método capaz de cuantificar la captación de boro *in vivo* es la tomografía de emisión de positrones (PET: Positron Emission Tomography) (ej. Kabalka et al., 1997; Nariai et al., 2009; Shimosegawa et al., 2016). En consecuencia, la mejora en los últimos años para seguir el comportamiento farmacológico y químico del portador de boro utilizando PET se ha convertido en un estímulo adicional para BNCT. El marcado de BPA con ^{18}F y el uso de PET para evaluar el seguimiento *in vivo* del compuesto borado en un paciente y, además, la detección de compuestos de boro por resonancia magnética nuclear (RMN), actualmente se encuentran disponibles para su uso rutinario en la clínica. La técnica de $^{18}\text{FBPA}$ -PET es utilizado como criterio de selección de pacientes para llevar a cabo tratamientos con BNCT/BPA en Japón (ej. Kobayashi et al., 2016) y Finlandia (Kankaanranta et al., 2012).

La incorporación de agentes borados a tumores depende de varios factores: (a) del perfil de concentración plasmática del compuesto, que a su vez depende de la dosis y de la vía de administración; (b) de la capacidad del agente portador de boro para atravesar membranas (ej. barrera hematoencefálica); (d) del flujo sanguíneo dentro del tumor y (e) de la lipofilidad del compuesto, en el caso de tumores cerebrales, que deben atravesar la barrera hematoencefálica. En general, una alta concentración sanguínea en estado estacionario maximizará la captación de boro en el tumor, mientras que una rápida eliminación lo reducirá, excepto en el caso de la administración intra-arterial de drogas (Barth et al., 2005).

A pesar que los estudios de biodistribución contribuyen a la selección de potenciales compuestos borados y protocolos de administración que maximicen la dosis boro y minimicen la dosis de fondo de la dosis total de BNCT, el real potencial terapéutico de un posible protocolo debe ser evaluado en estudios de BNCT *in vivo*. En éste sentido, la investigación traslacional en modelos de animales adecuados ocupa un papel central.

3. Fuentes de neutrones

Para que el tratamiento BNCT sea efectivo, los neutrones deben ser entregados con las siguientes características: (Moss, 2014):

- a. La energía necesaria para producir la reacción de captura con el compuesto borado
- b. Un alto flujo
- c. Con la menor presencia posible de "contaminantes" en el haz de radiación
- d. El haz neutrónico dirigido al lecho del tumor

Los neutrones térmicos por sí mismos no producen daño significativo en la célula tumoral o en el tejido normal, dado que su energía es insuficiente para ionizar los componentes del tejido. Sólo cuando los neutrones térmicos se combinan con el ^{10}B , se produce una dosis de radiación que provoca daño celular significativo.

El flujo de neutrones necesario para la terapia de BNCT se encuentra en el orden de $10^9 \text{n/cm}^2\text{s}$. Hasta la fecha, este flujo ha sido generado mayormente a partir de reactores nucleares por un proceso de fisión (Burian et al., 1997). En la actualidad, los haces de neutrones disponibles no son monoenergéticos y contienen una mezcla de radiaciones: neutrones térmicos, epitérmicos, rápidos y rayos gamma. Los dos últimos contribuyen a la dosis de radiación de forma no selectiva, por lo cual deberían ser minimizados. Cabe señalar que la reacción de captura en el ^{10}B se produce con alta probabilidad con neutrones térmicos y, en menor medida, con neutrones epitérmicos. Los neutrones térmicos no son capaces de alcanzar gran profundidad en los tejidos. A los 2,5 cm el flujo incidente se reduce al 50% (Sweet et al., 1960). Dichos neutrones, entonces, son útiles si la terapia de BNCT se aplica a lesiones superficiales o poco profundas. En cambio, dado que los neutrones epitérmicos se termalizan (disminuyen su energía) a medida que penetran en el tejido, alcanzando un pico térmico a 3-6 cm de profundidad, pueden emplearse para el tratamiento de tumores profundos.

Un requerimiento básico de 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 et al., 2005). Dentro de los requisitos que involucran al diseño de la fuente de neutrones se ha sugerido que, para garantizar el éxito terapéutico de BNCT, las facilidades deberían cumplir con las siguientes condiciones (Coderre et al., 2003; Harling, 2009):

a. Intensidad suficiente para entregar un campo de irradiación en pocos minutos y durante el tiempo de distribución óptimo del boro, tanto en tumor como en tejidos normales sensibles, localizados en el campo de irradiación

b. Adecuada penetración de neutrones para irradiar tumores profundos con una relación terapéutica significativamente superior a 1

c. Facilidad de configuración para permitir la irradiación de los pacientes con varios campos en todos los sitios posibles del tumor

d. Colimación y tamaño de apertura del haz variable

e. Sistemas de seguimiento y control de haces precisos, fiables y automatizados

f. Sala de irradiación eficientemente blindada con comunicación audiovisual entre el paciente y el cuerpo médico y con rápido acceso al paciente en todo momento

g. Instalaciones para examinar al paciente, infusiones de drogas, simulaciones de la configuración del haz y planificación del tratamiento

Hoy en día, existen sólo unos pocos centros nucleares de investigación donde se llevan a cabo ensayos clínicos y/o actividades de investigación para BNCT para el tratamiento de diferentes

entidades oncológicas (Moss, 2014). Entre ellos se encuentran los reactores: THOR y TRIGA CONV en la Universidad Nacional Tsing Hua (Taiwan), KURRI y JRR-4 en la Universidad Nacional de la Universidad de Kyoto (Japón), TRIGA LENA-IT-005 (Italia) y RA-1, RA-3 y RA-6 en la Comisión Nacional de Energía Atómica (Argentina). Sin embargo, se han propuesto nuevos diseños o están bajo construcción nuevos reactores, por ejemplo, el Reactor TRR en Irán (Jarahi et al., 2016; Bavarnegin et al., 2016).

Hace más de dos décadas se propuso la utilización de aceleradores de partículas de baja energía como fuente de neutrones para BNCT. Antes del 2012, todas las irradiaciones de ensayos clínicos de BNCT eran llevados a cabo en reactores (Miyatake et al., 2016). Hoy en día, existen una amplia variedad de aceleradores (ciclotrones y sincrotrones o Linacs) que han sido o están siendo considerados para aplicaciones terapéuticas de BNCT en diferentes países como Japón (ej. Tananaka et al., 2011; Kumada et al., 2014), Italia (Alikaniotis et al., 2016), Rusia (ej. Kononov et al., 2004; Bayanov et al., 2009), Irán (Zolfaghari y Sedaghatizadeh, 2016) y Argentina (Kreiner et al., 2016). Los aceleradores ofrecen las ventajas con respecto a los reactores. Pueden estar situados en instituciones hospitalarias o especializadas y los procedimientos para su autorización, instalación y mantenimiento son más sencillos que los de un reactor. Además, son más compactos, menos costosos, y pueden ser fácilmente apagados (Miyatake et al., 2016). El haz de neutrones producidos en un acelerador posee una intensidad de flujo, alrededor de un orden de magnitud menor, en comparación con las fuentes de neutrones de los reactores. Es muy probable que la presencia de estas instalaciones sea decisiva para el futuro de BNCT en términos de una mejora cualitativa en la capacidad de reunir datos clínicos y acumular experiencia en pacientes (Moss, 2014). En Japón ya se encuentran en curso ensayos clínicos de BNCT empleando un acelerador.

4. Historia y antecedentes clínicos de BNCT

4.1 BNCT a nivel mundial

En los últimos 60 años, 15 diferentes instalaciones de neutrones (todos reactores nucleares de investigación) y, posteriormente, un número similar de grupos de BNCT, habitualmente formados por equipos de médicos, físicos médicos, físicos nucleares, etc., de diferentes institutos han participado en ensayos clínicos de BNCT en pacientes que sufren diversos tipos de cáncer. La mayoría de ellos se han realizado como ensayos clínicos de fase I, I/II y II (Moss, 2014). Cerca de 1000 pacientes han sido tratados con BNCT en todo el mundo. Los países que han implementado, o implementan actualmente, ensayos clínicos de BNCT comprenden a Estados Unidos, Japón, Finlandia, Suecia, Comunidad Europea, República Checa, Italia, Taiwán, China y Argentina.

Aunque el potencial clínico de BNCT fue reconocido en la década de 1930, no fue hasta la década de 1950, cuando se realizaron los primeros estudios de biodistribución para BNCT. Sweet y Javid, estudiaron la distribución del tetraborato de sodio ó bórax ($\text{Na}_4\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) en 58 pacientes luego de realizar la biopsia o la resección de tumores cerebrales. Ellos observaron que la

concentración de boro en tumoral tres veces mayor que en el tejido del cerebro circundante (Sweet y Javid, 1951).

Los primeros ensayos clínicos para glioblastoma multiforme fueron iniciados por Dr. Farr en el "Brookhaven National Laboratory" (BNL), y por Dr. Sweet y Dr. Brownell en el "Massachusetts General Hospital" utilizando el reactor del "Massachusetts Institute of Technology" (MIT). Desde 1950 a 1952, Farr y Sweet trataron 10 pacientes con glioblastoma multiforme, con BNCT mediado por bórax. Luego de haber realizado la craniotomía y resección del tumor (cuando fue posible), los pacientes fueron irradiados en el reactor del Brookhaven Laboratory (BNL). Cinco pacientes recibieron una única dosis, y a los 5 restantes se les aplicó el tratamiento en 2 a 4 fracciones. Los pacientes sobrevivieron en un rango entre 43 a 186 días después de la irradiación. Las autopsias realizadas en ocho de éstos pacientes revelaron efectos agudos de radiación en cerebro y cuero cabelludo. En todos los casos se observó viabilidad en los tumores post-tratamiento y en ninguno de ellos existió una prolongación de la supervivencia estadísticamente significativa o eficacia terapéutica (Sweet, 1997).

Entre 1959 y 1962 se trató un grupo adicional de 18 pacientes en el BNL utilizando bórax o pentaborato de sodio como transportador de ^{10}B , basándose en investigaciones llevadas a cabo por Soloway (Soloway et al., 1998). Pero al igual que en el grupo anterior, no hubo incremento en el tiempo de supervivencia (Barth et al., 1990). Los resultados de estos primeros ensayos fueron desalentadores, culminando por ende en el año 1962. Posteriormente, el Dr. Slatkin analizó cuidadosamente estos ensayos, atribuyendo los resultados negativos a una inadecuada selectividad de incorporación al tumor de los compuestos químicos borados inorgánicos que fueron utilizados como agentes de transporte (borax y pentaborato de sodio); a una insuficiente penetración de los haces de neutrones térmicos en el tejido, y a las altas concentraciones de boro en sangre que resultaron en un daño excesivo de la vasculatura normal del cerebro y del cuero cabelludo (Barth et al., 2005).

Los ensayos clínicos fueron reanudados por el Dr. Hatanaka en Japón en el año 1967. El Dr. Hatanaka, discípulo del Dr. Sweet, utilizó un haz de neutrones térmicos y el compuesto borado BSH (borocaptato de sodio), desarrollado por el Dr. Soloway (en el Massachusetts General Hospital de EE.UU.). El procedimiento se llevó a cabo en más de 150 pacientes portadores de gliomas. La primera etapa consistió en una cirugía citoreductora para reducir la masa tumoral, seguida de un período de recuperación. Luego se administró BSH mediante una infusión lenta. Primeramente, se administró vía intra-arterial cambiando posteriormente a la vía intravenosa. Luego de la infusión, se realizó la irradiación con neutrones térmicos en uno u otro de los diferentes reactores nucleares en Japón. Los resultados fueron alentadores, obteniéndose un índice de supervivencia a 5 años de un 58% de los pacientes portadores de glioma grado 3-4, con el tumor localizado a menos de 6 cm de profundidad. Dado que los neutrones térmicos presentan una profundidad de penetración limitada en tejido, se removió la piel y la calota para realizar una irradiación intraoperatoria, previniendo el daño por radiación en cuero cabelludo y permitiendo el tratamiento de tumores residuales ubicados a mayores profundidades (Barth et al., 2005). A pesar

de los resultados alentadores conseguidos, dichas aplicaciones de BNCT no estaban dentro del marco de ensayos clínicos controlados.

Los esfuerzos específicos de Hatanaka y colaboradores llevaron a considerar las aplicaciones clínicas con BNCT en los Estados Unidos y Europa. Al mismo tiempo, en Japón en el año 1987, el Dr. Mishima comenzó a tratar melanomas malignos superficiales utilizando p-boronofenilalanina (BPA) (Mishima et al., 1989). Las características superficiales del melanoma de piel permitieron que estos tratamientos fueran llevados a cabo usando neutrones térmicos. Este fue un suceso importante que marcó el comienzo del uso de BNCT para tumores fuera del sistema nervioso central. Tanto BSH como BPA siguen siendo hoy en día los únicos compuestos borados utilizados en ensayos clínicos para BNCT.

En Estados Unidos, BNCT comenzó a emerger en los años 90 en Brookhaven (Chanana et al., 1999) y Cambridge (Busse et al., 2003) y poco después comenzaron los primeros ensayos de BNCT en Europa, en Petten (Sauerwein y Zurlo, 2002), Finlandia (Joensuu et al., 2003), Suecia (Capala et al., 2003), y República Checa (Honová et al., 2004). BNCT también resurgió en Japón (Takagaki et al., 1997; Nakagawa et al., 2003), y posteriormente en Argentina (González et al., 2004) y Taiwán (Liu et al., 2004). Todos estos ensayos se realizaron dentro del marco de ensayos clínicos controlados, utilizando BSH y BPA, en instalaciones de reactores nucleares de investigación usando predominantemente haces de neutrones epitérmicos, debido a que los mismos brindan mejor penetración de los neutrones en los tejidos. El uso de reactores nucleares, que son muy costosos y no se encuentran en un ambiente hospitalario, desafortunadamente ha llevado a que parte de estos programas de tratamientos con BNCT hayan sido interrumpidos.

Con respecto al continente europeo, a través de un consorcio de naciones, se comenzó con un ensayo clínico de BNCT en el año 1997. Las irradiaciones se realizaron 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 et al., 2002). En Petten 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 .

En Suecia, se realizaron tratamientos para glioblastoma utilizando el haz epitérmico del reactor AB de Studsvik para uso médico (Barth et al., 2005). Se administró una solución de BPA (900 mg/Kg) en infusiones de 6 hs. El aumento del tiempo de infusión se basó en ensayos *in vitro* que demostraron que se necesitaban varias horas para cargar las células con BPA y que las infusiones i.v. prolongadas aumentaban la concentración absoluta de boro en tumor en el modelo de gliosarcoma 9L en ratas, manteniendo alta la oferta en sangre (Joel et al., 1999). Al realizar esta infusión prolongada en 17 pacientes, ésta fue bien tolerada y la supervivencia media preliminar fue de 18 meses, tiempo significativamente mayor al obtenido en los ensayos realizados en BNL o Harvard/MIT. Todos los pacientes fueron tratados en dos campos de irradiación. Dado que los pacientes suecos con glioblastoma multiforme que presentaron recidivas no fueron sujetos a otras terapias paliativas, los datos de supervivencia no fueron influenciados por tratamientos subsecuentes

(a diferencia de los pacientes de BNL y MIT), representando más precisamente los efectos reales de BNCT en el tumor. La corroboración de una mejora en el tiempo de supervivencia media representa un avance significativo, ya que BNCT no sólo brindaría una mayor supervivencia sino también una mejor calidad de vida, dado que implica una única aplicación (a diferencia de los tratamientos oncológicos convencionales) (Barth et al., 2005). En el año 2008, nuevamente el grupo de Suecia, publicó nuevos resultados utilizando esta infusión prolongada de 900 mg/kg de BPA (Henriksson et al., 2008), obteniendo resultados de eficacia terapéutica de BNCT comparables con la radioterapia convencional, pero en ésta ocasión se observaron importantes efectos colaterales, no deseados.

Pinelli y Zonta et al. en Pavia, Italia, trataron un paciente que presentaba más de 14 nódulos metastásicos en el parénquima del hígado. El tamaño de los nódulos impedía su extirpación quirúrgica y se decidió realizar BNCT *ex situ*, seguido de re-implante hepático. El procedimiento consistió en administrar, mediante infusión, BPA-fructosa (300 mg/kg) vía vena cólica en una infusión de 2hs. Se tomaron muestras de sangre, tumor e hígado normal para determinar la concentración de boro y, una vez que se demostró mediante alfa espectrometría que el boro se localizaba selectivamente en las metástasis y en menor medida en el hígado normal, se realizó una hepatectomía total. Luego, el hígado fue transportado al reactor de la Universidad de Pavia para ser irradiado por neutrones, seguido de una reimplantación en el paciente. Por más de 2 años, el paciente no tuvo evidencias clínicas o radiográficas de recidivas y sus niveles de antígeno carcinoembrionario fueron bajos. Esto demostró la potencial capacidad de BNCT de erradicar metástasis multicéntricas en un órgano sólido (Barth et al., 2005, Zonta et al., 2006). En un segundo paciente se demostró el efecto terapéutico de la técnica sobre los nódulos metastásicos de hígado pero no se pudo realizar un seguimiento a largo plazo dado que el paciente falleció por causas clínicas no relacionadas con el tratamiento (Zonta et al., 2006)

El grupo de trabajo finlandés es el que ha hecho la mayor cantidad de irradiaciones en pacientes en un único centro, más que cualquier otro grupo en todo el mundo. El reactor que utilizaron fue construido durante la década de 1990 en Espoo, Helsinki (Auterinen et al., 2001). La primera irradiación de pacientes se llevó a cabo en mayo de 1999, casi dos años después de la primera irradiación BNCT en Europa en Petten, en los Países Bajos (Moss et al., 1992). Los finlandeses han podido tratar pacientes en forma regular, casi semanalmente durante éstos años para diferentes patologías de cáncer, como por ejemplo glioblastoma multiforme (Kankaanranta et al., 2011) y tumores de cabeza y cuello (Kankaanranta et al., 2012) y cáncer recurrente de faringe con BPA como portador de boro (Haapaniemi et al., 2016). Los tratamientos fueron lamentablemente interrumpidos en el año 2012 por razones económicas y políticas.

La larga historia de BNCT en Japón ha sido bien documentada, comenzando con el trabajo pionero de Hatanaka, más tarde con el trabajo de Mishima, y más recientemente con los de Nakagawa, Matsumura y otros (Moss, 2014). Sin embargo, el trabajo de Hatanaka fue criticado porque no siempre se siguieron estrictos protocolos de ensayos clínicos. Recientemente, la comunidad de BNCT en Japón ha implementado los ensayos clínicos siguiendo los procedimientos internacionales.

Debido a la gran infraestructura que posee Japón en materia nuclear y a sus investigaciones innovadoras, diversos grupos japoneses han ensayado BNCT en pacientes con

diferentes tumores que no pertenecen al sistema nervioso. Entre ello, podemos mencionar: cáncer hepático recurrente (Yanagie et al., 2014), cáncer gastrointestinal recurrente (Yanagie et al., 2014); cáncer de pulmón recurrente (Suzuki et al., 2012) y enfermedad de Paget extra mamaria (Makino et al., 2012). En el reactor de investigación de la Universidad de Kyoto (KURR) se han producido más de 400 irradiaciones de BNCT, incluyendo pacientes con tumores de cerebro y más de 150 casos de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (ej. Kageji et al., 2014; Suzuki et al., 2014; Miyake et al., 2016).

A pesar de la larga trayectoria de tratamientos clínicos de BNCT en Japón, durante los últimos diez años, las instalaciones con fuentes de neutrones gradualmente han estado cada vez menos disponibles. Esto también ha sido exacerbado por el reciente incidente en la central nuclear en Fukushima, en marzo del 2011. En ese mismo año, se decidió que todos los reactores de investigación en Japón debían ser cerrados temporariamente para actualizar las medidas de seguridad.

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 et al., 2011). Recientemente, en el año 2016, se realizó el tratamiento fraccionado de BNCT a 17 pacientes con cáncer recurrente de laringe, utilizando BPA (400 mg/Kg) mediante infusión iv y determinando la relación tumor/tejido normal mediante la técnica de ^{18}F -BPA/PET. Estos estudios no sólo arrojaron resultados alentadores de control tumoral, sino que también se observó una mejora en la calidad de vida (Wang et al., 2016).

Podemos finalizar destacando que, a pesar de las interrupciones ocurridas a lo largo de la historia de los tratamientos con BNCT, en los últimos años se han logrado y se siguen logrando avances significativos en varios frentes que generan un mayor optimismo sobre el futuro de BNCT.

Dentro del contexto mundial, Argentina es uno de los países que ha aportado conocimientos en casi todos los aspectos involucrados en la terapia con BNCT. En el próximo inciso se realizará un breve resumen del proyecto de BNCT en Argentina.

4.2 Proyecto de BNCT en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

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, Universidad de Buenos Aires, Universidad de Maimónides, entre otros. El proyecto multidisciplinario de BNCT como terapia para tumores que desarrolla la CNEA está orientado a realizar aportes en el campo de la investigación y desarrollo tecnológico en el campo de la Salud y las técnicas biomédicas, así como también a acercar la tecnología nuclear al área de la salud.

El actual proyecto BNCT en Argentina es un excelente ejemplo de un programa de investigación fuertemente interactivo, contando con capacidad en prácticamente todas las áreas específicas asociadas con la tecnología para realizar BNCT, como ser: aceleradores, reactores,

aplicaciones clínicas, dosimetría computacional y planificación de tratamientos, física médica, microlocalización del boro, instrumentación nuclear, química y radiobiología. Las diferentes áreas se articulan a través de una coordinación general, formalmente establecida en el Departamento Coordinación BNCT, Gerencia de Química Nuclear y Ciencias de la Salud, perteneciente a la Gerencia de Área de Aplicaciones de la Tecnología Nuclear, CNEA y de un comité asesor, representando a cada una de las áreas temáticas, cuyos miembros pertenecen a distintos sectores de CNEA y de otras instituciones médicas. En el proyecto participan alrededor de 60 profesionales de los tres Centros Atómicos de la CNEA (Constituyentes, Ezeiza y Bariloche).

Históricamente, el proyecto BNCT en Argentina comenzó en el año 1999. En cuanto a sus aspectos clínicos se inició como un trabajo en colaboración entre la CNEA y el Instituto Médico Ángel H. Roffo. El proyecto contempló el desarrollo de la tecnología, de las facilidades, y de los estudios científicos y médicos para permitir la aplicación del BNCT en seres humanos en nuestro país (Menendez et al., 2009). Considerando los estudios clínicos a nivel internacional con mayores expectativas de éxito y menor riesgo de toxicidad en órganos vitales, el primer caso que se consideró como blanco para tratamiento en Argentina fue el de melanoma maligno en extremidades. Durante los años 2003 al 2007, se comenzó con el tratamiento en fase I/II de pacientes con esta patología en la facilidad de BNCT del reactor RA-6, Centro Atómico Bariloche, demostrando la seguridad y eficacia del protocolo implementado. Se trataron 7 pacientes. Los resultados obtenidos fueron comparables a los alcanzados con otras formas de radioterapia, pero con una toxicidad más baja y tolerable (Gonzalez et al., 2004).

Durante los años 2008 al 2013, el reactor RA-6 fue convertido para el uso de combustibles de uranio de bajo enriquecimiento, llevándose a cabo cambios mayores en el mismo, gracias a los cuales opera hoy a una mayor potencia. Durante este periodo se mejoraron sustancialmente todas las facilidades asociadas, incluyendo la sala de tratamiento de pacientes de BNCT. Luego de realizar la caracterización experimental y computacional del nuevo haz de neutrones para tratamiento, se elaboró y presentó toda la documentación pertinente ante la Autoridad Regulatoria Nuclear y se obtuvo la renovación de la licencia de operación para usos clínicos. Recientemente, en el año 2015, se reiniciaron los ensayos pre-clínicos en perros con tumores de cabeza y cuellos espontáneos y ensayos clínicos de BNCT para melanoma de extremidades. Los resultados de los ensayos pre-clínicos y clínicos de esta etapa se encuentran en evaluación.

Además del melanoma, se vienen investigando a nivel experimental en el proyecto de CNEA distintas patologías para las cuales BNCT se presenta como una opción competitiva: cáncer de cabeza y cuello, recurrente o inoperable, cáncer indiferenciado de tiroides, metástasis difusas en pulmón e hígado, sarcoma de Ewing, osteosarcoma, cáncer de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas, entre otros. Nuestro grupo está investigando a nivel experimental la aplicación de BNCT en artritis reumatoidea, cáncer de cabeza y cuello y en metástasis difusas en pulmón e hígado (ej. Schwint y Trivillin, 2015).

Objetivos

1. Hipótesis y objetivos

BNCT se basa en la incorporación selectiva a tumor de compuestos borados, seguido de la irradiación con neutrones, permitiendo así dañar selectivamente las células malignas mientras que se minimiza el efecto en tejidos normales. Los ensayos clínicos de BNCT realizados y/o en curso para el tratamiento de Glioblastoma Multiforme y Melanoma, y más recientemente, de cáncer de cabeza y cuello, en EE.UU., Europa, Argentina, Taiwán y Japón han demostrado una ventaja terapéutica potencial para esta técnica. Si bien los resultados de los ensayos clínicos de BNCT para distintas patologías arrojan resultados alentadores, se busca optimizar esta terapia para lograr mayor eficacia terapéutica sin un costo en términos de toxicidad. En ese sentido, los estudios *in vivo* en modelos animales adecuados contribuyen al conocimiento de la radiobiología de BNCT y permiten diseñar protocolos de tratamiento eficaces y seguros.

Nosotros propusimos y validamos el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster para estudios de BNCT, demostrando, mediante ensayos de biodistribución *in vivo*, la incorporación a tumor de los compuestos borados (aceptados para su uso en la clínica) borofenilalanina (BPA), decahidrodecaborato de sodio (GB-10) ó la combinación de ambos (ej. Kreimann et al., 2001a; Heber et al., 2004). Nuestros estudios previos sugieren la ventaja de usar combinaciones de compuestos borados con distintas propiedades y mecanismos de incorporación y de emplear distintas estrategias de administración para optimizar el “targeting” de boro en las diferentes poblaciones tumorales y en consecuencia aumentar la eficacia terapéutica de BNCT.

En base a los resultados de los estudios de biodistribución anteriores, nuestro grupo de trabajo propuso lo que en ese momento era una nueva aplicación de BNCT para cáncer de cabeza y cuello. Demostramos por primera vez la eficacia terapéutica de BNCT mediado por los compuestos borados BPA, GB-10 y BPA+GB-10, para tratar el cáncer oral en un modelo experimental en la bolsa de la mejilla del hámster. Además llevamos a cabo múltiples estudios radiobiológicos en este modelo tendientes a optimizar la eficacia terapéutica de BNCT sin exceder la radiotolerancia del tejido precanceroso limitante de dosis y sin generar radiotoxicidad en el tejido normal. 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 et al., 2012) presentan resultados terapéuticos alentadores, pero sub-óptimos

En un escenario clínico, la mucositis oral es un efecto frecuente durante la radioterapia convencional o BNCT para tumores de cabeza y cuello (Sonis, 2004; Kankaanranta 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.

En este marco y sobre la base de los conocimientos de radiobiología de BNCT obtenidos en nuestros estudios previos y en los estudios de otros grupos (ej. Kato et al., 2004; Ono et al., 1999;

Barth et al., 2005), buscamos optimizar la terapia de BNCT potenciando el control tumoral y minimizando su radiotoxicidad. Para mejorar la eficacia terapéutica de BNCT y explorar su utilidad para el tratamiento de otras patologías se deben realizar estudios de biodistribución de boro y de BNCT *in vivo* en modelos experimentales adecuados.

En el marco del más reciente interés internacional de evaluar el potencial de BNCT para tratar metástasis de cáncer colorrectal en hígado y metástasis de cáncer colorrectal difusas en pulmón nos propusimos realizar estudios de biodistribución con compuestos borados en modelos experimentales en rata y en un modelo de pulmón sano en ovinos, para estudiar la cinética de distribución de compuestos borados en tejido tumoral y tejidos sanos. Asimismo nos propusimos explorar distintas estrategias de administración de compuestos borados en el modelo de cáncer oral en hámster con el objetivo de optimizar el targeting de boro en tumor. Se seleccionaron 2 protocolos aplicados en el modelo de cáncer oral para su evaluación en estudios de BNCT *in vivo*. Nuestro trabajo se basó en la hipótesis que nuevas estrategias de administración de compuestos borados, o nuevos compuestos borados presentarán una mayor incorporación absoluta y relativa de boro a la célula tumoral y esto redundará en una mayor eficacia terapéutica de BNCT.

En cuanto a la elección de compuestos borados se emplearon dos enfoques diferentes en el marco de este trabajo de tesis: el uso de nuevas estrategias de administración de compuestos borados aprobados para su uso en pacientes (BPA, BSH y GB-10) para acortar la brecha entre la investigación y la clínica, y el uso de compuestos borados de última generación (liposomas MAC+TAC) para acompañar el esfuerzo internacional orientado al desarrollo de un compuesto borado "ideal".

*Por lo tanto, el **objetivo general** de la presente tesis fue aportar a los esfuerzos nacionales e internacionales orientados a optimizar la eficacia terapéutica de BNCT y reducir su toxicidad en tejidos limitantes de dosis para distintas patologías, mediante estudios de biodistribución de compuestos borados en distintos modelos in vivo y estudios radiobiológicos in vivo.*

Para ello se plantearon los siguientes **objetivos particulares**:

- a. *Realizar estudios de biodistribución de boro empleando diferentes portadores de boro y diversas estrategias de administración, en los modelos experimentales de cáncer oral en hámster, metástasis colorrectales en hígado de ratas BDIX, metástasis colorrectales difusas en pulmón de ratas BDIX y en pulmón sano de ovinos, para evaluar la potencial ventaja terapéutica de dichos compuestos borados y estrategias de administración para distintas patologías. Se evaluó la incorporación absoluta y relativa de boro en tumor y en tejidos sanos.*

La hipótesis de trabajo es que el grado de selectividad en la incorporación de boro a tumor aumentará la ventaja terapéutica de BNCT y que es necesaria una concentración absoluta de boro en tumor de aproximadamente 20 ppm para que ocurra una cantidad suficiente de reacciones de captura de neutrones térmicos en boro que resulte letal para la célula. Asimismo, una concentración alta de boro en

tumor permitirá reducir los tiempos de irradiación, reduciendo concomitantemente la dosis de fondo que afecta uniformemente al tumor y al tejido normal. El contenido de boro en los tejidos sanos condicionará su tolerancia a la terapia. Así, la evaluación de nuevos protocolos de administración de compuestos borados contribuiría a la optimización de BNCT. Además, los valores de contenido de boro son necesarios para los cálculos dosimétricos que permiten diseñar los protocolos de irradiación con neutrones para BNCT.

- b. *Evaluar la eficacia terapéutica y potencial radiotoxicidad de nuevos protocolos de BNCT para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, empleando dos de los protocolos con potencial terapéutico seleccionados en el inciso a, realizando irradiaciones en el Reactor Nuclear RA-3 en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Teniendo en cuenta los conocimientos de la radiobiología de BNCT adquiridos, se buscará optimizar el control tumoral y reducir la radiotoxicidad en tejido precanceroso y tejido normal.*

La hipótesis de trabajo se basa en que los tratamientos de BNCT *in vivo* son indispensables para establecer la eficacia de un determinado protocolo. Si bien los valores de concentración de boro son indicativos de potencial terapéutico, múltiples variables radiobiológicas condicionan la respuesta de los tejidos tumorales y los tejidos que limitan la dosis que se puede administrar al tumor.

A continuación se realizará una breve reseña de los tipos de cáncer y modelos experimentales utilizados en ésta tesis doctoral. Asimismo, se abordarán en más detalle cada uno de los objetivos particulares.

2. Breve reseña de los tipos de cáncer, modelos experimentales utilizados y objetivos particulares de ésta tesis

Este trabajo doctoral se basa en estudios de biodistribución de boro para BNCT a nivel experimental *in vivo* utilizando modelos de metástasis colorrectal en hígado de ratas, metástasis colorrectal difusas en pulmón de ratas, cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster y modelo pre-clínico de pulmón sano en ovinos. Además está orientado a evaluar la eficacia terapéutica de la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, con dos protocolos seleccionados de los estudios de biodistribución previos en el modelo de cáncer oral en hámster. A continuación se abordan aspectos generales de estos casos de cáncer de particular interés para esta tesis, los modelos *in vivo* utilizados y los objetivos particulares abordados en cada caso.

2.1 Cáncer colorrectal

En más del 80-90% de los casos de cáncer colorrectal (CCR) se produce primero un pólipo (un crecimiento anormal de las células de la pared interna del intestino grueso) denominado adenoma, que puede crecer lentamente durante más de 10 años, y si no se detecta y extirpa a tiempo puede transformarse en un cáncer colorrectal. El CCR es una de las llamadas enfermedades occidentalizadas y la segunda causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo. Sobre la base de estudios epidemiológicos y científicos mundiales, la evidencia sugiere que el riesgo de cáncer colorrectal se ha incrementado debido al consumo de carne procesada y no procesada (pobre en contenido de fibras) y a la composición de alimentos que afecta el metabolismo microbiano del colon (O'Keefe, 2016). El CCR es el tercer carcinoma epitelial más común, el cual comienza con el desarrollo de una lesión precancerosa temprana hasta alcanzar la fase de neoplasia maligna, debido a mutaciones acumulativas y metilaciones aberrantes de algunos genes (Sameer y Nissar, 2016).

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

Según estimaciones de la IARC (International Agency for Research of Cancer), en Argentina el CCR causó en el año 2014, 7.327 muertes, el 12% del total de muertes por tumores malignos, ubicándose en el segundo lugar luego del cáncer de pulmón con 9.340 muertes (15,3%) y precediendo al cáncer de mama que produjo 5.700 defunciones (9,3%). Según sexo, el CCR es el tercero en incidencia en los hombres (luego del cáncer de próstata y de pulmón) alcanzando el 13% de los tumores malignos y el segundo en cantidad de casos en mujeres (detrás del cáncer de mama), representando el 11% de los cánceres. La tasa de mortalidad ajustada para el quinquenio 2007-2011 fue 15 x 100.000 habitantes para hombres y 8,9 x 100.000 para mujeres.

2.1.1 Metástasis hepáticas de cáncer colorrectal

El hígado es el sitio metastásico más común del cáncer colorrectal (Adam et al., 2009), probablemente debido a la propagación del tumor a través del sistema portal (Weiss et al., 1986). Entre el 20 y el 25% de los pacientes presentan metástasis hepáticas de cáncer colorrectal (MHCC) clínicamente detectables en el diagnóstico inicial y aproximadamente el 50% de los pacientes desarrollan MHCC durante el curso de la enfermedad (De Greef et al., 2016).

Contrariamente a otras localizaciones a distancia, las metástasis hepáticas son consideradas una enfermedad locoregional, ya que un tratamiento local puede mejorar la sobrevida global en este grupo de pacientes (Cardoso et al., 2009). La resección de las MHCC, a veces en combinación con otras modalidades de tratamiento local, como la ablación por radiofrecuencia, se ha convertido en el tratamiento estándar, ofreciendo una potencial cura, a pesar de la falta de pruebas procedentes de ensayos controlados aleatorios (De Greef et al., 2016). Las metástasis en hígado no tratadas tienen un mal pronóstico, con tasas medias de supervivencia

de menos de 8 meses (Garden et al., 2006). Sólo una minoría de los pacientes (10%-20%) con MHCC son considerados elegibles para la resección y datos recientes sugieren que alrededor de uno de cada tres pacientes sometidos a resección quirúrgica, seguirán vivos a los 5 años desde el diagnóstico. Alrededor del 85% de los pacientes tienen enfermedad hepática considerada irresecable (De Greef et al., 2016). Para éste tipo de pacientes la quimioterapia es la terapia elegida, ya sea como tratamiento paliativo, como intento de convertir los nódulos tumorales en quirúrgicos, o como una estrategia neoadjuvante (Zendel et al., 2014).

A pesar de los estudios realizados hasta ahora para controlar ésta enfermedad, actualmentela resección quirúrgica de las MHCC es la única estrategia potencialmente curativa. Por lo tanto, las terapias dirigidas capaces de destruir selectivamente las células tumorales preservando el tejido normal podrían mejorar la eficacia y reducir la toxicidad. En éste contexto, se ha propuesto a la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT) como potencial tratamiento de casos de metástasis hepáticas derivadas de cáncer colorrectal, múltiples, bilobares, irresecables, y resistentes a quimioterapia (Zonta et al., 2006; Suzuki et al., 2007; Altieri et al., 2004; Wittig et al., 2008a; Cardoso et al., 2009). Considerando a BNCT una técnica basada en un direccionamiento biológico y no geométrico (como ocurre en el caso de la radioterapia convencional), potencialmente permitiría dañar selectivamente las células tumorales infiltrantes en el tejido sano en general, y las micrometástasis en particular, un desafío en las terapias oncológicas actuales (Cardoso et al., 2007).

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

La irradiación del hígado aislado plantea la posibilidad del tratamiento de todos los tumores independientemente de sus posiciones, formas y tamaños, dado que potencialmente se puede alcanzar una irradiación homogénea en todo el volumen irradiado. De esta forma se lograría maximizar la dosis entregada al volumen tumoral, siendo el único órgano limitante dedosis el hígado sano. Además, la técnica de autotransplante evita los efectos de rechazo existentes en el trasplante habitual, ya que el paciente recibe su propio hígado tratado.

En la Argentina, desde el año 2004, en base al trabajo realizado en la Universidad de Pavia, se desarrolló un proyecto multidisciplinario con la finalidad de realizar los estudios que permitan llevar adelante tratamientos clínicos con BNCT *ex-situ*, en pacientes con metástasis en hígado derivadas de carcinoma de colon, que se presenten multifocales, irresecables, bilobares y resistentes a quimioterapia, y cuya única opción terapéutica sea un tratamiento paliativo. A diferencia del proyecto italiano, donde se planteó la irradiación de la totalidad del hígado, el

proyecto local contempló irradiar solamente una parte del lóbulo izquierdo. Esta nueva propuesta, basada en la resección parcial del hígado, planteó una exposición del paciente a un riesgo menor versus la resección total, ya que no involucraría una fase an-hepática (ausencia de hígado), y permitiría que la funcionalidad hepática post-operatoria no dependiera exclusivamente de la integridad de los segmentos tratados con BNCT. Asumiendo una diseminación metastásica en todo el hígado, la técnica propuesta involucraría: 1) la administración del compuesto borado, 2) la extirpación de una porción del lóbulo izquierdo (segmentos II y III) en el tiempo preestablecido post-administración del compuesto borado, 3) el transporte de la porción de hígado extirpada al reactor para su posterior irradiación con neutrones y, finalmente, 4) la reimplantación de la porción del hígado tratado con BNCT en el mismo paciente. Luego de un tiempo de espera se provocaría una atrofia parcial en el lóbulo derecho del hígado, induciendo la regeneración de los segmentos tratados con BNCT, de manera de producir una masa suficiente de hígado sano para permitir la resección de la porción restante de hígado enferma. Sin embargo, esta propuesta presenta algunas restricciones/objeciones. Por un lado plantea una intervención quirúrgica más compleja. A su vez presenta la particularidad de exponer al paciente a un período en el que conviven: la enfermedad sin tratamiento en una porción del hígado junto con la sección de hígado tratado, mientras se aplica un estímulo de regeneración hepática (se desconoce si esta inducción de la regeneración hepática podría ser un estímulo de crecimiento para las células cancerosas que no fueron tratadas). Estas objeciones llevaron a que otro grupo de médicos argentinos se interesara por el tratamiento del hígado completo, con algunas variantes técnicas, en la línea original de trabajo planteada por los investigadores italianos. Ambas técnicas de autotrasplante (irradiación de hígado parcial o total) involucran la perfusión del órgano con una solución de preservación, por ejemplo solución de Wisconsin (W), al igual que en un procedimiento estándar de trasplante, que sirve también para mantener al órgano en hipotermia durante la irradiación con neutrones (Crawley y Gadan, 2007).

2.1.2 Antecedentes de estudios experimentales y clínicos de biodistribución de boro para metástasis hepáticas de cáncer colorrectal

A nivel experimental otros grupos realizaron estudios de biodistribución de boro en modelos animales con tumores de diferente etiología en hígado. Por ejemplo, se reportaron estudios de biodistribución de ^{10}B en el modelo de metástasis hepáticas de cáncer de colon en ratas BDIX inducido por inoculación vía esplénica de células DH/DK12/TRb, donde se observaron concentraciones de ^{10}B en tumor e hígado, 2 hs post administración de BPA 300 mg/Kg, de 30,1 y 5,8 ppm, respectivamente (Pinelli et al., 2001). Por su parte, Roveda y colaboradores (2004) utilizando el mismo modelo experimental en ratas BDIX y con la misma dosis de BPA (300 mg/Kg) realizaron un estudio cinético de biodistribución B, en tejido hepático y metástasis de cáncer de colon, tomando muestras a 1,2,4,6,8,10 y 12 hs post administración del compuesto borado, mediante la técnica de alfa espectrometría. Los resultados mostraron una captación selectiva de B en las metástasis en todos los tiempos analizados. En particular, entre las 2 y 4 hs post administración del BPA, los valores de concentración de las metástasis fueron máximas, alcanzando relaciones de Metástasis/Hígado (M/H) en el orden de 4:1-6:1. Los estudios de

autorradiografía neutrónica mostraron una incorporación preferencial de BPA a células tumorales viables versus hígado (Roveda et al., 2004).

Suzuki y colaboradores (2004) estudiaron la administración vía arteria hepática de otro compuesto borado. En este caso se trataba de una emulsión de BSH y lipiodol (75 mg BSH/kg)/ lipiodol (0,3 ml /kg). El lipiodol es un éster etil yodado, derivado del ácido graso de las semillas de amapola, que contiene 38 % en peso de yodina. Se utiliza en muchas aplicaciones medicinales, entre ellas como material de contraste radiológico para hepatocarcinomas celulares y además como vehículo de drogas anticancerosas o radioisótopos para el tratamiento del cáncer (Liao et al., 2010). Utilizando un modelo de tumor de hígado de rata, desarrollado por inyección directa de células Walker 256 en el parénquima hepático, lograron valores de concentración de ^{10}B y relaciones Tumor/Hígado (T/H) que resultarían terapéuticamente útiles ($\cong 200$ ppm ^{10}B en el tumor y T/H de 15, seis horas post-administración del compuesto).

En principio, considerando como alternativa clínica el tratamiento ex-situ de hígado parcial propuesto en el proyecto de BNCT en Argentina, nuestro grupo estudió la potencial radiotoxicidad de BNCT en hígado en términos de una posible inhibición de su capacidad regenerativa post-BNCT (Cardoso et al., 2007). En ese trabajo se evaluó el efecto de dosis terapéuticas de BPA (15,5 ó 31 mg ^{10}B /Kg), GB-10 (50 mg ^{10}B /Kg) y BPA+ GB-10 (34,5 mg ^{10}B /Kg y 31 mg ^{10}B /Kg, respectivamente) y la aplicación de BNCT mediado por estos compuestos borados, sobre la regeneración del hígado sano y la función hepática sana en el modelo de ratas Wistar usando la hepatectomía parcial como estímulo regenerativo. Los resultados mostraron valores de concentración de boro en sangre aproximadamente entre 6 y 12 ppm para los protocolos de BPA, 13 ppm para el de GB-10 y 22 ppm para BPA+GB-10. Los valores de concentración de boro en hígado normal estuvieron alrededor de 8 ppm para la menor dosis de BPA ensayada y para el protocolo con GB-10, mientras que para la dosis mayor de BPA y para la combinación BPA+GB-10, los resultados fueron de 18 y 25 ppm, respectivamente. Las relaciones de concentración de boro entre la sangre y el hígado normal estuvieron dentro del intervalo 0,7-1,5. Luego de la irradiación no se observó pérdida de la capacidad regenerativa en los hepatocitos del hígado normal, con los protocolos de administración de los compuestos borados evaluados. A partir de éstos resultados, se especuló sobre la posibilidad de usar técnicas novedosas para el tratamiento de metástasis hepáticas colorrectales no resecables.

Años después, Liao y colaboradores (2010) realizaron estudios de biodistribución en ratas Fisher 344 portadoras de tumores hepáticos de células GP7TB, utilizando un derivado del ácido fenilbórico atrapado en lipiodol. La concentración de boro en sangre, tumor, hígado, riñón y pulmón a los tiempos 1, 2, 4 y 24 hs post administración vía intra-tumoral del compuesto borado fue medida por la técnica ICP-MS. Los resultados mostraron que a las 2 hs post administración del compuesto se alcanzaría la concentración máxima de B y la mayor selectividad T/H ($\cong 2,90$).

Recientemente, en el año 2013, Lin y colaboradores realizaron estudios de biodistribución con ácido bórico (AB) como portador de ^{10}B , en un modelo de carcinoma hepatocelular, empleando ratas Sprague-Dawley y la línea celular de hepatocarcinoma N1S1, inoculada

directamente en el lóbulo hepático de los animales. Las muestras para la medición de B en sangre, tumor, hígado normal y otros tejidos fueron tomadas 0,5, 1, 2 y 4 hs post administración iv del AB (25 mg¹⁰B/Kg) en la vena de la cola. Los resultados del estudio farmacocinético de la concentración de B en sangre, indicaron que el AB se metabolizó según una curva exponencial doble (modelo bi-compartimental), con una fase de distribución rápida y otra fase de excreción lenta. Pese a que uno no esperaría que el AB se incorpore preferencialmente a tumor, los autores demostraron cierto grado de selectividad (luego de 30 minutos de la administración del compuesto), siendo los valores de las relaciones de concentración de boro T/H y T/S de 1,4 y 1,2, respectivamente. La concentración de boro, dentro del intervalo de tiempo entre 1 y 2 hs post administración de AB, en sangre, tumor e hígado normal fueron similares (aproximadamente 20 ppm) y las relaciones T/H y T/S fueron 1.

Con respecto a los ensayos clínicos, el primero de ellos se realizó en el marco de BNCT *ex situ* para el tratamiento de metástasis hepáticas difusas de adenocarcinoma en el reactor de la Universidad de Pavia en el año 2002. Se utilizó BPA en una dosis de 300 mg/Kg (15.5 mg ¹⁰B/kg) como infusión y se obtuvieron por medio de la técnica de alfa-espectrometría, valores de las concentraciones de B en tumor e hígado de 47 ± 2 ppm y 8 ± 1 ppm, respectivamente, similares a los obtenidos en el modelo de ratas (Pinelli et al., 2001; Zonta et al., 2006). Luego en el año 2008, Wittig y colaboradores realizaron estudios de biodistribución de boro, en el marco del EORTC Trial 11001, para tratar pacientes con metástasis hepáticas de cáncer de colon con BNCT. Utilizaron BPA (dosis 5,1 mg ¹⁰B/Kg) y BSH (dosis 28 mg ¹⁰B/Kg). Los resultados medidos por la técnica de prompt gamma, mostraron una incorporación de boro media en tumor para BSH de 23 ± 2 ppm y una relación de concentración de boro en las metástasis hepáticas versus el hígado de $1,1 \pm 0,1$, revelando que la incorporación de BSH a tumor no fue selectiva. La relación T/H para BPA fue mayor a la de BSH ($1,5 \pm 0,2$) y la concentración absoluta media de B en tumor fue de 12 a 16 ppm. Aunque estos valores mostraron cierta selectividad de incorporación de boro a tumor, los autores plantearon la necesidad de llevar a cabo mayor cantidad de ensayos de biodistribución con el objetivo de obtener más información acerca de los valores de concentración de boro para ésta patología (Wittig et al., 2008a).

A nivel clínico, en el año 2009, Cardoso y colaboradores en nuestro país, realizaron estudios de biodistribución de boro en pacientes con metástasis hepáticas de cáncer de colon, en el marco del proyecto de BNCT *ex situ*. Los estudios de biodistribución se realizaron con BPA y las dosis utilizadas fueron de 5,2 mg¹⁰B/Kg y 15,5mg¹⁰B/Kg. Las muestras de sangre, hígado y metástasis se obtuvieron después de finalizada la infusión (80-90 min) y fueron medidas por la técnica de ICP-OES. Los resultados de concentración de boro en sangre, hígado y metástasis de los estudios de biodistribución con la menor dosis de BPA (5,2 mg¹⁰B/Kg) se encontraron en el intervalo de 3,4 - 5,9 ppm, 4,2 - 6,2 ppm y 8,0 y-12,0 ppm, respectivamente. Las relaciones Metástasis/Hígado (M/H) estuvieron entre 2,0 - 2,9. Para la dosis de BPA mayor (15,5mg¹⁰B/Kg), los valores de concentración de B en sangre e hígado fueron de aproximadamente 13 ppm y en las metástasis de 23 ppm, siendo las relaciones M/S y M/H de aproximadamente 1,8 (Cardoso et al., 2009). También se realizaron ensayos de perfusión en hígado y metástasis con resultados

preliminares que demostraron una disminución considerable de la concentración de boro luego de la perfusión con la solución de preservación. Los valores de concentración de B aproximados en hígado y metástasis post-perfusión en el caso de BPA (5,2 mg¹⁰B/Kg) fueron de 3,4 y 7,8 ppm, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron con la dosis de BPA de 15,5mg¹⁰B/Kg ([B]≅11 ppm en hígado y 13 ppm en metástasis). Estos hallazgos establecieron la importancia de considerar el proceso de perfusión del órgano, en el contexto de BNCT *ex situ*, en la planificación del tratamiento clínico (Cardoso et al., 2009).

Por último, podemos mencionar los resultados de los estudios de biodistribución realizados en Alemania (Schmitz et al., 2011) con BPA 200 mg/Kg (10,3 mg ¹⁰B/Kg) mediante infusión iv durante 2 hs, en pacientes con metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal, cuyas muestras fueron medidas por análisis de activación por prompt gamma. En ésta ocasión también fueron analizadas las concentraciones de boro en hígado luego de una perfusión con solución HTK (solución para lavado peritoneal). Los resultados de las curvas farmacocinéticas en sangre fueron similares y revelaron concentraciones de boro al finalizar la infusión, entre 15 y 25 ppm. Con respecto a las concentraciones de boro en las metástasis, las mismas se encontraron dentro del intervalo entre 8 y 12 ppm, presentandorelaciones T/S entre 1,7 y 2,6. Cuando se compararon los resultados post y pre infusión ([B] Post/[B]Pre) con la solución de lavado HTK de las muestras de hígado, las relaciones fueron de aproximadamente 0,70; es decir, cerca de un 30% del boro no fue retenido en el órgano luego de la perfusión.

Podemos resumir los ensayos clínicos de biodistribución de boro en metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal, mencionados en ésta tesis, mediante la Tabla 1H a,b.

Tabla 1H (a)	[BSH] (Dosis ¹⁰ B)	Tiempo de toma de muestra	[¹⁰ B] en metástasis	[¹⁰ B] en hígado	[¹⁰ B] en sangre	M/H	M/S	Técnica de medición de B
Essen , Alemania (Wittig et al., 2008a)	50 mg BSH/Kg (28 mg ¹⁰ B/Kg)	120 min	23 ppm	21 ppm	25 ppm	1,1	0,9	Prompt gamma

Tabla 1H a. Resultados de los estudios de biodistribución en ensayos clínicos con BSH en metástasis hepáticas de cáncer de colon (Adaptación de Schmitz, et al., 2011).

Tabla 1 H (b)	Pavia, Italia (Pinelli et al., 2001; Zonta et al., 2006)	Essen , Alemania (et al., 2008a)	Buenos Aires, Argentina (Cardoso et al., 2009)	Mainz, Alemania (Schmitz et al., 2011)
Dosis BPA (Dosis ¹⁰ B)	300 mg BPA/Kg (15,5 mg ¹⁰ B/Kg)	100 mg BPA/Kg (5,2 mg ¹⁰ B/Kg)	100 mg BPA/Kg (5,2 mg ¹⁰ B/Kg) 300 mg BPA/Kg (15,5 mg ¹⁰ B/Kg)	200 mg BPA/Kg (10,3 mg ¹⁰ B/Kg)
Tiempo de toma de muestra	0 min	120 min	80-90 min	0 min
[¹⁰ B] en metástasis	47 ppm	14 ppm	10 ppm (dosis menor BPA) 23 ppm (dosis mayor BPA)	10 ppm
[¹⁰ B] en hígado	8 ppm	9 ppm	5 ppm (dosis menor BPA) 13 ppm (dosis mayor BPA)	13 ppm
[¹⁰ B] en sangre	---	20 ppm	5 ppm (dosis menor BPA) 13 ppm (dosis mayor BPA)	20 ppm
M/H	6,0	1,6	2,5 (dosis menor BPA) 1,8 (dosis mayor BPA)	0,8
M/S	---	0,7	2,0 (dosis menor BPA) 1,8 (dosis mayor BPA)	2,0
Perfusión	No	No	Si	Si
[¹⁰ B] en hígado perfundido	---	---	3,4 ppm (dosis menor BPA) 11 ppm (dosis mayor BPA)	9 ppm
[¹⁰ B] en metástasis perfundidas	---	---	7,8 ppm (dosis menor BPA) 13 ppm (dosis mayor BPA)	---
[B]Higado Post perf/ [B] Higado Pre perf	---	---	1,2 (dosis menor BPA) 0,85 (dosis mayor BPA)	0,7
[B]Met.Post perf/ [B]Met. Pre perf	---	---	0,8 (dosis menor BPA) 0,6 (dosis mayor BPA)	---
Técnica de medición de B	Alfa espectrometría	Prompt gamma	ICP-OES	Prompt gamma

Tabla 1H b. Resultados de los estudios de biodistribución en ensayos clínicos con BPA en metástasis hepáticas de cáncer de colon (Adaptación de Schmitz, et al., 2011).

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

2.1.3 Modelo experimental de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal en ratas BDIX

Un hipotético modelo animal ideal para el estudio de metástasis hepáticas de origen colorrectal debe imitar todos los aspectos morfológicos, de alteraciones bioquímicas y del comportamiento biológico de la enfermedad en humanos (Kobaek-Larsen et al., 2000), a la vez que debe ser práctico, predecible, y óptimo en términos de las consideraciones éticas (De Jong et al., 2009). Desde el punto de vista técnico, Jong y colaboradores (2009) describen los aspectos que debería cumplir un modelo ideal de metástasis hepáticas de carcinoma de cáncer de colon:

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

Aunque, hasta el momento no se cuenta con un modelo que satisfaga todas las condiciones anteriormente descritas, la elección de un modelo experimental para éstos estudios, involucra compromisos y decisiones según las características y necesidades experimentales de acuerdo al objetivo planteado (De Jong et al., 2009).

En ésta tesis se seleccionó el modelo basado en la inoculación de células singeneicas de carcinoma de colon DHDK12/TRb en ratas BDIX, el mismo utilizado por el grupo dedicado a estudios de BNCT en Pavia, Italia (Nano et al., 2004; Roveda et al., 2004), pero modificando el método de implantación de las células derivadas de cáncer de colon. La DHDK12/TRb es una línea celular de carcinoma de colon establecida, originalmente aislada de ratas BDIX con carcinoma de colon inducido químicamente con 1,2-dimetilhidralazina (Caruso et al., 1993; Maggiori et al., 2012). Por lo tanto, la asociación entre la línea celular DHD/K12 y las ratas BDIX es biológicamente compatible, siendo un modelo *in vivo* descrito y estudiado más extensamente en los últimos años (Maggiori et al., 2012). Un aspecto relevante para destacar, es que el modelo involucra animales inmunocompetentes. Así, representa mejor el estado inmunológico de los pacientes con cáncer colorrectal que desarrollan metástasis, dado que el sistema inmune juega un rol clave en la respuesta a la enfermedad (De Jong et al., 2009; Maggiori et al., 2012). A su vez, los animales inmuno-deficientes muestran un estado de salud menos estable (De Jong et al., 2009).

Para llevar a cabo los estudios de biodistribución para metástasis hepáticas de cáncer colorrectal en ésta tesis se utilizó el modelo de carcinoma de colon en ratas BDIX mediante el método de implantación sub-capsular de las células DHDK12/TRben el hígado. Luego, se realizó un estudio piloto para determinar las condiciones experimentales óptimas para obtener nódulos hepáticos sub-capsulares medibles, bien localizados, sin diseminación pulmonar o peritoneal y vascularización adecuada (Pozzi et al., 2009).

2.1.4 Objetivo particular de ésta tesis referido al modelo de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal

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

Desde el punto de vista de la investigación aplicada, estudios en un modelo experimental de metástasis hepática pueden contribuir al entendimiento de la radiobiología de BNCT en esta patología, y a respaldar y mejorar el diseño de protocolos clínicos para hacerlos terapéuticamente más útiles y más seguros. A pesar que se han realizado estudios aislados de biodistribución de boro en diferentes modelos experimentales *in vivo* de cáncer de colon, estudios de biodistribución sistemáticos serían de gran relevancia.

Por lo tanto, uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar mediante estudios de biodistribución sistemáticos, diferentes protocolos de administración de compuestos borados en el modelo de metástasis hepáticas de cáncer de colon en ratas BDIX. Se emplearon los compuestos borados aprobados para su uso en humanos como BPA, GB-10 y BPA+GB-10 a distintas dosis y administrados por diferentes vías, con el fin de contribuir al conocimiento de protocolos potencialmente útiles para realizar ensayos de eficacia terapéutica y radiotoxicidad con BNCT.

2.2 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es uno de los más frecuentes a nivel mundial. En la Argentina la incidencia del cáncer de pulmón es de 10.296 casos (9,8%). Estos datos lo ubican en el cuarto lugar en ambos sexos. El cáncer de pulmón afecta sobre todo a personas entre 60 y 65 años. Menos del 15% de los casos se dan en personas menores de 30 años. Sin distinción de sexos, es el cáncer que más mortalidad genera. Si se diferencia por sexo la mortalidad por este cáncer se encuentra en

primer lugar para varones y en tercer lugar para las mujeres (luego de mama y colorrectal) (<http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>).

El cáncer de pulmón suele originarse a partir de células epiteliales y puede derivar en metástasis e infiltración a otros sitios del cuerpo. Existen dos grandes clasificaciones para el cáncer de pulmón: de células no pequeñas (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC) y de células pequeñas (Small Cell Lung Cancer, SCLC), donde los tumores de células no pequeñas representan más del 85% de los casos diagnosticados (Zhou et al., 2016).

Los tratamientos actuales consisten en cirugía-quimioterapia-radioterapia administrados ya sea en forma secuencial o concomitante. Su efectividad varía en función del estadio en que se encuentre la enfermedad, pudiendo, en estadios tempranos, alcanzar una sobrevida a 5 años de hasta 70% de los casos cuando la resección quirúrgica (tumorectomía) es posible. Sin embargo, esta sobrevida se ve disminuida drásticamente en estadios avanzados de la enfermedad (compromiso regional y/o metástasis distante) donde la sobrevida a 5 años llega a ser menor al 2%. El control moderado a pobre de la enfermedad plantea la necesidad de desarrollar nuevas modalidades de tratamiento y hace a los pacientes con NSCLC candidatos a los mismos.

Por otro lado, cabe mencionar que en los casos de cáncer de pulmón en jóvenes (menores de 15 años) los tumores primarios de pulmón resultan infrecuentes, siendo predominantes las lesiones de mediastino y pared torácica. Las neoplasias más frecuentes en pulmón son las metástasis de tumores sólidos extra-cranianos según el Hospital de Niños de la Plata, Argentina (Ucar et al., 2012). El parénquima pulmonar es la localización predominante de las metástasis de la mayoría de los tumores sólidos. Al momento del diagnóstico, 15 a 20% de los rhabdomiomas, osteosarcomas y sarcomas de Ewing y 10% de los tumores de Wilms y hepatoblastomas presentan nódulos pulmonares. Además, 30 a 40% de los niños con osteosarcoma desarrollan neoplasias pulmonares durante la evolución de su enfermedad.

El tratamiento de estas neoplasias es dependiente del tipo de tumor sólido y del centro de tratamiento. La escisión quirúrgica de las metástasis (metastasectomía) para el osteosarcoma logra una sobrevida a 3 años del 45% de los casos, pudiendo prolongarse hasta 20 años si se realizan metastasectomías periódicas. En cuanto al tratamiento del resto de las metástasis, la combinación de radioterapia y quimioterapia son los protocolos predominantes, con una sobrevida a 5 años inferior al 60%. Sin embargo, la sobrevida alcanzada está asociada con complicaciones pulmonares leves (29%) a severas (7%) que no permiten alcanzar mayores dosis de irradiación en tumor y así mejorar el control tumoral (Bölling et al., 2008).

2.2.1 Metástasis difusas pulmonares

La enfermedad pulmonar metastásica sigue siendo una de las principales causas de muerte. La distribución de las metástasis depende de la histología y de la localización del tumor primario, existiendo una tendencia de muchos tumores malignos a metastatizar preferentemente en los pulmones. El camino más frecuente para la metastatización pulmonar es la diseminación hematogena y embolización tumoral, siendo mucho menos común la vía linfática. El cáncer de

colon disemina por vía linfática, hematológica y por implantación. La diseminación linfática se realiza a través de tres redes: las intramurales o epicólicas, las intermedias y las extramurales (mesentéricas superior e inferior). Desde el hígado puede producirse metástasis a otros lugares como el pulmón. Las metástasis pulmonares en ausencia de lesiones en otras localizaciones ocurren en una minoría de pacientes (1-2%). Las metástasis colorrectales en el pulmón suelen ser pocas en número y de lento crecimiento, siendo posible realizar la metastasectomía en bastantes ocasiones, aún cuando las indicaciones de la resección no están bien definidas. El lugar más frecuente de recidiva tras la metastasectomía pulmonar es el pulmón, con un beneficio en la supervivencia similar al repetir la intervención. Los pacientes con metástasis hepáticas y pulmón sincrónicas resecables son raros y aún cuando se consigue una resección completa, tienen peor pronóstico (Jimenez, 1º Edición 2005).

La mayoría de las metástasis suelen ser bilaterales, periféricas, sub-pleurales y de predominio basal (siguiendo la distribución del flujo sanguíneo), no causando síntomas hasta que la enfermedad está muy avanzada y descubriéndose frecuentemente en el seguimiento de pacientes asintomáticos. En una persona sin antecedentes oncológicos, la probabilidad de que un nódulo pulmonar único sea una metástasis es del 1%, pero cuando ha existido una neoplasia previa esta probabilidad se eleva a un 81%. Sin embargo esto depende del tipo de tumor y así, a grandes rasgos, podemos decir que si el tumor primario es un carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, un carcinoma de mama, de próstata o gástrico, la probabilidad de que se trate de un segundo tumor es mayor. Pero si el antecedente es de un cáncer colorrectal o genitourinario, la probabilidad se equilibra; y si previamente el diagnóstico era de un melanoma o sarcoma, la primera posibilidad a descartar es una metástasis (Jimenez, 1º Edición 2005). La incidencia de cánceres múltiples de pulmón oscila entre el 1 y el 7%. Por lo tanto, el diagnóstico diferencial de los nódulos pulmonares es importante, ya que a menudo suele ser difícil determinar en casos de tumores pulmonares múltiples sincrónicos si el origen de los mismos se debe a cánceres multicéntricos de pulmón diferenciado, cánceres de pulmón con metástasis intrapulmonares o metástasis pulmonares a partir de cánceres primarios de otros órganos (Nakazato et al., 2008).

La alta incidencia del cáncer de pulmón en la sociedad, en combinación con la necesidad de desarrollo de nuevas modalidades de tratamiento para maximizar el control tumoral y la sobrevida de los pacientes, ha resultado en la búsqueda de nuevas modalidades de tratamientos más selectivos con estrategias menos tóxicas, especialmente debido a la marcada radiosensibilidad del pulmón sano. Los tratamientos actuales como la cirugía, la radio y la quimioterapia no han logrado mejorar satisfactoriamente la supervivencia de los pacientes y el pronóstico general sigue siendo pobre. Dentro de este contexto, se ha propuesto la terapia de captura neutrónica en boro (BNCT) para el tratamiento de tumores difusos, no resecables en el pulmón, debido a que es una modalidad terapéutica de targeting "biológico" y no conformacional, que daña al tejido tumoral minimizando el daño a tejido normal y de ésta manera permitiría tratar células infiltrantes en tejido sano que no son localizables geoméricamente.

En el tratamiento *in-situ* de metástasis difusas en pulmón, uno de los principales órganos de riesgo es el pulmón normal. De esta forma, muchas veces es el órgano que limita el tratamiento

y en consecuencia, es el tejido sobre el que se realiza la prescripción de dosis. La irradiación *in-situ* del volumen pulmonar, ya sea en forma parcial en el caso de tumores localizados o completa para las metástasis difusas, conlleva la exposición no deseada de los órganos sanos presentes en la cavidad torácica. Por tal motivo, tal como fue propuesto y aplicado anteriormente para metástasis multifocales de hígado en humanos (Pinelli et al., 2001; Zonta et al., 2006), se ha propuesto el tratamiento BNCT *ex-situ* del pulmón. La irradiación del pulmón aislado permitiría el tratamiento de todos los tumores independientemente de sus posiciones, formas y tamaños, logrando de esta forma maximizar la dosis entregada al volumen tumoral. Además, la técnica de autotransplante permite evitar los efectos de rechazo existentes en el trasplante habitual, ya que el paciente recibe su propio pulmón tratado. El tratamiento del pulmón con BNCT *ex-situ*, al igual que en el caso del hígado, comprende la irradiación extracorpórea del órgano, seguida de la reimplantación. Una vez que se explanta el órgano, se perfunde con solución de preservación para garantizar una adecuada perfusión sanguínea y funcionalidad del órgano a la hora del re-implante. Por éste motivo, es indispensable conocer si existe variación de la concentración de boro antes y después de la perfusión del órgano.

En nuestro país se está desarrollando desde el año 2009 un proyecto multi-institucional, liderado por la CNEA, que involucra diferentes instituciones universitarias y clínicas (Universidad Maimónides, Instituto A. Roffo y Fundación Favalaro). El objetivo general de este proyecto es generar los conocimientos necesarios para la aplicación de BNCT *ex-situ* al tratamiento de cáncer de pulmón metastásico difuso. En este marco se anidan dos líneas de trabajo que exploran los aspectos pre-clínicos y clínicos relacionados con el tratamiento. Los aspectos relativos a la técnica quirúrgica, biodistribución de BPA y toxicidad en pulmón normal se estudiaron en el modelo pre-clínico de pulmón sano en oveja. Los estudios en animales grandes permiten, entre otras características, el uso del equipamiento y técnicas que serían aplicables al paciente humano, contribuyendo de esta forma a una traslación de los resultados obtenidos en el modelo pre-clínico de forma casi directa a la aplicación clínica. En ésta tesis, se estudiaron los aspectos vinculados a la cinética de BPA en pulmón y al efecto de la perfusión sobre la biodistribución de boro en pulmón sano de oveja. Los aspectos relativos a biodistribución de boro en tumor y tejido normal se realizaron en un modelo experimental de metástasis pulmonares difusas de cáncer de colon en ratas BDIX ya que no se cuenta en la actualidad con un modelo de metástasis en pulmón en animal grande inmunocompetente.

2.2.2 Antecedentes de estudios experimentales y clínicos de biodistribución de boro para metástasis difusas pulmonares

A nivel experimental, Suzuki y colaboradores (2007) realizaron estudios de biodistribución de boro y eficacia de BNCT en ratones C3H/He implantados con células SCCVII en la cavidad torácica, utilizando BPA a una dosis de 26 mg¹⁰B/kg. Luego de una hora de la administración del compuesto borado, midieron la concentración de boro en tumor y pulmón normal, mediante la técnica de prompt gamma. Obtuvieron resultados de [B] de 27 y 21 ppm, para tumor y pulmón normal respectivamente y los estudios de eficacia de BNCT resultaron alentadores.

Bortolussi y colaboradores de la Universidad de Pavia (Italia), en el año 2011 desarrollaron un modelo de metástasis difusa de cáncer de colon en pulmón de rata, en el cual llevaron a cabo estudios de cinética con el compuesto borado BPA a una dosis de 15,5 mg¹⁰B/Kg con administración iv e ip. Las concentraciones de B en tumor y pulmón fueron medidas por α -espectrometría, a intervalos de 1, 2, 4, 6 y 8 hs post administración del BPA. La concentración de boro en pulmón normal disminuyó en función del tiempo (12 ppm y 5 ppm a 1 y 8 hs post administración del BPA, respectivamente), mientras que la concentración de boro en el tumor permaneció casi constante, durante todo el intervalo de tiempo ensayado (1-8 hs). La relación de la concentración de boro en el tumor versus pulmón normal fue mayor a 3, 4 h después de la administración de BPA, considerando la captación de boro sólo en células tumorales viables. Los estudios con autorradiografía neutrónica (ARN) revelaron una mayor densidad de trazas y por ende mayor concentración de B en las metástasis en comparación con el pulmón.

Por último, podemos mencionar al grupo de Andoh y colaboradores (2015) que realizaron estudios de cinética de biodistribución de boro en metástasis pulmonares de sarcoma de células claras en ratones nude BALB/CA, con BPA 465 mg/Kg (24 mg ¹⁰B/kg iv). Los resultados de la concentración de boro en tumor, pulmón y sangre, una hora después de la administración del compuesto borado, medidos por la técnica de ICP-OES, fueron aproximadamente 51 ppm, 5 ppm y 10 ppm, respectivamente. De éstos resultados se obtuvieron relaciones de concentración de boro T/S y T/P de \approx 5 y 10, respectivamente (Andoh et al., 2015).

En la actualidad, no existen datos de cinética de compuestos borados en pulmón sano y metástasis difusas en pulmón en humanos debido a que la medición de concentración de boro es generalmente invasiva y compromete la integridad de los órganos o tejidos en cuestión. En 2012, el grupo de Andoh y colaboradores realizó la re-irradiación de un paciente previamente tratado con BNCT. En éste caso, se administró por infusión intravenosa durante 2 hs una solución de BPA 200 mg/Kg (10,3 mg¹⁰B/Kg) y antes de realizar el tratamiento de BNCT, se comprobó, mediante un estudio de ¹⁸F-BPA PET, la acumulación selectiva de BPA en el tumor con una relación de concentración de boro en tumor vs sangre (T/S) de 3,1.

2.2.3 Modelo experimental de metástasis difusas pulmonares de cáncer de colon en ratas BDIX

En ésta tesis se seleccionó el modelo basado en la inoculación de células singeneicas de carcinoma de colon DHDK12/TRb en ratas BDIX (Bortolussi et al., 2011), realizando modificaciones con el objetivo de optimizar los estudios de biodistribución. Se realizaron estudios piloto variando la cantidad de células derivadas de cáncer de colon inoculadas en la vena yugular y el tiempo de desarrollo de las mismas, de tal forma que se obtuviera una masa adecuada de metástasis difusas en pulmón, para los estudios de biodistribución. Al igual que en el modelo de metástasis hepáticas colorrectales, descrito anteriormente, éste modelo involucra animales inmunocompetentes (de Jong et al., 2009; Maggiori et al., 2012).

Para llevar a cabo los estudios de biodistribución de boro en ésta tesis se utilizó el modelo de metástasis difusas en pulmón de carcinoma de colon en ratas BDIX mediante el método de

inoculación de células DHDK12/TRb por la vena yugular. Asimismo, se realizó un estudio piloto para determinar las condiciones experimentales óptimas para obtener abundantes metástasis vascularizadas en pulmón, preservando zonas de pulmón sano para su evaluación.

2.2.4 Modelo pre-clínico de pulmón sano en ovinos

El proyecto BNCT *ex-situ* para el tratamiento de pacientes con metástasis múltiples en ambos pulmones, considera como hipótesis de trabajo que el pulmón ovino es un modelo adecuado del pulmón humano. Las similitudes anatómicas y fisiológicas entre ambos pulmones, como así también las de los patrones de reparación y regeneración, fueron discutidos y reportados extensamente en la literatura (McMillen, 2001). Asimismo, el modelo ovino como modelo de enfermedades respiratorias ha sido ampliamente aplicado para el estudio de las enfermedades y tratamientos (ej. Prat et al., 2015).

En la actualidad no se dispone de un modelo de metástasis pulmonar en animal grande inmunocompetente. En este contexto, y dentro del marco del proyecto multi-institucional que lleva a cabo la CNEA en colaboración con la Universidad Maimónides, Instituto A. Roffo y Fundación Favalaro, que tiene como objetivo primordial estudiar la factibilidad de aplicar BNCT *ex-situ* tratamiento de pacientes con metástasis múltiples en ambos pulmones, sin invasión del volumen extra-pulmonar, realizamos estudios de biodistribución con BPA en pulmón sano en el modelo ovino. Parte de los resultados de éstos estudios de biodistribución fueron incluidos en el trabajo de la tesis doctoral de Farías R. (2015), y ya han sido publicados (Farias y Garabalino et al., 2015).

En nuestro trabajo previo (Farías y Garabalino et al., 2015), con el objetivo de conocer la biodistribución del compuesto borado BPA y el efecto de la perfusión del órgano sobre la biodistribución de BPA, realizamos en el modelo ovino tres estudios de cinética de captación de boro con dos pulmones izquierdos y un pulmón derecho *in-vivo* (es decir, sin explante de pulmón ni perfusión con solución de preservación), y dos estudios de perfusión en el pulmón (uno en pulmón derecho y otro en pulmón izquierdo), mediando el explante y perfusión de los mismos. Para los estudios de captación de boro en las ovejas se utilizaron 3 animales sanos a los que se les administró por vía intravenosa (iv) una solución de BPA 0,14 M. La administración del compuesto borado en todos los casos se realizó mediante una bomba de infusión durante 45 minutos en animales previamente sedados, a un flujo tal que se obtuviera una dosis final de 350 mg BPA/kg (> 99% ^{10}B), equivalente a 18 mg ^{10}B /kg. La elección de la dosis de BPA y su tasa de administración se basó en los estándares de los protocolos clínicos nacionales e internacionales que utilizan este compuesto para el tratamiento de melanoma, glioblastoma, mesotelioma y metástasis en pulmón con BNCT. La misma dosis se utiliza, además, en el modelo experimental de metástasis difusas de cáncer colorrectal en pulmón en ratas BDIX.

Los estudios de cinética se realizaron con una duración de cinco horas a partir del comienzo de la infusión. A lo largo de todo el procedimiento se tomaron muestras de sangre, piel, pulmón y músculo siguiendo el esquema de la Fig. 1H. Los valores de concentración de boro en sangre y demás tejidos fueron medidos por la técnica de ICP-OES ó ICP-MS.

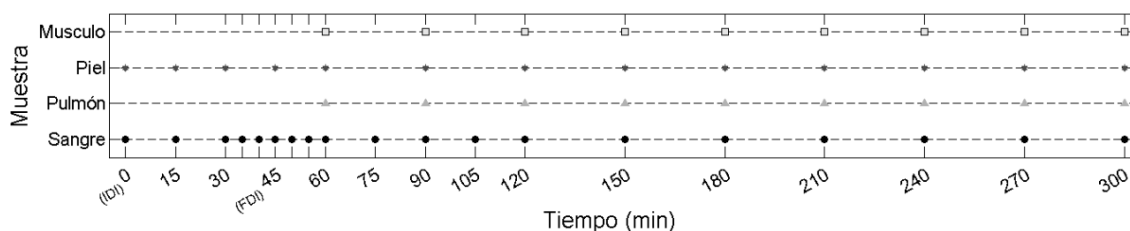


Fig. 1H Esquema del protocolo de cinética de biodistribución del compuesto borado BPA utilizado en el modelo pre-clínico de oveja. Se detallan los tejidos que fueron muestreados y los intervalos de tiempo en que se realizó cada extracción. La duración del procedimiento fue de 5 h (300 min) a partir del inicio de infusión (IDI) del compuesto borado. A los 45 minutos se alcanza el fin de la infusión (FDI).

Los resultados de las concentraciones de B en sangre revelaron que la forma de las curvas fue muy similar para todos los animales, siendo la tendencia relativa entre los distintos tejidos la misma en los tres casos. Así, aproximadamente 1 h post fin de infusión, la concentración de boro en piel fue levemente superior a la concentración en el pulmón, y ambas fueron mayores que la concentración observada en sangre. La concentración de boro en la sangre alcanzó su valor máximo al final de la infusión con valores entre 38 y 46 ppm, y luego comenzó a decrecer exhibiendo el comportamiento bi-exponencial esperado.

La máxima concentración de boro en el pulmón se alcanzó aproximadamente 50 minutos luego de fin de infusión (FDI), con un valor absoluto de $21,8 \pm 0,4$ ppm para todos los animales. Cabe mencionar que tampoco se encontraron diferencias en la incorporación de boro entre el pulmón derecho y el izquierdo, en ninguno de los tiempos post administración ensayados.

El valor absoluto de concentración de boro en sangre para el modelo animal 60 minutos luego del fin de infusión fue de $18,9 \pm 0,6$ ppm, similar a los valores de concentración de boro promedio reportados en humanos cercanos a 20 ppm (Farías et al., 2014), para la misma dosis de BPA y el mismo tiempo. Por otra parte, las relaciones de concentración de boro pulmón/sangre y piel/sangre se mantuvieron prácticamente constantes hasta 80 minutos post fin de infusión, alcanzando valores de $1,3 \pm 0,1$ y $1,9 \pm 0,1$, respectivamente. Estos resultados sugirieron que el modelo animal se ajusta al humano según estudios previos realizados en pacientes usando una dosis de 350 mg BPA/kg (Busse et al., 2003; Fukuda et al., 2003; Liberman et al., 2004).

Ochenta minutos luego del FDI, la concentración de boro en sangre, pulmón y piel comenzó a decrecer lenta y progresivamente. Los parámetros del modelo obtenidos para el perfil de concentración de boro en sangre fueron $k_{1,2} = 0,022 \text{ min}^{-1}$, $k_{2,1} = 0,012 \text{ min}^{-1}$, $k_{1,0} = 0,0068 \text{ min}^{-1}$ y $k_d = 0,0247 \text{ Kg/Kg}$, valores que se encuentran dentro de los parámetros promedio ($\pm 1\sigma$) reportados por Kiger y colaboradores (2001) para 10 pacientes tratados con BNCT a los que se les administró la misma dosis de BPA que la considerada en los estudios con oveja.

En éstos estudios previos también analizamos si el procedimiento de perfusión del órgano alteraba las concentraciones de boro en el pulmón. Para ello realizamos el explante y perfusión del pulmón de oveja y calculamos un factor de retención (f_R), definido como la relación entre las

concentraciones de B en el tejido de pulmón normal post perfusión versus pre-perfusión. El resultado del f_R fue de $0,46 \pm 0,14$, confirmando que la perfusión arterial del órgano con las soluciones que aseguran las condiciones de preservación genera, de forma inevitable, una disminución en la concentración de boro. Asimismo, se observó que la distribución de boro remanente es no homogénea en el órgano explantado. Sin embargo, el hecho de que el valor esperado del factor de retención con un intervalo de confianza del 68% fue igual a $0,46 \pm 0,14$ sugeriría que un amplio porcentaje del volumen pulmonar retiene alrededor de la mitad de la concentración de boro alcanzada pre-perfusión.

Pudimos concluir que los resultados obtenidos sugieren que el modelo pre-clínico en animal grande sería un sustituto adecuado para inferir la cinética y captación del compuesto BPA en humanos.

2.2.5 Objetivos particulares de ésta tesis referidos al modelo de metástasis difusas pulmonares de cáncer de colon en rata y al modelo pre-clínico de pulmón sano en ovinos

Se conoce que una de las maneras más eficientes de optimizar BNCT es mejorar la entrega de portadores de boro a los tumores, aumentando así el contenido absoluto de boro y la captación selectiva de boro en tumor. En este contexto, el objetivo del estudio en el modelo de metástasis pulmonares difusas de carcinoma de colon en ratas BDIX fue realizar estudios de biodistribución de boro con diferentes protocolos que involucraron a BPA y GB-10, administrados solos o en combinación, en distintas dosis y empleando distintas vías de administración. Estos resultados son de gran utilidad, ya que son necesarios para realizar los cálculos de dosis correspondientes y evaluar la factibilidad de ensayar la eficacia y radiotoxicidad de BNCT en el reactor nuclear RA-3 (Centro Atómico de Ezeiza, Comisión Nacional de Energía Atómica).

Como mencionamos anteriormente, debido a la falta de modelos experimentales de metástasis pulmonar en animales grandes inmunocompetentes, los resultados obtenidos en pulmón sano del modelo ovino pueden complementarse con los estudios de biodistribución en el modelo experimental de metástasis difusas de cáncer colon en pulmón en ratas BDIX.

En el modelo pre-clínico de pulmón sano ovino realizamos estudios adicionales de cinética de BPA y un estudio de perfusión en ambos pulmones, mediando el explante y perfusión de los mismos. Estos estudios complementan los anteriores y se centran sobre el análisis del efecto de la perfusión sobre la retención de BPA en pulmón sano y en posibles diferencias entre ambos pulmones debidas a las diferencias en la arquitectura vascular y la anatomía.

2.3 Cáncer de cabeza y cuello

La cabeza es una de las partes más complejas del cuerpo humano y por lo tanto son de suma relevancia los tumores que se desarrollan en esta región. Los tumores malignos de cabeza y cuello crecen en la mucosa del tracto aero-digestivo en diferentes sitios como la cavidad oral, faringe, laringe, cavidad nasal, senos paranasales, como así también en glándulas salivales,

tiroides, paratiroides, huesos, tejidos blandos, estructuras neurales-vasculares y piel (Syrjänen, 2005; Heroiu et al., 2013).

El cáncer de cabeza y cuello es una enfermedad mortal que se ha evidenciado desde el origen de la raza humana y aún sigue siendo un reto encontrar un tratamiento eficaz y adecuado. La enfermedad es mucho más común en países menos desarrollados, donde se produce a una tasa del 35-45%, siendo éste número dos veces mayor en los grupos desfavorecidos en comparación con los países económicamente desarrollados. Anualmente se diagnostican unos 650.000 nuevos casos de cánceres de cabeza y cuello en el mundo, con una proporción de 3:1 entre hombres y mujeres. La mayoría se diagnostican en etapas avanzadas (etapa III ó IV) y es más probable que en ellos hayan ocurrido invasión a huesos adyacentes o metástasis a ganglios linfáticos regionales (Supsavhad et al., 2016). El número de muertes debido a ésta enfermedad es de alrededor de 350.000 anualmente. En los hombres, el cáncer de cabeza y cuello es el cuarto tipo de cáncer más común, mientras que en las mujeres es la novena causa de muerte (Heroiu et al., 2013).

El hábito de fumar, el uso del alcohol, el mascado de la nuez de betel y la infección por HPV (human papilomavirus o virus de papiloma humano) son algunos de los principales factores de riesgo. Inclusive, el hábito de fumar y el consumo de alcohol podrían tener efectos sinérgicos (Jemal et al., 2011). A pesar que éste tipo de cáncer ocurre generalmente en pacientes mayores, la incidencia del mismo en personas jóvenes ha aumentado y estaría relacionada con el HPV (Supsavhad et al., 2016).

Más del 90% de los cánceres de cabeza y cuello son tumores de células escamosas (SCC: squamous cell carcinoma), la mayoría de los cuales se encuentran en la cavidad oral y laringe (aproximadamente 60- 70%). El 10% restante son adenocarcinomas de origen salival, melanomas, tumores de tejidos blandos y linfomas (Heroiu et al., 2013). La tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con SCC en estadios tempranos (I-II) se encuentra alrededor del 80 %, mientras que en estadios tardíos (III-IV) es de aproximadamente 50% y el pronóstico para pacientes con enfermedad recurrente, invasión ósea o metástasis es deficiente (Borutto y Szabo, 2014; Supsavhad et al., 2016).

Los pacientes que presentaron durante su vida un cáncer de cabeza y cuello y que fueron tratados por ello, tienen un alto riesgo de desarrollar múltiples cánceres. En la mayoría de los casos, los segundos tumores primarios después de un cáncer de cabeza y cuello también se desarrollan a este nivel, debido a la persistente influencia carcinogénica sobre la mucosa del tracto aero-digestivo superior, conocido como “cancerización de campo”, incluso después de finalizada la exposición a factores carcinógenos, o debido a tratamientos de quimioterapia y radioterapia, susceptibilidad genética, deficiencia inmunológica y supervivencia prolongada después de algunos tumores primarios (Heroiu et al., 2013).

El tratamiento de los cánceres de cabeza y cuello es complejo y requiere un enfoque multidisciplinario que incluye médicos oncólogos, radiólogos, cirujanos de cabeza y cuello, fonoaudiólogos, trabajadores sociales, psicólogos, cirujanos plásticos y/o reconstructivos y odontólogos. El tratamiento con un sólo tipo de modalidad, cirugía o radioterapia, se recomienda

generalmente para el 40% de pacientes que presentan la enfermedad en etapa I ó II. Cada una de las dos modalidades da como resultado una supervivencia similar con tasas de curación que oscilan entre el 60% y el 90%. La elección entre las modalidades de tratamiento depende del sitio del tumor, la extensión de la enfermedad, la preferencia del paciente, las co-morbilidades, la experiencia del equipo multidisciplinario, el equipo disponible, etc. Con los años, hubo avances significativos en las técnicas quirúrgicas y de radiación que han reducido los efectos tóxicos sin comprometer el resultado. Además, recientemente se han ensayado diferentes estrategias biológicas para pacientes con cáncer de cabeza y el cuello que incluyen fármacos que atacan factores de crecimiento y sus receptores, transducción, control del ciclo celular, síntesis de prostaglandinas, hipoxia y angiogénesis, entre otros (Vermorken y Specenier, 2010). Para el 60% de los pacientes que presentan una enfermedad localmente avanzada en el momento del diagnóstico, generalmente se recomienda la terapia combinada. En los pacientes con enfermedad irreseccable el tratamiento estándar actual es el tratamiento concomitante con quimio-radiación (Vermorken y Specenier, 2010). Pero, lamentablemente, cuando los tumores recurrentes de cabeza y cuello son irreseccables, 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.

2.3.1 Cáncer oral

El carcinoma de células escamosas (SCC) es el cáncer más común de cabeza y cuello, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años en la cavidad oral y orofaríngea. Si bien los cánceres de cabeza y cuello se relacionan con el consumo de alcohol y tabaco, los cánceres de la cavidad oral probablemente también estarían vinculados a la prevalencia del HPV (Denson et al., 2016).

El desarrollo de múltiples lesiones malignas en la cavidad oral puede ser explicado por un proceso denominado "cancerización de campo", que ocurre a nivel aero-digestivo cuando la mucosa es expuesta a diferentes tipos de carcinógenos, que actúan constantemente y durante un largo tiempo (Heroiu et al., 2013). Este término fue descrito por primera vez, a principios 1953, cuando Slaughter y Southwick estudiaron los diferentes tipos de cáncer de la cavidad oral. Los autores sugirieron varios criterios para describir el término cancerización de campo, que incluían: (a) el cáncer oral se desarrolla en múltiples áreas que presentan cambios precancerosos a nivel celular; (b) el tumor está rodeado de tejido anormal; (c) el cáncer oral se compone de varias lesiones independientes, que a veces confluyen y (d) la persistencia del tejido anormal después de la cirugía puede explicar la aparición de recidivas y múltiples cánceres. Los órganos en los que el fenómeno de cancerización de campo puede ocurrir asociado al cáncer de células escamosas son la cavidad oral, orofaringe y laringe, pulmón, esófago, vulva, cérvix, colon, mama, vejiga y piel (Heroiu et al., 2013).

El cáncer oral es el décimo cáncer más común en el mundo, representando el 3-5% de todas las neoplasias malignas. Alrededor del 90% de los cánceres orales son carcinomas de células escamosas que surgen del epitelio oral. La mayoría de ellos (67% a 77%) no son diagnosticados

hasta que alcanzaron al menos la etapa II (> 2 cm) (Sarode et al., 2013). El carcinoma de células escamosas es considerado como la etapa final de un proceso de múltiples pasos que comprenden la evolución desde la histología normal a hiperplasia, displasia leve, displasia moderada, displasia grave, carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo. En todas éstos pasos aparecen alteraciones cromosómicas particulares que pueden estar asociadas con distintas etapas de progresión tumoral (Vermorken y Specenier, 2010).

Una gran variedad de lesiones crónicas pueden ser relacionadas con cánceres en la cavidad oral. La leucoplasia oral se define como un parche mucoso blanco que no puede ser clasificado clínicamente o patológicamente como cualquier otra lesión. La leucoplasia se caracteriza por la proliferación epitelial con cantidades variables de displasia y /o hiperqueratosis y representa un proceso reactivo a los daños producidos por carcinógenos (ej. tabaco) y puede retroceder espontáneamente, permanecer sin cambios durante largos períodos de tiempo, o evolucionar a cáncer a una tasa del 5%. Otras lesiones con potencialidad maligna que ocurren en la cavidad oral incluyen la eritroplasia y el liquen plano. Similar a la leucoplasia, la eritroplasia se define como una mancha roja ardiente que no puede ser caracterizada clínicamente o a nivel de anatomía patológica como cualquier otra lesión definible. El riesgo de transformación de la eritroplasia en cáncer es más elevado en comparación con otras lesiones premalignas en la cavidad oral y con frecuencia revela áreas de carcinoma *in situ* o displasia de alto grado. La tasa de progresión a cáncer invasor por éste tipo de lesión es alta, llegando al 50%. Por otro lado, el liquen plano es una enfermedad crónica oral inflamatoria que suele presentarse con placas blancas, ulceración o placas hiperqueratósicas gruesas. El riesgo de malignidad y transformación es sustancialmente menor en comparación con la leucoplasia y la eritroplasia, teniendo una tasa variable del 0,5% a 2% (Borutto y Szabo, 2014).

El cáncer oral está asociado con una severa morbilidad y menos del 50% de supervivencia a largo plazo a pesar de los avances en su tratamiento (cirugía, radiación, quimioterapia). Los principales factores responsables de esta supervivencia limitada son las metástasis a ganglio linfático regional y las recidivas (Tanaka y Ishigamori, 2011). En este contexto, la detección temprana y prevención del cáncer oral y lesiones potencialmente malignas resultan de gran relevancia clínica.

Las lesiones de la mucosa oral en pacientes con cáncer de cabeza y cuello causadas por los efectos de las terapias antineoplásicas clásicas (radio y quimioterapia) son una toxicidad común (Jensen y Peterson, 2014). Muchos pacientes con cáncer de cabeza y cuello son sometidos a altas dosis de radioterapia en grandes áreas incluyendo la cavidad oral, maxilar, mandíbula y glándulas salivales. Por lo tanto, las terapias antineoplásicas pueden asociarse a reacciones adversas. Estas reacciones pueden ser agudas (ocurren durante o en las semanas inmediatamente después del tratamiento) o crónicas (dentro de los lapsos de meses o años después de la radioterapia). La gravedad de las complicaciones orales agudas dependerá del grado de inclusión de estas estructuras en el volumen de tratamiento (Jahm y da Silva Freire, 2006).

Entre éstas reacciones adversas, se encuentra la mucositis, definida como un efecto colateral muy doloroso causado por una reacción inflamatoria de la mucosa oral (Jahm y da Silva Freire, 2006). La mucositis oral (MO) es una toxicidad universal de la terapia por quimio-radiación para el tratamiento de cáncer de la cavidad oral, orofaringe y laringe, cuya incidencia continúa en crecimiento. La mucositis oral aguda (MOA) ocurre en casi el 75% de estos pacientes y está entre los efectos secundarios más debilitantes y dolorosos relacionados con el tratamiento (Elting et al., 2007). La MOA se asocia con un mayor uso de opioides, pérdida de peso, dependencia de la alimentación e hidratación suplementaria, interrupciones en el tratamiento, visitas no planificadas o visitas a salas de emergencias y hospitalizaciones frecuentes que generan altos costos económicos (Kudrimoti et al., 2016). En los pacientes inmunosuprimidos, la infección secundaria de las lesiones de mucositis oral puede conducir a bacteriemia, fungemia y sepsis. Además, puede ocurrir una morbilidad significativa asociada con la mucositis, que dará lugar a reducciones de dosis, retrasos y/o interrupciones de los tratamientos antineoplásicos, que a su vez pueden afectar negativamente a la supervivencia del paciente (Jensen y Peterson, 2014).

Estudios recientes han indicado que los mecanismos fundamentales implicados en la patogénesis de la mucositis son mucho más complejos que el daño directo al epitelio solo. Se cree que los principios involucrados en el proceso de mucositis inducida por radiación y/o quimioterapia son similares. El siguiente modelo intenta explicar la complejidad de la patogénesis de la mucositis en 5 etapas (Fig. 2H):

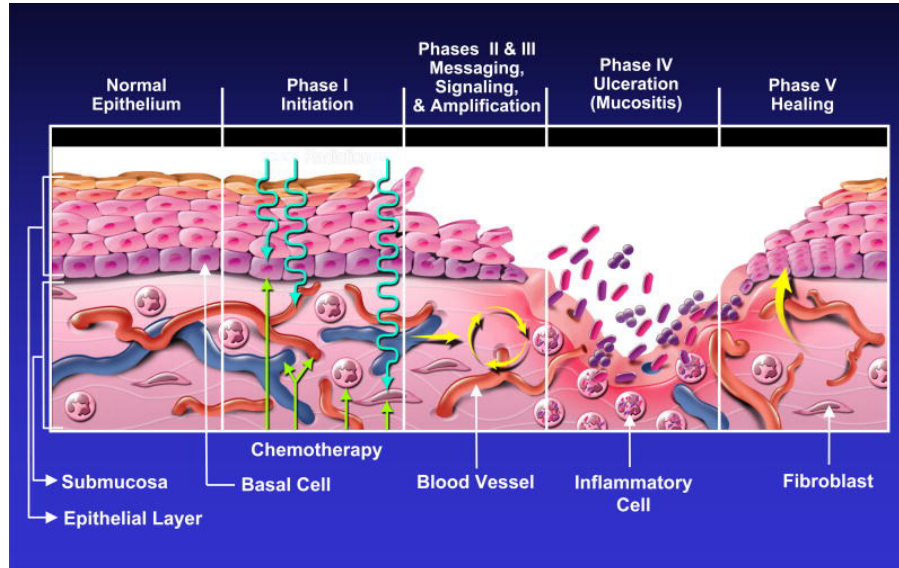


Fig. 2H Modelo patobiológico de cinco etapas de la mucositis oral (Lalla et al., 2008, tomado de Sonis, 2004).

Etapa 1. Iniciación de la lesión tisular: la radiación y/o quimioterapia inducen un daño celular que provoca la muerte de las células epiteliales basales. También se cree que la generación

de especies reactivas de oxígeno (ROS) por radiación o quimioterapia ejercen un papel en el inicio de la lesión de la mucosa. Estas pequeñas moléculas altamente reactivas son subproductos del metabolismo del oxígeno y pueden causar daño celular significativo.

Etapa 2. Aumento de la inflamación mediante la generación de señales provenientes de mensajeros: además de causar la muerte celular directa, los radicales libres activan a moléculas de segundos mensajeros que transmiten señales de los receptores en la superficie celular al interior de la célula. Esto conduce a la regulación positiva de citoquinas pro-inflamatorias, lesión de tejido y muerte celular.

Etapa 3. Señalización y amplificación: la regulación de las citoquinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), producido principalmente por los macrófagos, causa lesiones a las células de la mucosa y también activa vías moleculares que amplifican la lesión de la mucosa.

Etapa 4. Ulceración e inflamación: existe un infiltrado de células inflamatorias significativo asociado con las ulceraciones de la mucosa, basado en parte en subproductos metabólicos de la colonización de la microflora oral. La producción de citoquinas pro-inflamatorias también se encuentra sobre regulada debido a esta infección secundaria.

Etapa 5. Curación: esta fase se caracteriza por la proliferación epitelial, así como también por la diferenciación celular y tisular, restaurando la integridad del epitelio.

A lo largo del tiempo se han utilizado una gran variedad de escalas para registrar la extensión y severidad de la mucositis oral en la práctica clínica y la investigación. La clasificación de la mucositis más utilizada en investigación es la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) con una escala que combina el aspecto clínico de la mucosa con la capacidad de ingerir alimentos. (Tabla 2H). En cuanto a la clínica, la más utilizada es la escala que forma parte del manual “Common Toxicity Criteria for Adverse Events” del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Esta clasificación enfatiza los síntomas del paciente, la capacidad de mantener la ingesta oral y la necesidad de implementar terapias (Ruiz Esquide et al., 2011).

Grado de mucositis	Descripción
0	Ausencia de Mucositis
1	Eritema y dolor, sin úlceras
2	Eritema y ulceración: pacientes que pueden comer sólidos
3	Eritema y ulceración: pacientes que requieren dieta líquida
4	Eritema y ulceración: pacientes incapaces de alimentarse

Tabla 2H. Escala de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la clasificación de la mucositis oral en pacientes.

Con el objetivo de estudiar los mecanismos de la mucositis inducida por radiación en la bolsa de la mejilla del hámster sin cancerizar, Sonis y colaboradores (2000) publicaron una escala de mucositis que comprende cinco grados:

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

Grado 1= Eritema, sin evidencia de erosión mucosa.

Grado 2= Eritema severo, vasodilatación y erosión superficial.

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

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

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

En base a esta clasificación para evaluar la mucositis en la bolsa del hámster y la clasificación utilizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para mucositis oral en humanos, nuestro grupo determinó una escala semi-cuantitativa para la evaluación de la severidad de mucositis en el tejido precanceroso alrededor del tumor en la bolsa de la mejilla del hámster en nuestros estudios de BNCT (Monti Hughes et al., 2011). Esta escala comprende los siguientes grados:

Grado 0: apariencia normal, sin erosión ni vasodilatación.

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

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

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

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

Grado 5: eritema y/o edema severo, vasodilatación, formación de úlceras de ≥ 4 mm y/o áreas de necrosis ≥ 4 mm en diámetro.

2.3.2 Antecedentes de estudios experimentales, pre-clínicos y clínicos de biodistribución de boro y eficacia terapéutica de BNCT para cáncer oral

A nivel experimental podemos comenzar citando algunos estudios realizados sobre la mucosa oral sana en lengua de ratas. En el año 1999, Coderre y colaboradores, evaluaron los efectos de BNCT sobre la mucosa oral sana en lengua, utilizando ratas Fischer 344. Estos estudios estaban orientados a analizar potenciales efectos tóxicos asociados al tratamiento de tumores de cerebro en los cuales el cerebro y la mucosa oral podrían limitar la dosis que se puede administrar a tumor. Los estudios de biodistribución con BPA ip a una dosis de 36,2 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ con mediciones

de concentración de boro realizadas con las técnicas de prompt gamma o ICP-OES, arrojaron valores de [B] en lengua, paladar y mucosa oral de alrededor 22 ppm. Una respuesta llamativa luego de la irradiación con una dosis de $4,2 \pm 0,1$ Gy realizada 3 hs después de la administración del compuesto borado, fueron cambios en los pesos corporales de los animales que se consideraron indicadores del daño por radiación en lengua y cavidad oral. Las reacciones agudas se evidenciaron 6 días después de la irradiación, caracterizadas por eritema, edema y ulceración. Estos estudios destacaron la importancia de la alta sensibilidad de la mucosa oral a la radiación. La mucosa oral podría ser un tejido limitante de dosis, también en ensayos clínicos para el tratamiento con BNCT/BPA de cánceres de cabeza y cuello.

En éste mismo modelo, Morris y colaboradores (2000) realizaron, entre otros estudios, ensayos de microlocalización de boro post administración de BSH ($30 \text{ mg}^{10}\text{B/Kg}$) ip ó BPA ($36,2 \text{ mg}^{10}\text{B/Kg}$) ip, mediante la técnica de microscopía iónica. Ellos observaron en la mucosa oral que existían diferencias de [B] en las distintas estructuras histológicas de las muestras. Para ambos compuestos borados la lámina propia de la mucosa fue la de mayor concentración de boro, con respecto al epitelio, músculo y paredes de vasos sanguíneos. Además, notaron que particularmente con BPA los valores de concentración de boro en el epitelio, músculo y paredes de vasos sanguíneos fueron más elevados que con la administración de BSH. Cuando realizaron estudios de CBE, en éstas mismas condiciones, comprobaron que la mucosa de la lengua de las ratas era menos sensible a BNCT mediado por BSH que a BNCT mediado por BPA. Esta diferencia fue atribuida al perfil de microdistribución de ^{10}B estudiado previamente.

Los primeros esfuerzos en nuestro laboratorio estuvieron dirigidos a explorar una nueva potencial aplicación de BNCT: el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello. Para ello, utilizamos el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster. Nuestro laboratorio propuso y validó, por primera vez, el uso de éste modelo para estudios de BNCT (Kreimann et al., 2001a), siendo los mismos los precursores de los ensayos clínicos de BNCT para tumores de cabeza y cuello en Japón (Ej., Kato et al., 2004; Suzuki et al., 2014; Liu et al., 2015; Wang et al., 2016) y en Finlandia (Kankaanranta et al., 2007, 2012; Haapaniemi et al., 2016).

Para evaluar, por primera vez, el potencial uso de BNCT en el control de tumores de la mucosa oral en la bolsa de la mejilla del hámster, se empleó BPA como compuesto borado, aceptado para su uso en la clínica para melanoma y tumores de cerebro. Se realizaron estudios de biodistribución inyectando 300, 600 y 1200 mg BPA/kg ($15,5 \text{ mg}^{10}\text{B/Kg}$, $31 \text{ mg}^{10}\text{B/Kg}$ y $62 \text{ mg}^{10}\text{B/Kg}$, respectivamente) obteniéndose valores de concentración de boro en tumor terapéuticamente útiles ($[\text{B}] \geq 20 \text{ ppm}$) y relaciones de concentración de boro tumor/bolsa normal (T/BN) y tumor/sangre (T/S) favorables (≥ 1), 3,5 hs post administración del compuesto borado (Kreimann et al., 2001a).

Seguidamente, evaluamos la respuesta a BNCT de los tumores en la bolsa de la mejilla del hámster, mediante la administración de BPA 300 y 600 mg BPA/kg ip. En base al trabajo anterior de biodistribución (Kreimann et al., 2001a), se consideró una concentración de boro de 30 ppm en tumor y de 10 ppm en tejido normal para realizar los cálculos dosimétricos necesarios para BNCT.

Los animales fueron irradiados a las 3,5hs post administración del BPA con un haz de neutrones epitérmico termalizado en el reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche (CAB). Los resultados de control tumoral evidenciaron un 78% de remisiones completas y un 13% adicional de remisiones parciales, sin presencia de daños significativos a los tejidos normales (Kreimann et al., 2001b).

Luego, en el año 2003, se realizaron ensayos de biodistribución con un compuesto borado alternativo, una porfirina denominada CuTCPH, la cual poseía 48 átomos de boro por mol (Kreimann et al., 2003). Este compuesto fue administrado intraperitonealmente en una única dosis o en protocolo multidosis. Con el protocolo de administración simple se obtuvieron valores favorables de [B] tumoral (\cong 21 ppm), 24 hs post administración de la porfirina borada, con relaciones de concentración de boro T/BN y T/S de 7,6 y 2,4, respectivamente. En cambio, en el caso del protocolo multidosis en todos los tiempos ensayados post administración (1,2,3 y 4 días) las concentraciones de boro en el tumor se encontraron dentro del rango 50-76 ppm, obteniéndose relaciones de concentración de boro T/BN (6 a 12) y T/S (1,4 a 235), las cuales excedían los requerimientos para lograr tratamientos exitosos con BNCT.

Continuando los estudios de biodistribución y eficacia terapéutica de BNCT con compuestos aprobados para su uso en la clínica, decidimos en el año 2004 realizar estudios de cinética de biodistribución con GB-10 en el modelo de cáncer oral en hamsters (Heber et al., 2004). En éstos ensayos se administró por vía intrayugular en bolo GB-10 a una dosis de 50 mg¹⁰B/kg, observándose que a las 3 hs post-administración del compuesto, se obtenían concentraciones absolutas de boro en tumor favorables y relaciones de concentración de boro T/BN y T/S de 1,5 y 1,0, respectivamente. Dado que el valor de T/BN de éste protocolo, indicaba una mayor tasa de eliminación del compuesto del tejido normal versus el tumor, decidimos estudiar protocolos multidosis, administrando una segunda dosis de GB-10 (50 mg¹⁰B/kg), 3 hs post la primera administración y recolectando las muestras 1 ó 2 hs postsegunda administración del compuesto borado. Los resultados con ésta estrategia de protocolo multidosis no fueron relevantes con respecto al aumento de la selectividad de incorporación a tumor, ya que los valores de concentración de boro T/BN estuvieron en el intervalo de 0,9-1,0. Luego, en éste mismo trabajo, siguiendo el objetivo de aumentar la selectividad de la incorporación de boro a tumor y sabiendo que existen diferentes mecanismos de incorporación a las células de los compuestos borados (transporte activo, difusión, etc.), se llevaron a cabo estudios de biodistribución combinando GB-10 y BPA, con diferentes protocolos, variando las formas de administración (iv en bolo, ip como simil-infusión) y las concentraciones de ambos compuestos (15,5 mg ¹⁰B/Kg – 65,5mg ¹⁰B/Kg). Como resultado, se observó que aumentaba la concentración de boro en el tumor y se conseguían relaciones de concentración de boro T/BN y T/S de 2,0 y 2,5 respectivamente, cuando se empleaba uno de los protocolos combinados de GB-10 + BPA.

En base a los resultados de los estudios de biodistribución con GB-10 y/o BPA (Kreimann et al., 2001 a; Heber et al., 2004), se evaluaron las respuestas tumorales y la potencial toxicidad de BNCT *in vivo* en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, irradiando en el Reactor RA-6 del Centro Atómico Bariloche (CAB). En ese trabajo se demostró un importante control tumoral, obteniéndose, para los distintos protocolos, altos porcentajes de remisiones

completas y parciales. Además de los resultados de control tumoral, se pudo destacar un aspecto interesante en relación al análisis histológico de los de tumores tratados con BNCT mediado por GB-10, los cuales revelaron un marcado daño en el estroma tumoral (edema, hemorragias), resultado de la rotura de los vasos sanguíneos tumorales aberrantes. Sin embargo, éste daño no se observó en los vasos sanguíneos del tejido precanceroso ni el tejido normal. En el caso de la combinación de compuestos borados (BPA+GB-10) el efecto del daño en las paredes de los vasos tumorales fue menor, comparado con BNCT/GB-10, pero se observó mayor daño en las células tumorales (Trivillin et al., 2004).

En base a los trabajos descriptos, y dada la importancia del “targeting” homogéneo en las distintas poblaciones celulares de los tumores para lograr el éxito terapéutico en BNCT (debido a que se conoce que si los grupos de células tumorales contienen cantidades insuficientes de boro, éstas serán refractarias al tratamiento y podrían ser una potencial causa de recurrencia) se evaluaron potenciales diferencias de homogeneidad en la distribución de boro con tres de los protocolos establecidos y descriptos anteriormente con GB-10 y BPA+GB-10 (Heber et al., 2006). En éste trabajo se demostró que la administración combinada de GB-10 y BPA mejora significativamente la homogeneidad en la distribución de boro en tumor (Heber et al., 2006). Asimismo, se evaluó la respuesta tumoral a BNCT mediado por cada uno de estos protocolos, empleando dosis más altas de radiación en el RA-6 (aproximadamente 50% mayor) (Trivillin et al., 2006) comparadas con el trabajo anterior (Trivillin et al., 2004), ya que no se habían observado efectos radiotóxicos importantes en el tejido limitante de dosis (tejido precanceroso). En ésta ocasión, se demostró que BNCT mediado por la combinación de compuestos borados indujo un 93% de control tumoral (remisión completa + remisión parcial), frente al protocolo mediado por GB-10 que indujo un 70% de control tumoral. El único efecto radiotóxico que se observó, y que resulta importante destacar, fue una mucositis reversible en tejido precanceroso en los tres protocolos ensayados. En cambio, no se observaron efectos radiotóxicos en mucosa normal.

Estos dos trabajos (Trivillin et al., 2004, 2006) describen un nuevo paradigma en BNCT. La hipótesis clásica de BNCT plantea que el daño selectivo en las células tumorales se basa en la acumulación selectiva de boro dentro de las mismas. Nosotros pudimos demostrar, en base a estudios histológicos, que existiría un efecto selectivo de BNCT/GB-10 sobre los vasos sanguíneos aberrantes del tumor, preservando los vasos sanguíneos de los tejidos precanceroso y normal, a pesar que se sabe que el GB-10 no posee una incorporación selectiva a tumor. El efecto selectivo sobre los vasos sanguíneos angiogénicos del tumor se debería a su mayor radiosensibilidad, dada por su estructura y función alteradas (Carmeliet y Jain, 2000), y redundaría en un daño selectivo al tumor, a pesar que el compuesto borado GB-10 no se acumula selectivamente en tumores de la mucosa oral (Trivillin et al., 2006).

En el año 2004, Kato y colaboradores demostraron en estudios de biodistribución con BPA ó BSH, en el modelo de carcinoma de células escamosas (SSC) en ratones nude, que el BPA se incorporaba más selectivamente a SCC oral humano en comparación con los tejidos orales normales, y que tanto el BPA extracelular como el intracelular contribuían al efecto de destrucción celular mediante BNCT. Por lo tanto el BPA podría ser un útil portador de boro para BNCT en el

tratamiento de SCC oral avanzado. Estos datos coincidían con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio en el modelo de cáncer oral en la bolsa del hámster (Kreimann et al., 2001a,b).

Dado que la mucositis es limitante de dosis en BNCT para tumores de cabeza y cuello (ej. Kankaanranta et al., 2012), los protocolos de BNCT que minimicen la mucositis y optimicen el control tumoral tendrán mayor probabilidad de entregar dosis terapéuticas al tumor sin exceder la tolerancia del resto de los tejidos. En este sentido, propusimos BNCT secuencial, es decir, una aplicación de BNCT/BPA seguido de una aplicación de BNCT/GB-10, con un intervalo de 24 hs ó 48 hs (Molinari et al., 2011). Demostramos que esta estrategia aumenta el control tumoral sin exacerbar la mucositis. Este trabajo generó importantes aportes sobre el rol del “re-targeting” de células que podrían haber sido refractarias en la primera aplicación y de la homogeneidad en el “targeting” de boro en la respuesta terapéutica.

Se sabe que la vasculatura aberrante de los tumores (ej. Jain 2005) compromete la llegada de drogas. En este contexto nosotros propusimos la técnica de normalización temporaria de vasos sanguíneos tumorales previo a BNCT para optimizar la llegada y distribución de los compuestos borados a tumor. Para ello desarrollamos una técnica de normalización de vasos sanguíneos aberrantes en el modelo de cáncer oral de hámster con la administración de Talidomida (Molinari et al., 2012) y demostramos su marcado efecto en la eficacia terapéutica de BNCT mediado por BPA en este modelo (Molinari et al., 2012, Molinari et al., 2015). Esta estrategia terapéutica tiene un gran potencial que ameritaría su estudio en un escenario clínico.

En forma paralela, nos interesó estudiar el potencial efecto inhibitorio de BNCT en el desarrollo de segundos tumores primarios a partir de tejido precanceroso. Empleando el modelo clásico de carcinogénesis en la bolsa de la mejilla del hámster, pudimos demostrar un efecto inhibitorio a corto plazo sin exceder la radiotolerancia del tejido precanceroso y sin radiotoxicidad en el tejido normal (Heber et al., 2007). El modelo de carcinogénesis empleado se adecúa a estudios de control tumoral pero no permite el estudio a largo plazo del tejido precanceroso. Por ello, se vio la necesidad de desarrollar un modelo de tejido precanceroso (más recientemente llamado tejido con alteraciones potencialmente malignas ó PMD por sus siglas en inglés) en la bolsa de la mejilla del hámster que permitiera un seguimiento a largo plazo. Para ello se evaluaron diferentes protocolos de carcinogénesis y se seleccionó el que garantizara el desarrollo de tumores pero que por su menor agresividad permitiera seguir a los animales durante 8 meses post-BNCT (Heber et al., 2010). Empleando este modelo experimental de tejido precanceroso, se demostró el potencial inhibitorio de una única aplicación de BNCT mediada por BPA y BPA + GB-10 en el desarrollo de tumores a partir de tejido precanceroso a largo plazo, sin radiotoxicidad en el tejido normal y sin exceder la radiotolerancia del tejido precanceroso (Monti Hughes et al., 2009). Más recientemente se estudiaron diferentes aspectos radiobiológicos de protocolos de doble administración de BNCT (Monti Hughes et al., 2011; Monti Hughes et al., 2013) y se verificó la posibilidad de reducir la mucositis en el tejido precanceroso limitante de dosis (Monti Hughes et al., 2015a), un aspecto de gran relevancia clínica (Kankaanranta et al., 2012). Asimismo, contribuimos al conocimiento de la radiobiología de BNCT en el modelo de precáncer oral en

hámster diseñado para estudios en tejido con cancerización de campo (Monti Hughes et al., 2015b).

Extendimos nuestros estudios a un ámbito preclínico y estudiamos la factibilidad de BNCT/BPA para tratar tumores espontáneos de células escamosas (SCC) en felinos domésticos (Rao et al., 2004; Trivillin et al., 2008). Estos tumores espontáneos son de particular interés ya que son de la misma estirpe que los inducidos en forma experimental en la bolsa de la mejilla del hámster. Las irradiaciones con neutrones a baja dosis se realizaron en el Reactor Nuclear RA-1 (Centro Atómico Constituyentes) que no permite blindar el cuerpo del animal (Rao et al., 2004) y las irradiaciones amayores dosis se realizaron en el Reactor Nuclear RA-6 (Centro Atómico Bariloche) en el cual sí se puede blindar el cuerpo del animal (Trivillin et al., 2008). Debido a la salida de operación del RA-6, por modificaciones técnicas y cambio de combustible, después del estudio de Trivillin y colaboradores (2008) no fue posible continuar los estudios en felinos. El RA-6 en su nueva configuración pudo ser empleado a fines de 2014 para estudios experimentales y fue re-licenciado en junio del corriente año para ensayos clínicos. Al año siguiente, en el 2015, se re iniciaron los estudios pre-clínicos, pero ésta vez en pacientes caninos domésticos con tumores espontáneos de cabeza y cuello, utilizando BPA con 2 irradiaciones fraccionadas con un intervalo de 21 días. Hasta la actualidad, hemos tratado dos perros con SCC nasal con resultados muy alentadores. Estos estudios continúan con el objetivo de ampliar los conocimientos de la radiobiología de BNCT de cáncer de cabeza y cuello con vistas a estudiar la factibilidad de encarar ensayos clínicos en humanos en un futuro.

A nivel clínico, en el año 2004, Kato y colaboradores trataron con BNCT a los primeros 6 pacientes con cáncer de cabeza y cuello en el mundo, los cuales fueron casos de recidivas luego de los tratamientos estándar. Todos los pacientes recibieron una combinación de BSH y BPA como agentesborados, y fueron irradiados en el reactor KURR, de la Universidad de Kyoto, 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 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 et al., 2010).

Entre 2003 y 2007, 20 pacientes más fueron tratados por otro grupo de investigadores en Japón. Tres de ellos tenían 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 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 probabilidad 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 supervivencia luego del tratamiento (Aihara et al., 2010).

En el año 2009, se llevaron a cabo estudios de biodistribución con BPA y BSH en pacientes con diferentes tumores sólidos, dentro del marco del ensayo clínico 11001, realizado en Alemania. (Wittig et al., 2009). En este trabajo se demostró que para 3 pacientes con cáncer de cabeza y cuello (SCC en boca, senos nasales y amígdalas), el BPA se acumulaba en los tumores en proporciones de 4:1 con respecto a la sangre. En cambio, con BSH ésta proporción era 1:1. En el caso de la piel y la mucosa los valores de concentración de boro, para ambos compuestos, eran relevantes y por lo tanto podrían implicar riesgo de radiotoxicidad.

También en el año 2009, Kimura y colaboradores reportaron el éxito terapéutico de BNCT en 6 casos de cáncer oral recurrente y metástasis en nódulos linfáticos cervicales. A pesar que BNCT no proporcionó una cura completa, aumentó la calidad de vida de los pacientes sin causar efectos adversos severos (Kimura 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 empeora aún más la calidad de vida cuando se le suma el dolor. Este grupo japonés observó además que BNCT no sólo es efectivo en reducir el volumen tumoral, sino también en controlar el dolor y disminuir los sangrados, contribuyendo a un aumento en la calidad de vida del paciente (Kimura et al., 2009a). También éste mismo grupo, reportó 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 et al., 2009b).

En el año 2014, los pacientes tratados por el grupo de Suzuki y colaboradores con BNCT entre el 2001 y el 2007 en el centro KURRI (Kyoto University Research Reactor Institute) de Japón, fueron evaluados para conocer la existencia de recurrencias o nuevos tumores. De los 87 pacientes con diversos tumores de cáncer de cabeza y cuello, 62 poseían recurrencias (79%) y 13 sufrían de la presencia de nuevos tumores (21%). Del total de éstos pacientes, el 50% presentaba carcinomas de células escamosas. A los 62 pacientes, se les volvió a realizar BNCT, con BPA o BSH, con 2, 3 ó 5 fracciones de irradiaciones (dependiendo del caso) y se obtuvo un control tumoral (CT) de 58%. En particular, se observó que la mayor parte del control tumoral se lograba en los casos de recurrencias (CT= 61%) en comparación con los pacientes que presentaban tumores nuevos (CT=39%). Los autores concluyeron que se obtuvieron, para el caso de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, avanzado o recurrente, tratados con BNCT tasas de morbilidad y mortalidad aceptablemente bajas.

Desde 2003 y hasta la actualidad, se llevaron a cabo o se están llevando a cabo diversos protocolos clínicos de BNCT para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello con BPA en Finlandia, Japón y Taiwán, 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 tratamiento con BNCT y los efectos secundarios relacionados a la terapia fueron aceptables (Kankaanranta 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 perduraron, la progresión del cáncer es frecuente luego de BNCT (Kankaanranta et al., 2012). Leena Kankaanranta y colaboradores han reportado resultados superiores cuando se aplica BNCT como tratamiento de primera línea a tumores de cabeza y cuello (Kankaanranta et al., 2012). Recientemente, Haapaniemi y colaboradores (2016) reportaron tratamientos de BNCT/BPA en el reactor FiR1 de Finlandia, en 8 pacientes con SCC de laringe recurrente ó con diagnóstico reciente de cáncer laríngeo. Algunos de ellos recibieron un solo tratamiento de BNCT y 3 pacientes recibieron dos tratamientos. Se observó un control tumoral (CT) en 6 de los 8 pacientes (CT=75%) de los cuales 2 correspondían a remisiones completas (25%) y 4 a remisiones parciales (50 %). Los efectos secundarios más comunes fueron estomatitis, fatiga y dolor en la cavidad oral, pero en ninguna oportunidad se observó radiotoxicidad potencialmente mortal o grado 4.

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. Para la estimación de la relación de concentración de boro Tumor/Tejido normal, utilizaron la técnica de ¹⁸F-BPA/PET. Cada paciente recibió dos irradiaciones con un intervalo de 30 días. Los resultados fueron muy satisfactorios, obteniéndose 30% de remisiones completas y 40% de remisiones parciales (Wang et al., 2011).

Por último, podemos mencionar los ensayos clínicos de Wang y colaboradores (2016) realizados en Taiwán. El grupo de trabajo de Wang realizó tratamientos de BNCT/BPA fraccionados en 2 aplicaciones, con intervalo de 28 días, en 17 pacientes diagnosticados entre los años 2010-2013, con distintos tumores de cabeza y cuello con diferentes histologías, luego de recibir radiación convencional. En 14 de ellos, se realizó un segundo tratamiento con BNCT. Los resultados mostraron que hubo 35 % de remisiones completas. En cuanto a la radiotoxicidad, la incidencia de mucositis fue similar a la observada en radioterapia (29%), pero en ninguno de los casos se alcanzaron toxicidades agudas grado 4.

2.3.3 Modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster

Es claro que ningún modelo animal reproduce exactamente las características del cáncer humano. Así y todo, existe consenso en que recurrir a los modelos animales es el prelude inevitable para entender el desarrollo de las neoplasias y ensayar la eficacia de los nuevos enfoques terapéuticos.

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

inducidos por carcinógenos resulta necesario dado que los agentes químicos parecen ser el factor etiológico dominante en varias áreas de la cabeza y cuello incluyendo la cavidad oral (Vairaktaris et al., 2008).

Uno de los mejores modelos caracterizado y aceptado mundialmente para el estudio del carcinoma oral de células escamosas, es el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster sirio dorado (*Mesocricetus auratus*), dado que recapitula los eventos secuenciales principales involucrados en el desarrollo del cáncer y precancer oral humano (Vairaktaris et al., 2008; Chen y Lin, 2010).

Anatómicamente, las bolsas bilaterales (una de cada lado de la boca) se encuentran debajo de los músculos de la mejilla, abiertas hacia el interior de la boca, extendiéndose hacia atrás de la cavidad oral, no más atrás de la faringe. Histológicamente, están compuestas por una capa de células escamosas delgada (3-4 capas) con una leve queratinización, un tejido conectivo subyacente y capa muscular. La bolsa de la mejilla del hámster es anatómicamente similar a un "bolsillo" en el espesor de cada mejilla. Resulta de fácil acceso, permitiendo así su topicación con diferentes sustancias tales como los carcinógenos químicos, sin necesidad de anestesiarse el animal. Asimismo, las bolsas pueden ser evertidas y extendidas fácilmente para ser irradiadas localmente y realizar el seguimiento macroscópico del comportamiento de los tejidos. A su vez, se pueden correlacionar los parámetros macroscópicos de evaluación con estudios histopatológicos de tomas de biopsias o de muestras de tejido obtenidas luego del sacrificio del animal.

La cancerización en la bolsa de la mejilla del hámster generalmente se lleva a cabo por múltiples aplicaciones semanales de DMBA al 0,5% en aceite mineral. Mediante esta modalidad se utiliza al DMBA como carcinógeno 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 y Gimenez Conti, 1992). Este modo de carcinogénesis, provee un modelo de tumores rodeado por tejido con alteraciones potencialmente malignas o tejido precanceroso, permitiendo el estudio de efectos terapéuticos y tóxicos en el mismo.

Las mayores ventajas de este modelo son la similitud que existe entre la mucosa oral de la bolsa del hámster y la mucosa oral humana queratinizada, la ausencia de tumores espontáneos, la susceptibilidad a productos de síntesis tales como las hormonas, micronutrientes, entre otros (Vairaktaris et al., 2008). A su vez, permite el estudio del tejido con lesiones potencialmente malignas alrededor del tumor (tejido precanceroso), tejido con alta relevancia clínica dado el fenómeno de la cancerización de campo, a diferencia de aquellos modelos de implantación de células malignas en tejido normal (Trivillin et al., 2006; Monti Hughes et al., 2011). La localización de los tumores que se desarrollan en la bolsa correlaciona con la de los fumadores de tabaco, así como también con el lugar donde la nuez de betel se mantiene por horas prolongadas (Nagini et al., 2009). A nivel molecular, el carcinoma oral de células escamosas en humanos y en hamsters también se correlacionan, caracterizándose por un aumento en la proliferación celular y reducción en la apoptosis (Nagini et al., 2009).

En cuanto a las desventajas del modelo, resulta importante destacar la necesidad de labor intensiva y extensa respecto al manejo del animal y el carcinógeno. De acuerdo con el protocolo experimental estándar, el animal necesita recibir el tratamiento con DMBA varias veces, al menos 36 a 42 veces, para inducir el desarrollo tumoral (Monti Hughes et al., 2013). Este tratamiento con el carcinógeno podría causar desórdenes hepáticos como el aumento en la oxidación de lípidos y proteínas, asociado a deficiencias en los mecanismos de defensa antioxidante, contribuyendo al desmejoramiento del animal (Letchoumy et al., 2006). Además, las alteraciones cromosómicas de los carcinomas de la bolsa de la mejilla del hámster aparentan ser diferentes a las de los carcinomas de células escamosas de la mucosa oral humana. Por último, la mayoría de los investigadores concuerdan que los carcinomas inducidos en el modelo de cáncer de la bolsa de la mejilla del hámster usualmente no producen metástasis en los ganglios linfáticos cervicales, y las metástasis lejanas aún son más improbables, no resultando útil para el estudio de metástasis locoregionales o distantes (Chen y Lin, 2010).

Si bien el modelo animal ideal sería aquél en el que el cáncer ocurre espontáneamente, los carcinomas de células escamosas orales espontáneos son muy poco frecuentes en animales domésticos y de laboratorio (Chen y Lin, 2010). Por esta razón, la inducción artificial es esencial para la investigación del cáncer oral.

2.3.4 Electroporación/Electroquimioterapia

Dado que una de las estrategias evaluadas en ésta tesis para contribuir a la optimización de la incorporación de B a las células tumorales en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster es la Electroporación (EP), a continuación se realizará una breve reseña de los principios, aplicaciones y ensayos previos de ésta técnica de origen físico.

La electroporación reversible o simplemente electroporación (EP) consiste en la permeabilización temporaria de la membrana celular a través de la formación de poros de apenas unos nanómetros de diámetro. Estos poros, o defectos temporarios de la membrana, se forman tras la aplicación de pulsos eléctricos muy cortos, del orden de los microsegundos de duración, administrados a través de los electrodos de electroporación colocados alrededor del tejido a tratar (Cemažar y Kotnik, 2012).

La EP se ha convertido en una técnica muy importante en medicina molecular. Se utiliza para introducir al citosol macromoléculas como genes (Gene Electrotransfer - GET) o agentes antineoplásicos (Electroquimioterapia - ECT) que normalmente no son capaces de atravesar la membrana celular. La aplicación de pulsos eléctricos sobre el tejido a tratar genera un campo eléctrico de intensidad variable. Dependiendo del tipo de tratamiento basado en electroporación que quiera realizarse, las características de estos pulsos variarán desde lograr la permeabilización hasta la ruptura de la membrana celular (Fig. 3H). El denominador común es que el tejido debe quedar completamente cubierto por un campo eléctrico suficiente para lograr la permeabilización de la membrana celular. Si el número de pulsos es suficiente (entre 80 y 100) la membrana celular no puede volver a cerrarse por lo que se produce una destrucción del tejido

tratado. Este procedimiento se llama electroporación irreversible (Irreversible Electroporation – IRE).

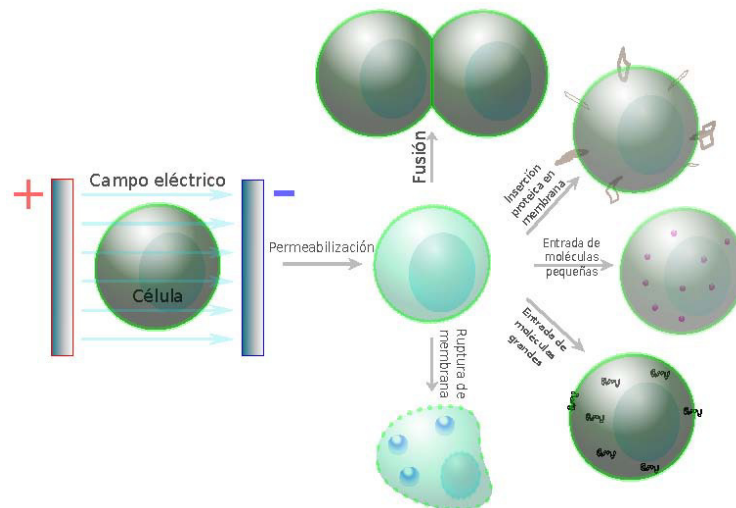


Fig. 3H Representación de diferentes grados de permeabilización de la membrana celular luego de la aplicación de un campo eléctrico, el cual puede generar la fusión celular, la inserción de proteínas en una membrana, la entrada de moléculas pequeñas y/o grandes y hasta la ruptura de la membrana celular.

Dentro de los tratamientos basados en electroporación reversible podemos destacar la Electroquimioterapia (ECT). La ECT es especialmente efectiva con la utilización de ciertas drogas antitumorales que tienen una elevada citotoxicidad intrínseca pero reducida permeabilidad a través de la membrana plasmática, como es el caso de la bleomicina (Mir, 2006) o el cisplatino (Serza et al., 2000). La ECT se utiliza para favorecer la penetración de una droga citotóxica al interior de una célula tumoral y así tratar de solucionar uno de los problemas de transporte de drogas que sufre este tipo de tratamiento.

La ECT fue validada para su uso en ensayos clínicos en seres humanos desde el año 2006, y desde entonces se ha convertido en una práctica habitual en la Comunidad Europea. En la actualidad, la ECT se utiliza clínicamente como terapia paliativa o citorrreductora de nódulos tumorales cutáneos y subcutáneos de diferentes tipos de tumores benignos o malignos (Marty et al., 2006; Campana et al., 2009). También la ECT se ha comenzado a utilizar para el tratamiento de melanomas (Gimbel et al., 2008), cáncer de mama (Azavedo et al., 1991), y cáncer de cabeza y cuello (Mevio et al., 2012; Domanico et al., 2015). En particular, para carcinoma de células escamosas (SCC) se han realizado ensayos pre-clínicos en gatos con EP+Bleomicina (ej. Tozon et al., 2014, 2016) y ensayos clínicos en pacientes con EP+ radioquimioterapia (ej. Domanico et al., 2015) con resultados alentadores.

Una ECT típica en seres humanos consiste en un tren de 8 pulsos cuadrados de gran amplitud (alrededor de 1000 V/cm) y de muy corta duración (alrededor de 100 μ s), entregados a una frecuencia de 1 Hz. El tratamiento se lleva a cabo del siguiente modo, en función del tipo, tamaño y número de nódulos a tratar: en primer lugar se administra el fármaco

antitumoral por vía intravenosa, peri o intratumoral. Luego se inserta el/los electrodo/s en el nódulo tumoral y se aplican los pulsos eléctricos. Finalmente, se repite esta secuencia sucesivamente en los distintos nódulos a tratar. El dispositivo que se utiliza en la aplicación de la ECT consta de una fuente de energía eléctrica (electroporador) conectada a un conjunto de electrodos o sondas, capaz de generar pulsos eléctricos cuadrados muy cortos y de muy alto potencial.

Dentro de las variables a considerar para el tratamiento por ECT podemos mencionar: ubicación y volumen del tumor, carga eléctrica a aplicar (intensidad de corriente y tiempo de aplicación), diseño de los electrodos (cantidad, forma, ubicación y disposición espacial), tipo de terapia (anódica, catódica o ambas), cantidad de aplicaciones y posible aplicación combinada con otras terapias.

El principal efecto biológico de la ECT es la permeabilización transiente de la célula tratada a través de la formación de poros transitorios en la membrana plasmática. Esto logra aumentar significativamente la entrada de la droga a la célula permitiendo que alcance en mayor concentración los sitios blanco intracelulares. Sin embargo, además de este efecto principal, esta técnica tiene efectos a nivel vascular e inmunológico que contribuyen a la eficacia del tratamiento (Sersa y Miklavcic, 2008; Mir y Orłowski, 1999).

La principal desventaja de la ECT es su incapacidad de ofrecer tratamiento a las metástasis, quedando constituido como un tratamiento local y paliativo. El tratamiento de tumores profundos mediante ECT constituye un desafío mundial y una carrera en la que se encuentran varios centros de investigación en el mundo.

A nivel experimental en el año 1994, Ceberg y colaboradores, basándose en investigaciones previas (ej. Salford et al., 1993) estudiaron la influencia de electropermeabilización *in vivo* sobre la incorporación de dos compuestos borados (BSH y BOPP, Porfirina borada) para BNCT en un modelo de glioma RG-2 en ratas Fisher 344. Los resultados revelaron un aumento significativo de 2 a 10 veces en la captación de boro en el tejido tumoral tratado con EP+BOPP o EP+BSH versus el tejido normal no tratado de ratas con gliomas. Concluyeron entonces que la electropermeabilización podría ofrecer una interesante posibilidad para aumentar la incorporación de ciertos compuestos borados en BNCT.

Posteriormente, se realizaron varios ensayos *in vitro*, utilizando diferentes cultivos celulares, combinando la EP seguida de la aplicación de BNCT, con resultados alentadores. El empleo de BSH o Acido Bórico (BA) en líneas celulares de tumor SCCVII (Carcinoma de células escamosas de ratón), B16F1 (melanoma de ratón) y MCF7 (carcinoma de células de mama humanas) permitieron observar un incremento de la efectividad de BNCT + EP, debido al aumento en la captación de B de las células que fueron electroporadas (Ono et al., 1998; Cemazar et al., 2000). En particular, el aumento inducido por EP de la eficacia terapéutica de BNCT mediada por BSH, se debería a la presencia de boro en el espacio intersticial del tejido tumoral y no dentro de las células tumorales (Ono et al., 2000).

A nivel *in vivo*, se realizaron estudios cinéticos de biodistribución de boro en ratones C57Bl/6 con tumores desarrollados a partir de la implantación de células de melanoma (B16F1) y en ratones C3H/He con carcinoma de células escamosas (SCCVII), utilizando BSH como agente portador de boro más EP (Cemazar et al., 2000; Ono et al., 2000). Los resultados mostraron una acumulación prolongada y selectiva del compuesto borado en el tumor y un mayor clearance en tumores electroporados versus los tumores no electroporados (Cemazar et al., 2000; Ono et al., 2000).

Por último, podemos citar el ensayo a nivel *ex vivo* realizado en ratones C3H/He portadores de tumores SCCVII, en el cual se evaluó el efecto letal sobre las células tumorales mediante el ensayo de formación de colonias, luego de que las mismas fueran extraídas de tumores irradiados, previamente tratados con BSH+EP. Las células de los tumores explantados e irradiados mostraron un aumento en la radiosensibilidad, probablemente debido al incremento en la concentración de boro de las células neoplásicas que fueron electroporadas (Ono et al., 2000).

A pesar de los ensayos de biodistribución y eficacia terapéutica de BNCT realizados con la combinación de EP y BNCT mediado por algún compuesto borado, al presente no existen estudios de radiotoxicidad y eficiencia de BNCT en modelos experimentales con seguimiento *in vivo*.

2.3.5 Objetivos particulares de ésta tesis referidos al modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster

Estudios previos realizados por nuestro laboratorio permitieron establecer valores de concentración de boro en tumor, sangre y tejidos normales potencialmente útiles para la aplicación de BNCT mediado por los compuestos borados borofenilalanina (BPA), decahidrodecaborato de sodio (GB-10) o la administración combinada de ambos BPA+GB-10 para el tratamiento de tumores de la bolsa de la mejilla del hámster con buena eficacia terapéutica, sin radiotoxicidad en el tejido normal y sin exceder la radiotolerancia del tejido precanceroso, limitante de dosis. Si bien los resultados en términos de eficacia terapéutica de estos protocolos fueron muy buenos, pueden ser optimizados. En éste contexto y dado que múltiples estudios han demostrado que la biodistribución de los compuestos borados en tumor, en cuanto a la concentración absoluta y relativa de ^{10}B , su retención, homogeneidad de targeting y microdistribución, condicionan la eficacia terapéutica de BNCT (ej. Hopewell et al., 2011), resulta de particular interés optimizar la biodistribución de compuestos borados. En particular, los estudios de biodistribución con compuestos borados autorizados para su uso en humanos acortarían la brecha entre la investigación y la potencial aplicación clínica de BNCT (ej. BSH, BPA y GB-10). Asimismo, la evaluación de compuestos borados desarrollados de última generación (ej. Liposomas borados) ó la combinación de estrategias de técnicas de orígenes diversos (ej. origen físico: electroporación) podrían contribuir a la optimización de BNCT para distintas patologías. Dentro de éste escenario, el primer objetivo del presente trabajo en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster fue realizar estudios de cinética de biodistribución con BSH (Borocaptato de sodio), liposomas MAC y liposomas MAC+TAC, como así también estudios de biodistribución con la

combinación de BSH+BPA y con GB-10 + electroporación, considerando diferentes estrategias para lograr una mayor relación de concentración de boro tumor/tejido normal y una mayor concentración absoluta de boro en tumor y de esa manera incrementar la eficacia terapéutica de BNCT.

El hecho de que mercapto undecahidro-closo-dodecaborato de sodio(BSH) está siendo investigando clínicamente como portador independiente de boro para el tratamiento con BNCT de tumores cerebrales (ej. Nakagawa et al., 2009) y en combinación con BPA para neoplasias recurrentes de cabeza y cuello (ej Kato et al., 2009) hace que sea un compuesto borado particularmente interesante para ser explorado en el modelo de cáncer oral en hamsters y de ésta manera contribuir a ampliar los conocimientos radiobiológicos de BNCT.

Por otro lado, realizamos por primera vez, estudios de biodistribución de boro en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster empleando los liposomas MAC y MAC+TAC como portadores de boro, buscando contribuir a la optimización de la incorporación de compuestos borados para BNCT.

Además, evaluamos si la técnica de electroporación puede actuar como un sistema de administración de fármacos no específico para mejorar la incorporación del compuesto borado GB-10 (aprobado para su uso en humanos) en carcinomas de células escamosas del modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster.

Aunque los antecedentes de ensayos clínicos de BNCT para cáncer de cabeza y cuello (ej Haapaniemi et al., 2016) muestran resultados terapéuticos alentadores, éstos siguen siendo sub-óptimos. En este marco y sobre la base de los conocimientos de radiobiología de BNCT obtenidos en nuestros estudios previos (ej. Trivillin et al., 2006; Molinari et al., 2012), en los estudios de otros grupos (ej. Kato et al., 2004; Ono et al., 1999; Barth et al., 2005) y en los estudios de biodistribución realizados en ésta tesis en el modelo de cáncer oral, realizamos estudios de BNCT *in vivo*. Por primera vez, en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, realizamos estudios radiobiológicos para evaluar el potencial efecto terapéutico y/o toxico de dos nuevos protocolos de BNCT empleando liposomas MAC+TAC y GB-10+electroporación, con seguimiento *in vivo*.

Materiales y Métodos

1. Desarrollo de nódulos hepáticos en el modelo experimental de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal en ratas BDIX

1.1 Cultivo de células DH/DK12/TRb

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

1.2 Método de inoculación sub-capsularde células DH/DK12/TRb en hígado de ratas

El modelo experimental de metástasis hepáticas utilizado fue una adaptación de Roveda et al. (2004). Se emplearon ratas BDIX (Charles River Lab., MA, EE.UU.) de ambos sexos, de 170 a 300 gr de peso corporal, mantenidas en jaulas individuales con alimento y agua a libre demanda, en una habitación con ciclos de luz-oscuridad de 12 hs.

Por medio de la técnica de laparotomía, se realizaron 3 inóculos en el hígado de las ratas bajo anestesia con ketamina (36,5 mg/kg pc) -xilacina (5,4 mg/kg pc). Las inoculaciones se efectuaron en distintos lóbulos hepáticos, para producir tres nódulos tumorales por animal: lóbulo lateral derecho, lóbulo medio y lóbulo lateral izquierdo (Fig.1 M&M).

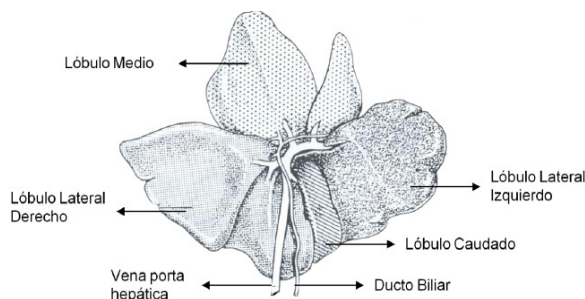


Fig.1 M&MVista de la superficie dorsal del hígado de una rata (Extraído de Waynforth y Flecknell, 1992).

Por cada uno de los inóculos subcapsulares se administraron 5×10^5 células singeneicas de cáncer de colon DHD/K12/TRb en 10 μ l de F10-DMEM. Para ello se introdujo una jeringa tipo Hamilton con aguja de 22-gauge previamente esterilizada en alcohol 70% v/v en agua destilada, penetrando cerca del extremo derecho del lóbulo, recorriendo superficialmente el parénquima hepático de derecha a izquierda aproximadamente un centímetro y llegando, con una localización lo más sub-capsular posible, al punto del implante. Con la aguja ubicada en la posición deseada, se procedió a descargar el volumen de células, observando en la superficie del hígado, donde se encontraba el extremo de la aguja, un nódulo pequeño de color claro del tamaño de una lenteja (Fig. 2M&M). Antes de retirar la aguja, se realizó presión con un hisopo de algodón en el borde del nódulo de células, justo en el final del recorrido de la aguja para evitar que las células se desplacen por el canal generado en la capsula hepática al ingresar la aguja. Manteniendo ésta presión se retiró lentamente la aguja y se ejerció presión con otro hisopo en el lugar donde se introdujo la aguja hasta contener el posible sangrado (aproximadamente entre 30 y 60 segundos).

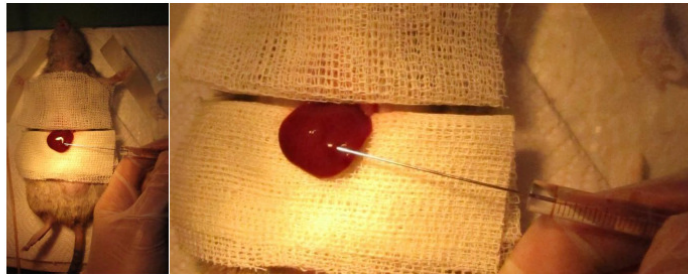


Fig. 2M&M Procedimiento de inoculación de células DH/DK12/TRb en el lóbulo lateral izquierdo del hígado de ratas BDIX. Con la aguja ubicada en la posición deseada, se procede a descargar el volumen de células.

Catorce días después de la inoculación de las células singeneicas, se desarrollaron en los tres lóbulos hepáticos nódulos únicos, visibles, superficiales y mensurables sin diseminación peritoneal ni pulmonar (Pozzi et al., 2009) (Fig.3M&M).



Fig. 3 M&M a. Imagen del lóbulo lateral izquierdo de una rata BDIX, 2 semanas luego de la inoculación sub-capsular de las células DH/DK12/TRb. En el centro del lóbulo se puede observar un único nódulo tumoral (círculo verde), ubicado superficialmente, que puede ser palpado. b: el mismo nódulo luego de ser disecado.

Una vez desarrollados los nódulos hepáticos, los animales se utilizaron para estudios de biodistribución con diferentes compuestos borados.

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo en estricto cumplimiento de “La Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” publicada por el “Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies” de Estados Unidos (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>). A partir de la creación del CICUAL de CNEA (Resolución 424/2011) y su subsiguiente reglamentación institucional durante el período 2011 a 2015, se obtuvo la Aprobación institucional de los protocolos experimentales empleados en esta tesis (Aprobación CICUAL-CNEA 01/2015).

2. Desarrollo de metástasis difusas pulmonares en el modelo experimental de metástasis pulmonar de cáncer colorrectal en ratas BDIX

2.1 Cultivo de células DH/DK12/TRb

El cultivo de las células DH/DK12/TRb se realizó como fue descrito anteriormente en el inciso 1.1 de Materiales y Métodos.

2.2 Método de inoculación intra-yugular de células DH/DK12/TRb para inducir metástasis difusas en pulmón en ratas BDIX

El modelo experimental de metástasis pulmonares utilizado fue una adaptación de Bortolussi et al. (2011). Se emplearon ratas BDIX (Charles River Lab., MA, EE.UU.) de ambos sexos, de 170 a 300 gr de peso corporal, mantenidas en jaulas de 2 ó 3 animales con alimento y agua a libre demanda, en una habitación con ciclos de luz-oscuridad de 12 hs.

Bajo anestesia con ketamina (36,5 mg/kg pc) –xilacina (5,4 mg/kg pc) y utilizando una aguja de calibre 27G x ½” se inyectaron en la vena yugular de las ratas 3×10^6 células DHD/K12/TRb en 0,5 ml de medio de cultivo F10-DMEM. La selección de ésta concentración de células garantiza el crecimiento aceptable, reproducible y controlado de las células tumorales para generar metástasis difusas en los lóbulos pulmonares de ratas (Trivillin et al., 2014). Cuatro semanas después de la inoculación de las células singeneicas, se obtuvo en todos los lóbulos pulmonares el desarrollo de metástasis difusas macroscópicamente visibles, preservando al mismo tiempo suficiente tejido pulmonar sano para su posterior evaluación (Fig. 4 M&M).



Fig. 4M&M. Procedimiento de inoculación de células DH/DK12/TRb en la vena yugular de ratas BDIX: a. Células DHD/K12/TRb en cultivo; b. Con la aguja ubicada en la posición deseada, se procede a descargar el volumen de células; c. Imagen de los lóbulos pulmonares de una rata BDIX, 4 semanas luego de la inoculación intra-yugular de las células DH/DK12/TRb. Se puede observar las metástasis difusas macroscópicas (color amarillo-blanquecino) en los lóbulos fijados en solución de Bouin y las zonas de tejido pulmonar sano (color ocre).

Una vez que se desarrollaron las metástasis difusas pulmonares, los animales se utilizaron para estudios de biodistribución con diferentes compuestos borados.

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo en estricto cumplimiento de “La Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” publicada por el “Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies” de Estados Unidos (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>). A partir de la creación del CICUAL de CNEA (Resolución 424/2011) y su subsiguiente reglamentación institucional durante el período 2011 a 2015, se obtuvo la Aprobación institucional de los protocolos experimentales empleados en esta tesis (Aprobación CICUAL-CNEA 01/2015).

3. Evaluación y optimización del procedimiento quirúrgico en el modelo ovino

La práctica quirúrgica asociada a la técnica de autotrasplante pulmonar que permitiría realizar BNCT ex-situ de pulmón es sumamente compleja y excede el objetivo de esta tesis, por lo que esta sección se centrará en describir los puntos generales del procedimiento quirúrgico realizado en el modelo ovino.

Durante los años 2012-2014 se realizaron 8 procedimientos quirúrgicos de autotrasplante en modelo de pulmón de oveja, para establecer un protocolo seguro y reproducible de explante-reimplante del órgano. El tiempo requerido para realizar la escisión completa del pulmón se redujo, a lo largo de las diferentes prácticas, de valores iniciales de 160 minutos a un promedio de 80 ± 30 minutos en las últimas 3 prácticas realizadas.

Durante el período que denominamos “puesta a punto” del procedimiento quirúrgico, la anestesia se ajustó para permitir la ventilación unilateral del ovino y el reimplante subsecuente del órgano explantado. Una parte fundamental en el procedimiento de autotrasplante es lograr que

el órgano explantado sea reimplantado de manera satisfactoria en el mismo animal. Con este objetivo se evaluó, durante la etapa de puesta a punto, una serie de anastomosis para extender venas, arterias y el bronquio del órgano y facilitar la reconexión del pulmón en el ovino.

A partir de las 8 prácticas quirúrgicas, se determinó el conjunto de anastomosis necesario para un procedimiento quirúrgico exitoso. Las optimizaciones realizadas en el procedimiento de autotrasplante permitieron reducir el tiempo necesario para escindir el órgano, dejando las venas, arterias y el bronquio pulmonar de la mayor longitud posible en el animal. En cuanto al reimplante, las anastomosis de las extensiones permiten reducir el tiempo necesario para la reconexión del órgano, lo que conlleva una menor exposición por parte del equipo quirúrgico al pulmón irradiado, y facilita el procedimiento, aumentando las probabilidades de éxito asociadas.

4. Inducción de tumores exofíticos en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster

El modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster se obtuvo sometiendo hámsteres Syrian (*Mesocricetus auratus*) jóvenes (6-8 semanas de edad) 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, 1979). Las topicaciones se realizaron con una jeringa hipodérmica descartable sin aguja y sin necesidad de anestésiar los animales (Fig. 5aM&M). Una semana después de finalizado el protocolo de inducción de tumores con DMBA, los hámsteres fueron anestesiados periódicamente con ketamina (70 mg/kg pc)-xilacina (10,5 mg/kg pc) intraperitoneal (ip) 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 1mm³, los animales fueron utilizados para los distintos estudios (Fig.5cM&M).

Antes de cada ensayo de biodistribución o eficacia de BNCT *in vivo*, se calculó el volumen tumoral midiéndole a cada uno, con un calibre digital, los tres diámetros ortogonales (d). Se calculó el volumen tumoral expresado en mm³ como $d_1 \times d_2 \times d_3$, de acuerdo a trabajos previos (Kreimann et al., 2001b; Trivillin et al., 2006). Arbitrariamente se establecieron 2 grupos de volumen tumoral: chicos ($v < 10 \text{ mm}^3$) y medianos y grandes ($v > 100 \text{ mm}^3$), para evaluar las condiciones apropiadas para un protocolo dado (ej. Electroporación) y/o una potencial respuesta diferencial de los tumores a la terapia en función de su volumen 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 los tumores.

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.

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo en estricto cumplimiento de “La Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” publicada por el “Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies” de Estados Unidos (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>). A partir de la creación del CICUAL de CNEA (Resolución 424/2011) y su subsiguiente reglamentación institucional durante el período 2011 a 2015, se obtuvo la Aprobación institucional de los protocolos experimentales empleados en esta tesis (Aprobación CICUAL-CNEA 01/2015).



Fig. 5M&M. (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.

5. Preparación de las soluciones de compuestos borados

5.1 Soluciones de BPA (p-borofenilalanina)

Las soluciones 0,14 M y 0,42 M de BPA-fructosa se prepararon el mismo día a ser utilizadas con agua mili Q, p-borofenilalanina (BPA, L- enantiómero, >98 % enriquecida en ^{10}B de Boron Biologicals, Inc. Raleigh, NC) y D (-) fructosa, calidad USP (AppliChem). Se comenzó pesando los solutos en balanza electrónica (Ohaus, sensibilidad 0,0001 gr). El p-BPA fue colocado en un vaso de precipitados y se agregó agua mili Q hasta alcanzar el 65% del volumen final a preparar. Luego, las soluciones se llevaron a pH 10 con NaOH 10 M y NaOH 1 M (para el ajuste fino) en constante agitación (Fig.6M&M), mediante el uso de un agitador magnético. Una vez alcanzado el valor de pH, se les agregó fructosa en una relación molar 1:1 con el BPA, para formar el complejo BPA-fructosa y así aumentar la solubilidad del BPA. Este complejo disminuye el pH, por lo que nuevamente se llevó a pH 10 para que todos los sólidos se solubilizaran. Las soluciones se agitaron durante 20 minutos. Finalmente, el pH fue ajustado a valores fisiológicos de $7,4 \pm 0,05$ con HCl 6 N y 0,6 N (para el ajuste fino), también bajo agitación. Las soluciones obtenidas resultaron transparentes (Yoshino, 1989; LaHann, 1993) y se esterilizaron por el método de filtración utilizando un filtro-jeringa de tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$. Las soluciones se conservaron a 4°C , en oscuridad, hasta su utilización.



Fig. 6M&M. Procedimiento de preparación de las soluciones de BPA-f 0,14 M y 0,42 M para los ensayos de biodistribución en los diferentes modelos experimentales.

5.2 Soluciones de GB-10 (Decahidrodecaborato de sodio)

Para preparar el decahidrodecaborato de sodio ($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) se empleó una solución de GB-10 (generosamente proporcionado por Neutron Therapies LLC, San Diego, CA a través del Dr. David Nigg de Idaho National Laboratory), isotópicamente enriquecido en un 99% en ^{10}B . La solución madre de 100 mg $^{10}\text{B}/\text{ml}$ (1M GB-10) se diluyó 1:10 en agua destilada, obteniéndose una concentración final de 10 mg $^{10}\text{B}/\text{ml}$, equivalente a una solución de concentración 0,1M GB-10. Una vez finalizada la preparación de la solución la misma fue almacenada a 4°C hasta su utilización.

5.3 Soluciones de BSH (Borocaptato de sodio)

Las soluciones de BSH se prepararon bajo condiciones anóxicas para impedir la formación de dímeros tóxicos (BSSB, BS(O)SB) inducidos por la presencia de O_2 durante la elaboración de la misma (Fig. 7M&M). Para ello, se empleó N_2 como gas inerte y se controló la concentración de O_2 por medio de indicadores de anaerobiosis (Oxoid BR0055B- sensibilidad $\geq 0,1$ ppm de O_2).

Para llevar a cabo la preparación de las soluciones de BSH en condiciones anóxicas, nosotros diseñamos y elaboramos una bolsa de guantes para anaerobiosis (Fig. 7&M), la cual fue insuflada con N_2 (Ultra puro, Grado 5.0) y purgada 3 veces antes de comenzar la preparación de las soluciones. Se utilizó BSH (Katchem LTD, Cat.1921, Pureza 99,23 %) y suero fisiológico. Las soluciones de concentración final de 0,084 M fueron llevadas a pH 7,0 con NaOH 0,1 M, burbujeadas con N_2 y conservadas en un frasco libre de O_2 a 4°C en heladera y a resguardo de la luz, por un máximo de 12 hs antes de su utilización. Una vez utilizado el BSH en polvo, el mismo fue almacenado dentro de una bolsa con gas inerte (N_2) desarrollada ad hoc para evitar oxidaciones (Fig. 7cM&M).



Fig. 7M&M. a. Preparación de la solución de BSH en bolsa de guantes para anaerobiosis purgada previamente con gas inerte (N_2); b. Detalle de la foto a. donde se observa la manipulación de los elementos necesarios en la elaboración de la solución; c. Una vez utilizado el polvo de BSH, el mismo se conserva en una atmósfera inerte con N_2 .

Nosotros estudiamos si las condiciones y el procedimiento de la preparación de las soluciones de BSH eran las adecuadas para garantizar la menor cantidad posible de dímeros de BSH, como el BSSB y BS(O)SB. Por medio de la técnica de HPLC (Cromatografía Líquida Alta Presión) se estudió la presencia o ausencia de los dímeros en una solución de BSH. Para ello se prepararon soluciones de BSH, BSSB (dímero) y BSSOB (dímero oxidado) de distintas concentraciones, las cuales fueron analizadas por medio de HPLC con diferentes longitudes de onda.

A su vez, por medio de un espectrofotómetro se hicieron espectros de barrido utilizando las distintas soluciones antes mencionadas, incluyendo el buffer de corrida de las muestras usado en HPLC, para determinar los picos de absorción (λ).

En la técnica de HPLC se empleó el equipo HPLC –Konic500 - con detector UV a 220 nm (LinearUVIS 204) y una columna de 250 x 4,6 mm, empaquetada con partículas de 5 μm de octadecilsilano (C-18 Beckman Ultrasphere). La fase móvil fue una solución de Metanol: H_2O 50:50 con 5 mmol/l de Sulfato de tetrabutil amonio (Fluka Lot. 1387977) ajustado a pH 8.0 con Hidróxido de tetrabutil amonio (Fluka Lot. 1478435). El flujo fue de 1 ml/min. Se ensayaron tres longitudes de onda distintas: 200, 205 y 215 nm. Los patrones de los óxidos de BSH fueron donados por el Dr. William Bauer de Idaho National Laboratory (INL - USA). Las concentraciones de las soluciones ensayadas fueron: BSH 140 ppm, BSH 1553 ppm, BSSB 1094 ppm y BSSOB 2080 ppm.

Para el espectro de barrido se usó un espectrofotómetro UV (Shimadzu UV-1603) y las muestras fueron analizadas en el rango 190 nm - 250 nm. Se corrieron el buffer de corrida del HPLC (fase móvil) y las soluciones de BSH, BSSB y BS(O)SB.

5.4 Liposomas MAC y liposomas MAC+TAC

El trabajo con liposomas borados fue realizado en colaboración con el grupo de investigación del International Institute of Nano and Molecular Medicine (I^2NM^2), de la

Universidad de Missouri, Columbia EEUU. Los liposomas se prepararon de forma análoga a los descritos en Feakes et al. (1995). Se utilizaron dos tipos de liposomas: MAC y MAC+TAC (Fig.8M&M).

En forma resumida, los liposomas MAC (con un valor promedio de diámetro de vesícula de $d_v=61 \pm 6$ nm, determinado mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz o DLS, por sus siglas en inglés de “Dynamic Light Scattering”) se elaboraron a partir de una mezcla de lípidos de distearoilfosfadilcolina (DSPC), colesterol y el compuesto borado $K[nido-7-CH_3(CH_2)_{15}-7,8-C_2B_9H_{11}]$ en relación 3:3:1. El compuesto borado fue incorporado en la bicapa lipídica de los liposomas MAC, mientras que en el interior fue encapsulada una solución tampón de PBS hipertónica (fosfato 10 mM/KCl 2,7 mM/NaCl 350 mM, pH 7,4).

Los liposomas MAC+TAC con un valor promedio de diámetro de vesícula de $d_v= 83 \pm 8$ nm (determinado mediante la técnica DLS) se prepararon con una mezcla de lípidos de DSPC, colesterol y compuesto borado $K[nido-7-CH_3(CH_2)_{15}-7,8-C_2B_9H_{11}]$ en relación 1:1:0,6. Al igual que en el caso de los liposomas MAC, el compuesto borado fue incorporado en la bicapa lipídica de los liposomas. La diferencia entre los liposomas MAC+TAC y la formulación de los liposomas anteriores, se encuentra en que los MAC-TAC encapsulan una solución acuosa concentrada (200 mM) de otro compuesto borado $Na_3 [ae-B_{20}H_{17}NH_3]$ (TAC).

6. Estudios de Biodistribución

6.1 Estudios de Biodistribución en el modelo de metástasis hepáticas con BPA, GB-10 y BPA+GB-10

Se utilizaron 70 ratas BDIX en los estudios de biodistribución en el modelo de metástasis hepáticas. Se ensayaron 11 protocolos de administración de compuestos borados utilizando soluciones de dos concentraciones distintas de BPA (0,14 M y 0,42 M), y una de GB-10 (0,1 M) para las administraciones de BPA, GB-10 y BPA+GB-10, como portadores de boro. Las dosis finales de concentración de boro utilizadas en los protocolos fueron de: 15,5 mg¹⁰B/Kg pc; 31,0 mg¹⁰B/Kg pc; 46,5 mg¹⁰B/Kg pc; 50,0 mg¹⁰B/Kg pc y 65,5 – 66,5 mg¹⁰B/Kg pc y las vías de administración ensayadas fueron: ip; iv; ip+iv (mitad del volumen de inyección administrado por cada una de las vías); iv split (dos administraciones intravenosas con mitad del volumen cada una y un intervalo de 15 minutos entre sí).

En los casos de protocolos con administración iv, se les inyectó en la vena yugular el compuesto borado correspondiente, utilizando una aguja de calibre 27G x ½”, bajo anestesia previa con ketamina (36,5 mg/kg pc) –xilacina (5,4 mg/kg pc).

El volumen de inyección asociado a la dosis de 31,0 mg¹⁰B/kg pc fue de 2,06 ml/100 gr pc, es decir aproximadamente 4 ml de BPA 0,14 M, considerando una rata “promedio” de 200g de pc. En un estudio piloto inicial, se intentó suministrar el volumen total mediante inyección intravenosa (iv), simulando la ruta de administración que se utiliza normalmente en el tratamiento de

pacientes humanos. Sin embargo, el gran volumen inyectado en bolo fue pobremente tolerado por los animales. Por lo tanto, para los experimentos, se optó por inyectar mediante las vías ip, iv+ip é iv split, como se describió anteriormente. Lo mismo ocurrió con el volumen de inyección asociado a la dosis de 46,5 mg ¹⁰B/kg pc y por tal motivo se utilizó una solución de BPA 0,42 M (concentración tres veces superior a la de BPA 0,14 M).

En la Tabla 1 M&M se detallan los protocolos de administración evaluados con BPA, GB-10 y BPA+GB-10 en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX.

Protocolo	BPA				GB-10				Dosis de B Total admin.
	Sol. [M]	Dosis BPA	Dosis B	Vía de admin.	Sol.[M]	Dosis GB-10	Dosis B	Vía de admin.	
1	0,14	300	15,5	ip	---	---	---	---	15,5
2	0,14	300	15,5	iv	---	---	---	---	15,5
3	0,14	600	31,0	ip	---	---	---	---	31,0
4	0,14	600	31,0	ip+iv	---	---	---	---	31,0
5	0,42	600	31,0	iv split	---	---	---	---	31,0
6	0,42	900	46,5	ip	---	---	---	---	46,5
7	0,42	900	46,5	ip+iv	---	---	---	---	46,5
8	---	---	---	---	0,1	78	50,0	iv	50,0
9	0,14	300	15,5	iv	0,1	78	50,0	iv	65,5
10	0,42	600	31,0	ip	0,1	54	34,5	iv	65,5
11	0,42	900	46,5	ip	0,1	31	20,0	iv	66,5

Tabla 1M&M. Protocolos ensayados en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX con BPA, GB-10 y BPA+GB-10 (las dosis de B, dosis de BPA, dosis de GB-10 y dosis de B total están expresadas en mg/Kg pc).

Según el esquema de estudios de biodistribución detallado en el inciso 2.2.2 de la Introducción de ésta tesis, luego de la administración los compuestos borados se llevó a cabo la toma de muestras de sangre y tejidos para su posterior determinación de concentración de Boro por las técnicas de ICP-OES o ICP-MS. Los tiempos post administración de los compuestos borados fueron seleccionados en base a estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster (Heber et al. 2004; Kreimann et al. 2001a; Trivillin et al. 2006; Pozzi et al. 2009). Para el caso de los protocolos con BPA o GB-10, el

tiempo de adquisición de las muestras biológicas fue de 3 hs post administración del compuesto borado. Una vez transcurridos dichos tiempos, se tomaron muestras de sangre de la vena cava inferior, bajo anestesia con ketamina (36,5 mg /kg) –xilacina (5,4 mg/kg pc). Luego, los animales se sacrificaron por sobredosis de anestesia inmediatamente antes del muestreo de tejidos. En cada una de las ratas se tomaron muestras de tumor, hígado sano, bazo, riñón, estómago, intestino, piel, pulmón, lengua, médula espinal y líquido intraperitoneal.

6.2 Estudios de Biodistribución en el modelo de metástasis pulmonares difusas con BPA, GB-10 y BPA+ GB-10

Se utilizaron entre 3 y 5 ratas BDIX por protocolo para los estudios de biodistribución en el modelo de metástasis pulmonares. Se ensayaron 5 protocolos utilizando soluciones de dos concentraciones distintas de BPA (0,14 M y 0,42 M), y una de GB-10 (0,1 M) para las administraciones con BPA, GB10 y BPA+GB-10, como portadores de boro. A continuación, en la Tabla 2 M&M se detallan los protocolos ensayados:

Protocolo	BPA				GB-10				Dosis de B Total admin.
	Sol. [M]	Dosis BPA	Dosis B	Vía de admin.	Sol. [M]	Dosis GB-10	Dosis B	Vía de admin.	
1	0,14	350	18,0	ip	---	---	---	---	18,0
2	0,42	900	46,5	ip	---	---	---	---	46,5
3	---	---	---	---	0,1	78	50,0	iv	50,0
4	0,42	600	31,0	ip	0,1	54	34,5	iv	65,5
5	0,42	900	46,5	ip	0,1	31	20,0	iv	66,5

Tabla 2M&M. Protocolos ensayados en el modelo de metástasis pulmonares difusas en ratas BDIX con BPA, GB-10 y BPA+GB10. (Las unidades de las dosis de B, dosis de BPA, dosis de GB-10 y dosis final de B están expresadas en mg/Kg pc).

Al igual que en el caso de los estudios de biodistribución en metástasis hepáticas en ratas BDIX, en los casos de protocolos con administración iv, se les inyectó en la vena yugular el GB-10, utilizando una aguja de calibre 27G x ½”, bajo anestesia previa con ketamina (140 mg/kg pc) – xilacina (21 mg/kg pc).

El tiempo de adquisición de las muestras biológicas fue de 3 hs post administración del compuesto borado (BPA y/ó GB-10). Una vez transcurrido el tiempo, se tomaron muestras de sangre de la vena cava inferior, bajo anestesia con ketamina (36,5 mg /kg pc) –xilacina (5,4 mg/kg pc). Luego, los animales se sacrificaron por sobredosis de anestesia inmediatamente antes del

muestreo de tejidos. En cada una de las ratas se tomaron muestras de órganos o tejidos dentro del volumen de tratamiento (metástasis, pulmón, piel, músculo costal, diafragma, xifoides, corazón, timo, médula espinal) y muestras de órganos de referencia (hígado, riñón, bazo, estómago e intestino) para medición de la concentración de boro mediante la técnica de ICP-OES.

A fin de contribuir a la evaluación de las metástasis pulmonares dentro del contexto de BNCT *ex-situ* (detallado en el inciso 2.2.2 de los Objetivos), el cual se basa en la técnica de autotransplante que implica la perfusión de órganos con una solución de preservación, también se realizó un estudio de biodistribución complementario para evaluar el efecto potencial de la perfusión sobre la concentración de boro en las metástasis y tejido pulmonar en el modelo de metástasis difusas de cáncer de colon en pulmón de rata. Para ello, se utilizaron 3 ratas BDIX con metástasis pulmonares a las cuales se les administró el compuesto borado (BPA 46,5 mg¹⁰B/Kg iv) y tres horas después se inició la perfusión del órgano. Cinco minutos antes de iniciar la perfusión del pulmón, se administraron 1000 u de heparina ip (Veinfar, Argentina), para evitar la formación de coágulos. Luego, quirúrgicamente se abrió la cavidad torácica y se clampeó la aorta superior. Posteriormente, se clampeó la aorta inferior y se colocó un abocat, mediante el cual se hizo pasar la solución de preservación (solución fisiológica o Ringer a 4 °C) por la arteria. A continuación se realizó un corte en la aurícula izquierda, permitiendo de éste modo el drenaje de la solución de preservación, una vez que la misma atravesó el pulmón. La perfusión se realizó durante 10 minutos a un flujo de 100 gotas/min. Las muestras de metástasis y pulmón fueron procesadas para su posterior medición de contenido de boro por la técnica de ICP-OES. Con esos datos se calculó la relación de concentración de Boro Metástasis/Pulmón para el pulmón perfundido y no perfundido.

6.3 Estudios de Biodistribución en pulmón sano de oveja con BPA

El tratamiento del pulmón con BNCT *ex-situ* comprende la irradiación extracorpórea del órgano, seguida de la reimplantación. Una vez que se explanta el órgano, se perfunde con solución de preservación para garantizar una adecuada reperfusión sanguínea y funcionalidad del órgano a la hora del re-implante. En estudios previos realizamos el explante y perfusión del pulmón de oveja para evaluar si éste procedimiento altera las concentraciones de B en el tejido de pulmón normal post perfusión comparado con la concentración de boro en el pulmón pre-perfusión. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en los estudios de biodistribución previos y con el objetivo de ampliar los conocimientos en el modelo pulmonar ovino realizamos un cuarto estudio de perfusión del órgano, pero ésta vez utilizando los dos pulmones: 2 hs post administración del BPA se explantó y perfundió el pulmón izquierdo y 3 hs post administración del BPA se realizó el mismo procedimiento con el pulmón derecho. En este caso, se utilizó una oveja sana de peso aproximado 40 kg a la que se le administró por vía intravenosa (iv) una solución de BPA-fructosa 0,14 M mediante la técnica descrita anteriormente.

Antes de proceder a la perfusión del órgano, se tomaron muestras de diferentes zonas del pulmón con el fin de evaluar la concentración de boro: extracción de pulmón pre explante, extracción de pulmón explantado pre perfusión y una vez finalizada la perfusión del órgano con

solución de preservación se tomaron diversas muestras sobre todo el volumen pulmonar para determinar la concentración y la distribución espacial resultante de boro. La determinación de la concentración de boro en condiciones de explante del órgano se realizó considerando una probable pérdida parcial del compuesto borado debido a los procedimientos de perfusión con solución de preservación y conservación del pulmón.

El porcentaje de boro retenido en el órgano luego de los procesos de escisión, lavado y perfusión se calculó a partir del factor de retención (fR) de boro:

$$fR = [Bp_f] / [Bp_i]$$

donde $[Bp_i]$ es la concentración de boro previa-perfusión y $[Bp_f]$ es el valor inmediatamente posterior a finalizada la infusión.

Al finalizar las experiencias de estudios de cinética y/o explante y perfusión pulmonar, se tomaron muestras de corazón, diafragma, esófago, hígado y riñón.

Todas las muestras obtenidas de los estudios de biodistribución se procesaron por medio de una digestión ácida para la posterior medición para determinar la concentración de boro por la técnica de Espectroscopía de Emisión Óptica por Plasma Inductivo (ICP-OES) o por Espectroscopía por Plasma Inductivo de Masa (ICP-MS).

6.4 Estudios de Biodistribución en el modelo de cáncer oral en con BSH y BSH+BPA

Previamente a la realización de los estudios de biodistribución con BSH, se estudió la toxicidad de éste compuesto en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster. Para ello, se ensayaron cuatro grupos experimentales con animales sanos o cancerizados, con o sin administración del compuesto borado (Tabla 3M&M). La evaluación de la toxicidad se realizó siguiendo el peso corporal y los signos clínicos de los animales (aspecto general, pelaje, movilidad, síntomas neurológicos, presencia de diarrea, etc.) durante 28 días, entre dos y tres veces por semana. Pasado éste lapso de tiempo, los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia con Ketamina (140 mg/kg pc)-Xilacina (21 mg/kg pc). El análisis estadístico de los datos de toxicidad con BSH 50 mg¹⁰B/Kg iv en el modelo de cáncer oral en hámster se realizó empleando el test exacto de Fisher. La significancia estadística se definió para un $p \leq 0,05$.

1. Hamsters cancerizados con BSH 50 mg ¹⁰ B/Kg iv (n=5)	2. Hamsters sin cancerizar con BSH 50 mg ¹⁰ B/Kg iv (n=3)
3. Hamsters sin cancerizar sin BSH 50 mg ¹⁰ B/Kg iv (n=5)	4. Hamsters cancerizados sin BSH 50 mg ¹⁰ B/Kg iv (n=5)

Tabla 3M&M. Grupos experimentales utilizados en el ensayo de toxicidad con BSH 50 mg¹⁰B/kg en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster (n=número de hamsters)

Para el estudio de cinética de biodistribución con BSH en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster se ensayaron nueve tiempos diferentes post-administración (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10 y 12 hs) de una solución de BSH 0,084 M equivalente a 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc por vía iv (preparada según el inciso 5.2 de Materiales y Métodos), con el objetivo de realizar una curva cinética y determinar el mejor tiempo post inyección de dicho compuesto para realizar la irradiación con neutrones. Se busca que la concentración absoluta de ^{10}B en tumor sea terapéuticamente útil y la relativa al tejido normal sea la mayor posible. Se realizaron estudios de biodistribución en un total de 42 hamsters. Los protocolos de administración se muestran en la Tabla 4M&M.

1. BSH 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc (iv) 3 hs(n=5)	2. BSH 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc (iv) 4 hs(n=5)	3. BSH 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc (iv) 5 hs(n=5)
4. BSH 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc (iv) 6 hs(n=5)	5. BSH 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc (iv) 7 hs (n=5)	6. BSH 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc (iv) 8 hs (n=4)
7. BSH 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc (iv) 9 hs (n=5)	8. BSH 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc (iv) 10 hs (n=3)	9. BSH 50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$ pc (iv) 12 hs (n=5)

Tabla 4M&M. Grupos experimentales ensayados con BSH 0,084 M en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster (n=número de hamsters)

Las muestras de tumor, tejido precanceroso, tejidos normales (bolsa normal, paladar, parótida, lengua, hígado, bazo, riñón, pulmón, piel, médula espinal y cerebro) y sangre fueron procesadas por medio de digestión ácida para medir la concentración de boro por la técnica de ICP-OES o ICPMS. Se evaluaron las concentraciones de B en tejidos y sangre y las relaciones de contenido de boro [Tumor/Bolsa Normal] y [Tumor/Sangre] correspondientes a cada uno de los protocolos.

El comportamiento promedio de la concentración de boro proveniente del BSH en la sangre, tejido precanceroso y en la bolsa normal de la mejilla del hámster, se graficaron en función del tiempo utilizando el modelo de dos compartimentos según Notari y De Young 1975. El compartimiento central representa la sangre y el compartimiento periférico está correlacionado alternativamente con cada uno de los tejidos considerados (Fig. 5M&M). Se asumió que no hubo interacción entre los diferentes tejidos. Suponiendo que el perfil de eliminación farmacocinético del compuesto en la sangre está representado adecuadamente por un decaimiento bi-exponencial

(Shibata et al. 2003), se utilizó el modelo de constantes de velocidad para determinar las constantes k_{12} , k_{21} y k_{10} que regulan el intercambio de BSH entre ambos compartimentos. Los cuatro parámetros del modelo farmacocinético en sangre se calcularon primero por ajuste de una curva bi-exponencial con todos los datos recogidos utilizando el método no lineal de cuadrados mínimos. Basándonos en el perfil de concentración en la sangre, se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad para tumor, tejido precanceroso y bolsa normal utilizando todos los datos medidos para cada tejido y el mismo método no lineal de minimización. La concentración de boro en sangre inmediatamente después de la inyección (T_0) se estimó en base a la dosis administrada de BSH y el volumen de sangre de cada uno de los animales se calculó a partir del peso corporal (Lee y Blaufox, 1985).

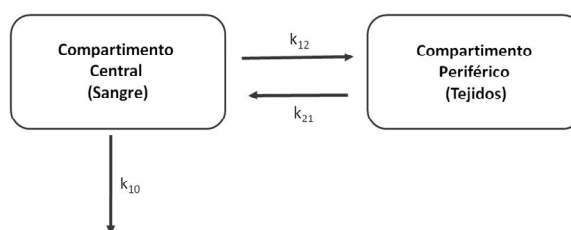


Fig. 5 M&M Diagrama de modelo de dos compartimentos para el estudio de farmacocinética con BSH. El fármaco se administra como una inyección en bolo intravenosa en el compartimento central (sangre). El intercambio de BSH entre los compartimentos central y periférico se rige por las constantes de velocidad de primer orden k_{12} y k_{21} (constantes de transferencia del compuesto) y k_{10} (constantes de eliminación del compuesto).

En el caso de los estudios de biodistribución con BSH+BPA en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, se ensayaron 3 protocolos de administración con una solución de BSH 0,084 M vía iv y BPA 0,14 M ó 0,42 M vía ip, con una dosis final de 10 Boro administrada entre 65,5 -66,5 mg 10 B/Kg. Se realizaron estudios de biodistribución en un total de 11 hamsters, administrando el BSH 1 hora antes que el BPA. Los protocolos de administración se muestran en la Tabla 5 M&M.

Basándonos en estudios anteriores (por ejemplo, Kreimann et al., 2001a; Garabalino et al., 2010), los animales fueron sacrificados 4h después de la administración del BSH y 3h después de la administración de BPA. Las muestras de sangre, tumor, tejido precanceroso, bolsa normal, piel, médula espinal, cerebro, hígado, riñón y pulmón se procesaron para determinar la concentración promedio absoluta de boro por las técnicas de ICP-OES e ICP-MS.

Protocolo	BSH				BPA				Dosis de B Total admin.
	Sol.[M]	Dosis BSH	Dosis B	Vía de admin.	Sol. [M]	Dosis BPA	Dosis B	Vía de admin.	
1	0,084	88,0	50,0	iv	0,14	300	15,5	ip	65,5
2	0,084	61,0	34,5	iv	0,14	600	31,0	ip	65,5
3	0,084	35,0	20,0	iv	0,42	900	46,5	ip	66,5

Tabla 5M&M. Protocolos ensayados en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster con BSH+BPA (las unidades de las dosis de B, dosis de BSH, dosis de BPA y dosis final de B están expresadas en mg/Kg pc).

6.5 Estudios de Biodistribución en el modelo de cáncer oral con liposomas MAC y liposomas MAC+TAC

Previamente a los estudios de biodistribución, para estudiar la posible toxicidad de los liposomas MAC+TAC en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster, se realizaron ensayos con 16 animales cancerizados. Se probaron cinco lotes de liposomas en distintas condiciones. La dosis de Boro administrada fue de 18 mg B/Kg, ya sea ^{11}B ó ^{10}B según el lote, administrados intravenosamente en bolo o mediante una infusión con jeringa (“syringe infusión”). El tiempo post-administración seleccionado fue de 48 hs ya que sería el óptimo para realizar las irradiaciones con neutrones. Los liposomas fueron administrados a temperatura ambiente o inmediatamente después de haber sacado el frasco de la heladera. En algunos casos el frasco fue agitado antes de la inyección. Los grupos experimentales se muestran en la Tabla 6 M&M. Cuando no se aclara la temperatura de administración, debe entenderse que la solución de liposomas no estaba a temperatura ambiente. Las condiciones ensayadas se basan en estudios piloto previos que sugirieron que parámetros tales como temperatura, agitación y añejamiento de la formulación de liposomas podrían tener un impacto sobre la toxicidad sistémica.

Lote	Frasco	Liposomas MAC+TAC					
		Isótopo de B	Vías de Admin.	Tiempo post Fabricación (meses)	Agitación	T ^o Amb.	n
1	1	11	iv bolo	8	No	No	2
2	1	11	iv bolo	5	No	No	2
3	1	10	iv bolo	1	Si	No	6
3	1	10	Syringe inf.	1	Si	No	6
4	1	10	iv bolo	1	Si	No	2
4	2	10	Syringe inf.	1	Si	No	2
4	1	10	iv bolo	2	Si	Si	3
4	2	10	iv bolo	2	No	No	3
5	1	11	iv bolo	1	Si	No	6

Tabla 6M&M. Ensayos de toxicidad en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster con liposomas MAC+TAC con dosis de 18 mg B/Kg (n: número de hamsters)

Los estudios de toxicidad con liposomas MAC+TAC en el modelo de cáncer oral se realizaron utilizando Hamsters Syrian con tumores inducidos en la bolsa de la mejilla derecha, dejando la bolsa contralateral como tejido control (no cancerizado). La solución de liposomas fue inyectada bajo anestesia de ketamina (140 mg/kg)/xilacina (21 mg/kg), por vía intravenosa (iv) en la vena yugular expuesta quirúrgicamente ó con la técnica Syringe infusion, para la cual se utiliza un kit de catéter epicutáneo para vena cava pediátrico modificado. Los flujos de las infusiones fueron de 0,08 ml/min a 0,12 ml/min. La evaluación de la toxicidad se realizó siguiendo el peso corporal y los signos clínicos de los animales (aspecto general, pelaje, movilidad, síntomas neurológicos, presencia de diarrea, signos de gangrena, etc.) durante 24 hs, 48 hs y 28 días, entre dos y tres veces por semana. Pasado éste lapso de tiempo, los animales fueron sacrificados.

Para los estudios de biodistribución se utilizaron liposomas MAC y liposomas MAC+TAC preparados con B natural (19,9% ¹⁰B y 80,1% ¹¹B).

Se utilizaron dos lotes de liposomas MAC con concentraciones estadísticamente similares: 868 ± 45 y 904 ± 75 µg B/ml. En el caso de los liposomas MAC+TAC sólo se utilizó un lote de concentración 1293 ± 71 µg B/ml. Las soluciones de liposomas se almacenaron a 4°C, al resguardo

de la luz, por un máximo de 4 meses. Las suspensiones de liposomas se administraron a temperatura ambiente por vía intravenosa (iv) mediante inyecciones en bolo en la vena yugular quirúrgicamente expuesta en hamsters de 120-170 g de peso corporal, anestesiados con una mezcla de ketamina (70 mg/kg pc) -xilacina (10,5 mg/kg pc) ip. Luego se procedió a suturar la piel. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con una técnica de desarrollada previamente por nuestro grupo (Schwint et al., 1984). Si el volumen de inyección superaba 1 ml, entonces se administraron 2 inyecciones secuenciales, separadas entre sí por 5 minutos, debido a que los volúmenes mayores a 1,5 ml administrados como una única inyección iv en bolo, no eran bien tolerados por los animales.

Los liposomas MAC se administraron a una dosis de 6 mg B/kg de peso corporal (aproximadamente 0,69 ml/100 g pc), y los liposomas MAC+TAC a una dosis de 18 mg B/kg pc (aproximadamente 1,39 ml/100 g pc).

Se realizaron estudios cinéticos de biodistribución con los liposomas MAC en grupos de 5-6 hamsters a diferentes tiempos post-administración del compuesto borado: 16 h, 30h y 48 h. Para el caso de los liposomas MAC+TAC, utilizando grupos de 5 animales, los tiempos post-administración ensayados fueron: 16 h, 30 h, 48 h, 54 h y 72 h. Estos tiempos fueron seleccionados en base a un estudio previo en el modelo experimental de adenocarcinoma mamario en ratones BALB/c (Feakes et al. 1995). Dichos tiempos fueron considerablemente más largos que los intervalos de 3-4 h característicamente utilizados para compuestos portadores de boro de bajo peso molecular, no encapsulados (tales como el BPA y el GB-10). Como se ha mencionado anteriormente en el caso de los liposomas, el transporte vía la circulación dentro del tumor, se ve favorecido por la neovascularización tumoral (Watson-Clark et al., 1998). Además, el efecto de permeabilidad y retención en los tumores, conocido como EPR (Matsumura y Maeda, 1986), mejoraría y alargaría el tiempo de circulación de un fármaco encapsulado y por lo tanto, permitiría una lenta acumulación y una mayor concentración de boro en el tumor. El hecho de que las drogas encapsuladas circularían por períodos más largos de tiempo y por lo tanto, se entregarían más lentamente y en consecuencia se retendrían mayor tiempo que los fármacos libres, explica la selección de tiempos más prolongados posteriores a la administración de los liposomas.

Luego de cada uno de los tiempos pre-establecidos en cada uno de los protocolos con liposomas MAC ó liposomas MAC+TAC, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular expuesta quirúrgicamente bajo anestesia de ketamina (140 mg/kg pc) -xilacina (21 mg/kg pc). Los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia inmediatamente antes de la toma de muestras de tejido. Se tomaron muestras de tumor, tejido precanceroso, tejido normal de la bolsa, bazo, hígado y riñón de cada animal. Todas las muestras fueron preparadas para medir la concentración de boro por la técnica de ICP-MS.

6.6 Estudios de Biodistribución en el modelo de cáncer oral con GB-10 + Electroporación (EP)

La solución del compuesto borado GB-10 fue administrada por vía intravenosa (iv) en la vena yugular a una dosis de $50 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{kg pc}$, bajo anestesia con ketamina ($140 \text{ mg}/\text{kg p.c}$)/xilacina ($21 \text{ mg}/\text{kg p.c}$) (Fig.6M&M) para los protocolos con EP y el control sin EP.



Fig.6M&M. La fotografía muestra la administración del GB-10 por vía iv a una dosis de $50 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{kg pc}$ en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster.

La Electroporación se realizó utilizando un electroporador (BTX ECM 830 Harvard Apparatus) según la secuencia de pulsos típica para ECT ($1000 \text{ v}/\text{cm}$, 8 pulsos de $100 \mu\text{s}$). La corriente eléctrica fue medida mediante una sonda de 1 ohm y un osciloscopio digital (InfiniiVision DSO-X 2012A-SGM, Agilent Technologies, USA) (Fig. 7M&M).

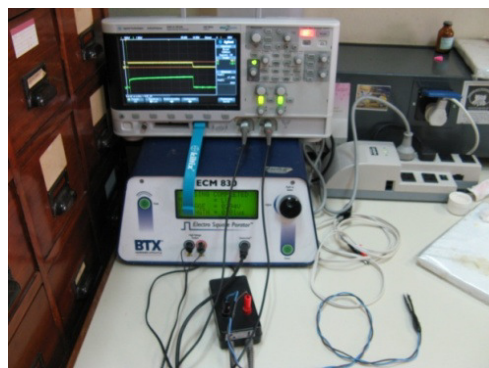


Fig.7M&M. Electroporador utilizado para los ensayos de EP en la bolsa de la mejilla del hámster.

Se emplearon dos tamaños de electrodos distintos, del tipo placas paralelas, de acuerdo al tamaño de los tumores previamente clasificados según el volumen tumoral en dos grupos denominados: chicos (volumen $\leq 10 \text{ mm}^3$) (Fig.13 aM&M) y medianos y grandes (volumen $\geq 10 \text{ mm}^3$) (Fig.8b M&M). El volumen tumoral se determinó utilizando un calibre digital, midiendo los tres diámetros ortogonales, expresando el resultado como volumen tumoral en mm^3 .

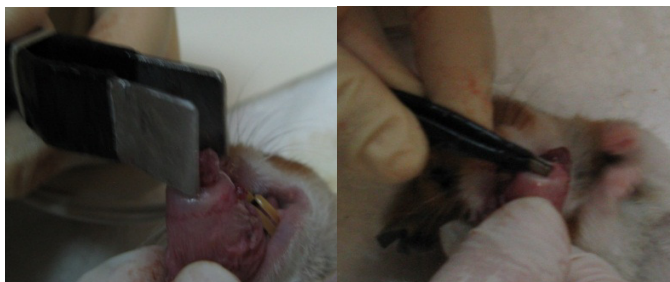


Fig.8M&M.Electrodos del tipo placa paralelas utilizados en el procedimiento de EP en tumores medianos y grandes cuyo volumen tumoral $\geq 10 \text{ mm}^3$ (a) y tumores chicos con volumen tumoral $\leq 10 \text{ mm}^3$ (b).

En estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo pudimos establecer las condiciones óptimas de EP *in vivo* en el modelo de cáncer oral en hámster (Garabalino y Olaiz, et al., AATN 2014). Un análisis retrospectivo de las condiciones de EP indicó que los ensayos se realizaron en un rango de conductividad comprendido entre 0,0055-0,055 S/cm. El análisis detallado de los datos de respuesta tumoral y la conductividad tumoral durante la EP nos permitió calcular un índice de EP efectiva (IEPE), con el cual pudimos determinar la corriente denominada “Límite” (en [A]: Amperes), necesaria en cada pulso para que la EP sea efectiva para un volumen tumoral establecido. Dado que la relación entre la corriente límite (I) y el volumen tumoral indica si la corriente aplicada al tumor fue suficiente o no para lograr una EP efectiva, pudimos evaluar si era necesario volver a aplicar el tratamiento.

Utilizando el compuesto borado GB-10 y variando el momento de aplicación de la EP con respecto a la administración de dicho compuesto (tardía: 2.50 hs. post administración del compuesto borado y temprana: 10 min. post administración del compuesto borado), se evaluaron los siguientes protocolos y control para los estudios de biodistribución en tumores de la bolsa de la mejilla del hámster (Fig.9 M&M):

(P1B) Protocolo de biodistribución con GB-10/EP tardía: GB-10, 50 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$ (iv) (t=0 min) – EP (t=2:50 hs) – sacrificio y toma de muestras (t=3 hs)

(P2B) Protocolo de biodistribución con GB-10/EP temprana: GB-10, 50 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$ iv (t=0 min) - EP (t=10 min) – sacrificio y toma de muestras (t=3 hs)

(P3B) Control de biodistribución con GB-10 sin EP: GB-10, 50 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$ iv (t=0 min) – sacrificio y toma de muestras (t=3 hs).



Fig.9M&M Protocolos de biodistribución ensayados con GB-10 con o sin EP en el modelo de cáncer oral en hámster

Se emplearon entre 3 y 5 hamsters por cada protocolo ensayado.

Luego de administrar la solución de GB-10 y aplicar la EP según los protocolos descriptos anteriormente, los animales fueron eutanasiados por decapitación bajo sobredosis de anestesia de ketamina (140 mg/kg pc) y xilacina (21 mg/kg pc), 3 hs después de la administración del GB-10. De esta forma se obtuvieron muestras de sangre, tumor, tejido precanceroso y tejido de bolsa de la mejilla normal, para medir la concentración de boro por medio de la técnica de ICP-OES ó ICP-MS.

El análisis estadístico de los valores de concentración media de B, relaciones Tumor/Sangre (T/S) y Tumor/Bolsa Normal (T/BN) con sus desviaciones estándar correspondientes a los protocolos con EP+GB-10 versus el control GB-10 sin EP, fue realizado mediante el test t no apareado, computando el valor de “p” y estableciendo un nivel de significancia en $p \leq 0,05$.

7. Medición de concentración de boro en sangre y tejidos

7.1 Procesado de las muestras para medición de la concentración de boro por ICP-OES

En todos los casos de estudios de biodistribución se tomaron muestras de tumor y tejidos normales entre 20 y 50 mg y muestras de sangre entera de alrededor de 300 mg.

Estudios pilotos demostraron que la utilización de ácidos con bajo contenido de boro ó con procesos previos de sub-boiling y el empleo de agua de calidad mili Q (18,2 ohm) disminuye las fuentes externas de boro contribuyendo a la precisión de las mediciones y una reducción en su desvío estándar. Por lo tanto, se empleó Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) Ultrapure p.a. de bajo contenido de boro en envase plástico (J.T.Baker) y Ácido Nítrico (HNO_3) 65 % p.a. (Merck) sub-boiling, suministrado por el Dr. Claudio Devida del Laboratorio del ICP-MS del CAE.

Las digestiones se realizaron utilizando 0,25 ml de una solución de $H_2SO_4:HNO_3$ 1:1 para las muestras de tumor, tejido precanceroso y tejidos normales y 1,25 ml para las muestras de sangre a 100°C durante 1 h en un baño térmico de agua (Vicking Modelo Dubnoff) (Fig. 10 a.M&M). Una vez que alcanzaron temperatura ambiente y para mejorar la digestión, las muestras fueron sonicadas durante 90 minutos (Ultrasonic cleaner-Testlab) (Fig.10 b M&M). Al alcanzar temperatura ambiente nuevamente se adicionaron 0,20 ml de una solución acuosa de Y 0,5 ppm + Sr 25 ppm (estándares internos) y 0,55 ml de una solución acuosa de Tritón 5% v/v para las muestras de tumor y tejidos normales. Para las muestras de sangre se utilizaron 1 ml de Y 0,5 ppm + Sr 25 ppm y 2,75 ml de Tritón 5% v/v. De igual manera se prepararon blancos de muestras utilizando las mismas soluciones.

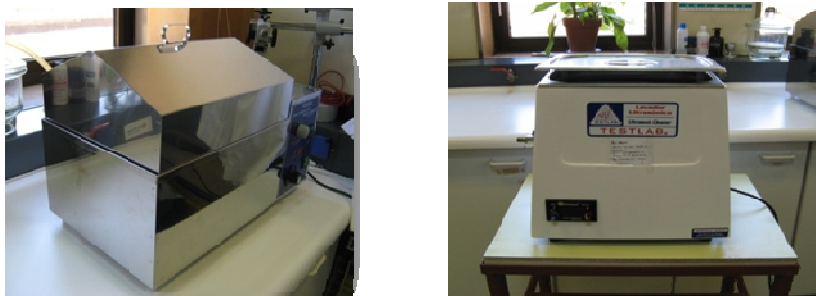


Fig. 10 M&M a. Baño térmico de agua, b. Sonicador. Ambos equipos fueron utilizados en el procesamiento de las muestras tomadas en los estudios de biodistribución en los diferentes modelos experimentales, para la medición de concentración de B.

7.2 Valoración de la concentración de boro por ICP-OES

Las mediciones de boro se realizaron en un equipo ICP-OES, Optima 3100 XL, UV, axial, para espectroscopía de Emisión Óptica Acoplada por Plasma Inductivo (Perkin- Elmer) (Fig. 11M&M).

Para las mediciones en el ICP-OES se prepararon 7 soluciones patrón para la curva de calibración utilizando H_3BO_3 , enriquecido en ^{10}B (Glyconix Corp. >99 % pureza). Estas incluyeron blanco con Y 0,5 ppm + Sr 25 ppm, blanco sin Y ni Sr, solución de 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,5 ppm y 1 ppm de ^{10}B . Las líneas consideradas para la medición de B fueron 208.889 y 249.677 nm



Fig. 11 M&M Espectrómetro Óptico de Emisión por Plasma Inductivo (ICP-OES) (Centro Atómico Constituyentes, CNEA).

7.3 Procesado de las muestras para medición de la concentración de boro por ICP-MS

Al igual que para el procesado de las muestras para la medición de boro por ICP-OES, se tomaron muestras de tumor y tejidos normales entre 20 y 50 mg y muestras de sangre entera de alrededor de 300 mg. La calidad de los ácidos y agua fueron las mismas que para el ICP-OES.

Las muestras fueron digeridas utilizando 0,25 ml de una solución de $H_2SO_4:HNO_3$ 1:1 para las muestras de tumor, tejido precanceroso, tejidos normales y sangre, a $100^\circ C$ durante 1 h en un baño térmico de agua. Luego se llevaron a un volumen final de 10 ml con agua calidad Mili Q y de éstas soluciones se tomaron alícuotas, de acuerdo a la concentración de boro estimada para cada tipo de tejido, agregando 0,25 ml de 6Li 1 ppm como estándar interno y llevando a un volumen final de 10 ml.

7.4 Valoración de la concentración de boro por ICP-MS

Las mediciones de boro se realizaron en un equipo ICP-MS (Perkin Elmer, Elam DRC II) para espectroscopía de Emisión Atómica por Plasma Inductivo de Masa (Fig. 12M&M).



Fig. 12 M&M Espectrómetro Óptico de Emisión Atómica por Plasma Inductivo de Masa (ICP-MS) (Centro Atómico Ezeiza, CNEA).

Para las mediciones en el ICP-MS se prepararon 5 soluciones patrón para la curva de calibración utilizando H_3BO_3 enriquecido en ^{10}B ó B natural (Glyconix Corp. >99 % pureza), dependiendo de que la medición fuera de muestras con compuestos borados enriquecidos en ^{10}B o con B natural. Estas incluyeron un blanco con 6Li 1 ppm y soluciones de 20 ppb, 10 ppb, 5 ppb, y 2,5 ppb de ^{10}B ó B natural.

7.5 Autorradiografía Neutrónica Cualitativa de boro

A fin de contribuir al estudio de la factibilidad de mejorar el targeting de boro en el modelo de cáncer oral en hámster mediante la técnica de electroporación, se buscó explorar los cambios potenciales en la microdistribución de boro que no pueden ser detectadas por mediciones globales por ICP. En colaboración con el grupo de Imagenología perteneciente al Proyecto Institucional de BNCT dentro de la CNEA, se estudió la microdistribución de B-10 en las diferentes estructuras tisulares de los tumores y tejido precanceroso del modelo de cáncer oral en hámster, mediante la autorradiografía neutrónica (ARN) cualitativa.

Para ello setomaron muestras de tumor y tejido precanceroso de los mismos hamsters utilizados en los estudios de biodistribución de GB-10 con o sin EP, mencionados en el inciso 6.6 de Materiales y Métodos. Todas las muestras fueron crio-preservadas a $-160^{\circ}C$ en nitrógeno líquido, hasta el día de su procesamiento. Luego, de éstas muestras se obtuvieron cortes por congelación mediante un criostato Lipshaw USA, o un criostato Thermo ShandonCryotome E (Fig. 13 M&M), logrando cortes de alrededor de 10 μm y 30-50 μm de espesor consecutivamente.

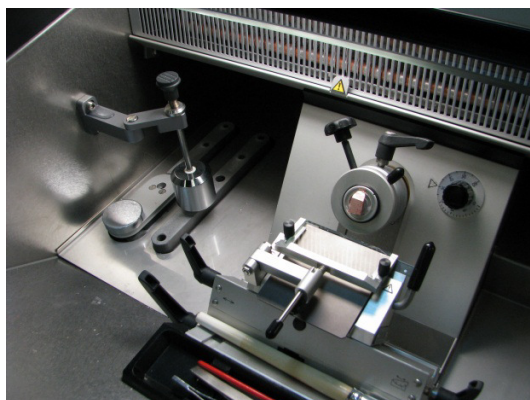


Fig. 13 M&M Crióstato utilizado para realizar los ensayos para ARN en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster (Centro Atómico Constituyentes CNEA).

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 folios detectoras de trazas nucleares (Lexan™ de 250 μm de espesor o CR39 de 1 mm de espesor). Las secciones montadas sobre el SSNTD (detectores de trazas nucleares de estado sólido) se

colocaron sobre una plancha de Lexan junto con el resto de las muestras y se cubrieron con otra folia detectora. Este segundo detector protege el material biológico y sirve como copia de resguardo de la imagen Autorradiográfica (Fig.14 M&M).

Las muestras para ARN fueron irradiadas con neutrones en la facilidad de columna térmica del reactor nuclear RA-3 (CNEA) (Miller et al., 2009), con fluencias de 10^{13} n/cm^2 . 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 (Olympus DP70) con bajo aumento (1,25x o 2,5x), con el objeto de obtener imágenes de la totalidad del corte. El daño generado en los detectores fue amplificado mediante un ataque químico con solución alcohólica de KOH, durante 4 min. Las muestras se re-exploraron, obteniendo las imágenes autorradiográficas correspondientes.

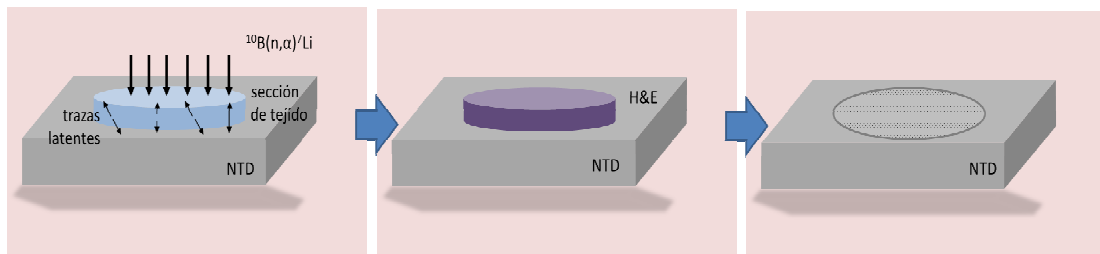


Fig. 14 M&M Esquema general del proceso de formación de una imagen autorradiográfica para el análisis cualitativo de B por ARN. (a) Detector de trazas nucleares (NTD) en contacto con una sección de tejido. Irradiación con neutrones térmicos y formación de trazas latentes. (b) Coloración de la sección de tejido con hematoxilina-eosina para su observación por microscopía óptica. (c) Trazas visibles por microscopía óptica luego de procesar el NTD con una solución de ataque químico adecuada.

8. Estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de cáncer oral

8.1 Ensayos de BNCT/MAC+TAC

Para los estudios de BNCT *in vivo* se utilizaron liposomas MAC+TAC enriquecidos al 99,9 % de ^{10}B .

La suspensión de liposomas MAC-TAC con un diámetro promedio de 83 nm se administró a temperatura ambiente por vía iv a una dosis de $18 \text{ mg } ^{10}\text{B/Kg pc}$. Las dosis y los tiempos post administración utilizados para las irradiaciones con neutrones fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos de los estudios de biodistribución realizados en ésta tesis. La Tabla 7 M&M muestra un ejemplo representativo de las componentes de radiación para prescripciones de 5-Gy de dosis absorbidas en el tejido precanceroso. Para los cálculos de las dosis se utilizaron los valores de concentración de B obtenidos en los estudios de biodistribución en el modelo de cáncer oral en hámster, reportados en la presente tesis.

Protocolo	Tejido	[B] ppm	Dosis (Gy)			Dosis Absorbida (Gy)	
			Fotones γ	Protones inducidos (^{14}N)	Boro	Fondo	Total
BNCT MAC-TAC	Tumor	66,6 \pm 16,1	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	19 \pm 6	1,7 \pm 0,2	21 \pm 6
	Tej. precanc.	11,3 \pm 6,2	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	3 \pm 2	1,7 \pm 0,2	5 \pm 2
	Bolsa Normal	7,0 \pm 5,0	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	2 \pm 2	1,7 \pm 0,2	4 \pm 2
Sólo Haz	Tumor, tej. precanc., bolsa normal	---	0,9 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	---	1,7 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2

Tabla 7M&M. El valor medio de la fluencia de neutrones térmicos en la posición de irradiación fue de $3,9 \times 10^{12} \pm 8 \times 10^{11}$ n/cm² y el tiempo de irradiación varió entre 8-9 min. Los valores se presentan como media \pm SD.

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 et al., 2009).

Los animales fueron irradiados 48 h post administración de liposomas MAC-TAC bajo anestesia por vía ip de ketamina (140 mg/kg pc)/xilacina (21 mg/kg pc), utilizando un blindaje para neutrones de $^6\text{Li}_2\text{CO}_3$ (95% ^6Li) especialmente diseñado para las irradiaciones del modelo de cáncer oral en hámster que permite exponer la bolsa de la mejilla del hámster y proteger el resto del cuerpo del animal (Pozzi et al., 2009). El flujo de neutrones térmicos fue de aproximadamente $7,7 \times 10^9$ n/cm²s¹ en el centro de la posición de irradiación. La tasa de dosis de rayos gamma en aire en el lugar de irradiación fue de $6,5 \pm 0,5$ Gy/h.

Se realizaron una serie de experimentos preliminares para establecer el intervalo de dosis de radiación óptimo. Para ello, se administró a un grupo de 6 hámsters con un total de 45 tumores la suspensión de liposomas MAC+TAC vía iv y 48 hs después se irradiaron los animales con prescripciones de dosis absorbidas a tejido precanceroso de 3,5 Gy, 6 Gy y 7Gy (2 animales por grupo).

Habiendo determinado que a 3,5 Gy no se observó radiotoxicidad, mientras que con 6 Gy y 7 Gy la toxicidad fue severa, los experimentos posteriores se realizaron a 5 Gy a tejido precanceroso. La correspondiente dosis absorbida para tumor fue de 21 Gy.

El protocolo de BNCT/MAC+TAC único tratamiento involucró a un total de 25 hámsters portadores de 102 tumores.

El protocolo BNCT/MAC-TAC como único tratamiento indujo buen control tumoral con escasa radiotoxicidad en el tejido precanceroso. En este marco se decidió explorar la eficacia terapéutica y potencial toxicidad de una doble aplicación de BNCT/MAC+TAC con el objetivo de inducir una respuesta tumoral sostenida sin exceder la radiotolerancia del tejido precanceroso. Sobre la base de resultados previos en el modelo experimental de precáncer en la bolsa de la mejilla del hámster con doble aplicación de BNCT mediado por GB-10 y/o BPA (con un intervalo de 6 semanas entre aplicaciones) (Monti Hughes et al., 2011), se realizaron dobles aplicaciones de BNCT/MAC+TAC. En estos protocolos se ensayó una segunda aplicación de BNCT/MAC+TAC a diferentes intervalos posteriores a la primera aplicación de BNCT/MAC+TAC (4, 6 y 8 semanas), con distintos tiempos de seguimiento *in vivo* respecto de la primera aplicación de BNCT, empleando 5 hamsters con 27 tumores, 4 hamsters con 19 tumores y 6 hamsters con 16 tumores, respectivamente. Todos los protocolos ensayados con liposomas MAC+TAC se muestran en la Fig. 15M&M.

Además se incluyeron los siguientes grupos control:

- a. Sólo Haz, para evaluar el efecto de la dosis de fondo (sin administración de los liposomas MAC+TAC, irradiando con la misma fluencia de neutrones empleada para el grupo de 5 Gy a tejido precanceroso): 6 hámsters con un total de 36 tumores.
- b. Sham, para evaluar el crecimiento de los tumores sin tratamiento: 12 hamsters no tratados con un total de 77 tumores.
- c. El control con Doble tratamiento Sólo haz no se pudo realizar debido al crecimiento excesivo de los tumores en los animales.

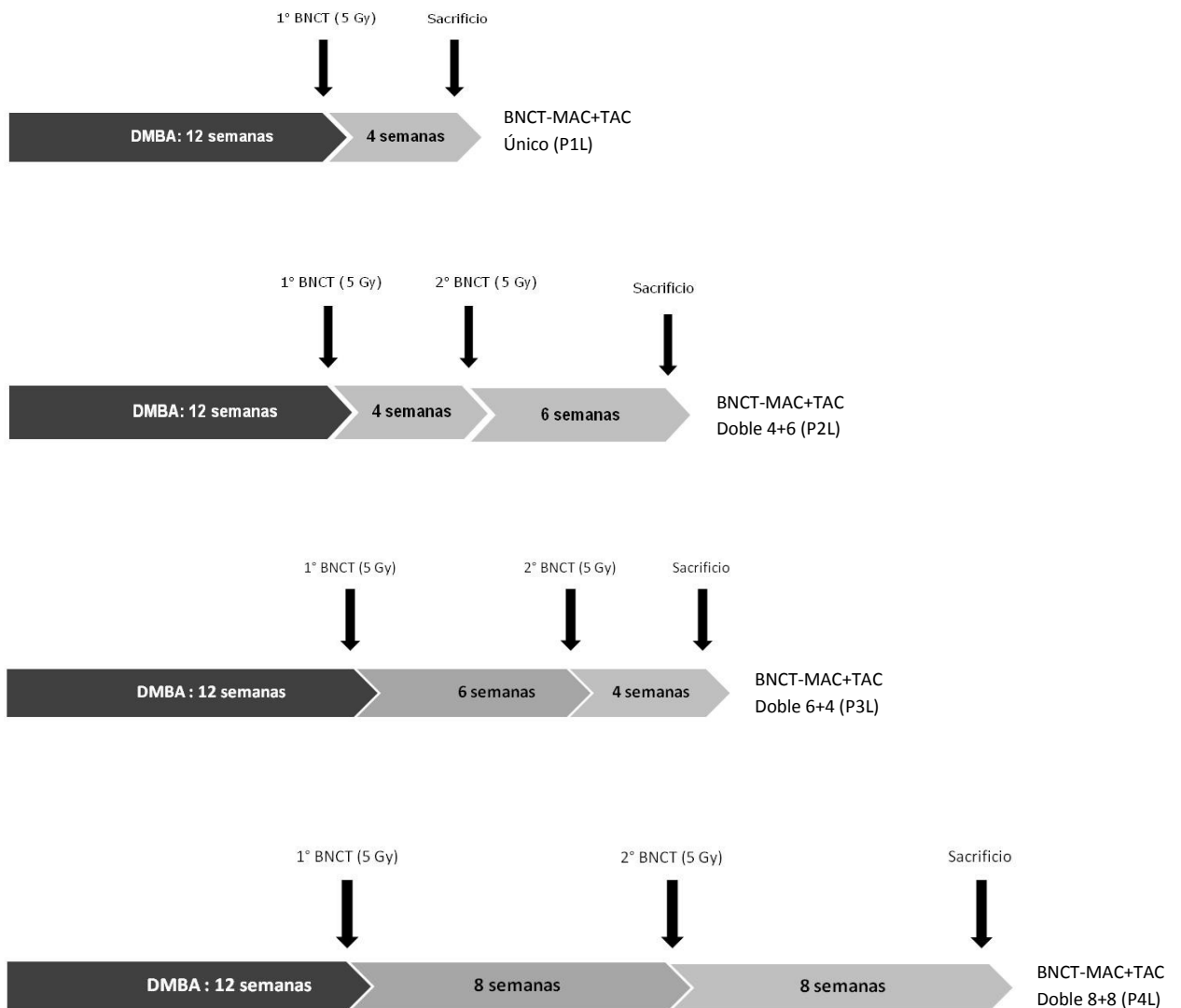


Fig.15 M&M Protocolos ensayados para evaluar la eficacia terapéutica de BNCT *in vivo* con liposomas MAC+TAC en el modelo de cáncer oral en hámsters. En el caso de las dobles aplicaciones se indica primero el intervalo entre ambas y luego el tiempo de seguimiento post-segunda aplicación de BNCT (ej. BNCT-MAC+TAC Doble 8+8).

8.2 Ensayos de BNCT/GB-10+EP

Para evaluar la eficacia terapéutica de BNCT/GB-10 con o sin EP *in vivo* se usaron los siguientes protocolos y controles (Fig. 16M&M a,b):

(P1) Protocolo BNCT GB-10/EP tardía: GB-10, 50 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$ pc (iv) (t=0 min) – EP (t=2:50 hs) - irradiación (t=3 hs) (n= 5 hámsters con 23 tumores).

(P2) Protocolo BNCT GB-10/EP temprana: GB-10, 50 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$ pc iv (t=0 min) - EP (t=10 min) - irradiación (t=3 hs) (n=9 hámsters con 46 tumores).

(P3) Control BNCT GB-10 sin EP: GB-10, 50 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$ pc iv (t=0 min) - irradiación (t=3 hs) (n=5 hamsters con 33 tumores).

(P4) Control Sólo EP: EP (t=0 min) (n=5 hámsters con 38 tumores).

(P5) Control Sólo Haz: irradiación sin administración del compuesto borado (n=6 hamsters con 50 tumores).

(P6) Control EP tardía + Sólo Haz: EP (t=0 min) – Irradiación (t=10 min) (n=5 hamsters con 16 tumores).

(P7) Control EP temprana + Sólo Haz: EP (t=0 min) – Irradiación (t=2:50 hs) (n=5 hamsters con 32 tumores).

Todas las irradiaciones fueron realizadas en la facilidad del Reactor Nuclear de investigación y producción RA-3 situado en el Centro Atómico Ezeiza, provincia de Buenos Aires (Miller et al., 2009). Al igual que en los estudios de BNCT con Liposomas MAC+TAC para proteger el cuerpo del animal del flujo de neutrones térmicos, se empleó unblindaje que permite exponer la bolsa de la mejilla del hámster a ser irradiada (Pozzi et al., 2009).

Los animales fueron anestesiados con ketamina/xilacina para luego realizar las irradiaciones con una fluencia de $1,9 \times 10^{12} \text{n}/\text{cm}^2$ para todos los protocolos y controles realizados en este estudio.



Fig.16M&M a . Protocolos ensayados para evaluar la eficacia terapéutica de BNCT *in vivo* con GB-10 con o sin EP en el modelo de cáncer oral en hámster.

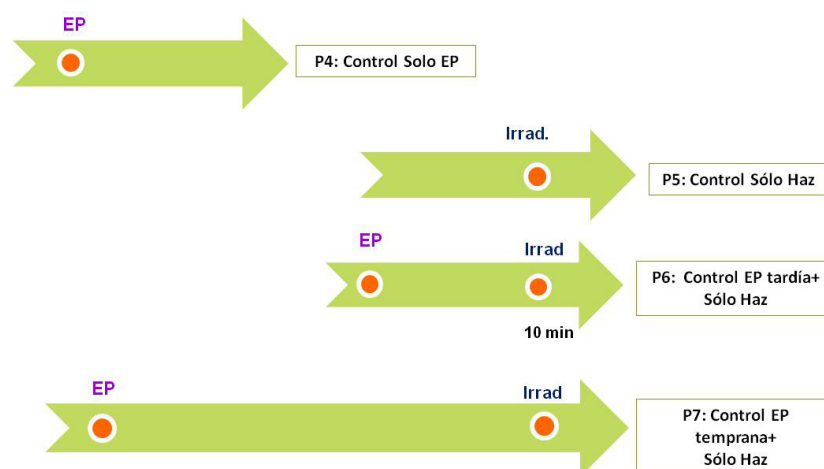


Fig.16 M&Mb. Protocolos control ensayados para evaluar la eficacia terapéutica de BNCT *in vivo* con GB-10 con o sin EP en el modelo de cáncer oral en hámster.

9. Seguimiento *in vivo* post tratamiento con BNCT en el modelo de cáncer oral en hámster

9.1 Estado general de los animales y cinética del desarrollo tumoral

Se estudió la respuesta al tratamiento y la potencial toxicidad evaluando los signos clínicos de los animales y su peso corporal, el volumen tumoral y la mucositis en el tejido precanceroso a los 7, 14, 21 y 28 días post-irradiación, para el caso de los ensayos de BNCT/GB-10 + EP. En los ensayos de BNCT con Liposomas MAC+TAC los controles se realizaron semanalmente hasta las 4, 10 y 16 semanas post primera aplicación de BNCT según el protocolo ensayado.

Antes de cada irradiación se calculó el volumen tumoral según lo explicado en el inciso 4 de Materiales y Métodos. Se discriminó la respuesta en función del volumen tumoral pre-tratamiento para evaluar una potencial respuesta diferencial de los tumores a la terapia en función de su volumen en el momento de la irradiación. En el caso de irradiaciones con protocolos de BNCT/GB-10+EPy BNCT/GB-10 se agruparon los tumores en 2 categorías: chicos: volumen $<10 \text{ mm}^3$; medianos y grandes: volumen $\geq 10 \text{ mm}^3$. En el caso de los estudios de BNCT-MAC+TAC se agruparon los tumores en 3 categorías: chicos: volumen $<10 \text{ mm}^3$; medianos: volumen $10\text{-}100 \text{ mm}^3$ y grandes: volumen $\geq 100 \text{ mm}^3$.

La respuesta tumoral fue evaluada por inspección visual y medición con calibre de los 3 diámetros ortogonales de cada tumor (d). Se calculó el volumen tumoral expresado en mm^3 como

$d_1 \times d_2 \times d_3$, de acuerdo a trabajos previos (Kreimann et al., 2001; Trivillin et al., 2006). Se realizó undiagrama de cada bolsa con la ubicación de todos los tumores, y se tomaron imágenes fotográficas.

La respuesta tumoral se clasificó como remisión completa (RC), remisión parcial (RP), sin respuesta (SR) y control tumoral (CT). La remisión completa (RC) 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 remisión parcial (RP) fue definida como una reducción en el tamaño tumoral respecto al volumen inicial antes del tratamiento. El control tumoral (CT) se estableció como la suma de la remisión parcial y la remisión completa (CT= RC+RP). Los casos SR se definieron como crecimiento tumoral y falta de efecto terapéutico (aunque la tasa de crecimiento fuera menor a los tumores no tratados).

9.2 Evaluación de la mucositis

La evaluación del grado de mucositis en el tejido precanceroso alrededor del tumor se realizó según la escala semi-cuantitativa descrita anteriormente en ésta tesis en Introducción Inciso 9.2.

Nosotros consideramos a los Grados 0-2 como mucositis leve, al Grado 3 como mucositis moderada y a los Grados 4-5 como mucositis severa. La asignación del grado de mucositis de las bolsas se basó en la característica macroscópica más severa observada en la bolsa durante los días de seguimiento correspondientes a cada protocolo. Ese grado de mucositis se denominó Mucositis Máxima. También se evaluó el grado de Mucositis Final cuando, una vez finalizado el seguimiento, los animales fueron eutanasiados bajo anestesia con ketamina (140 mg/kg pc)-xilacina (21 mg/kg pc).

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo en estricto cumplimiento de “La Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” publicada por el “Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies” de Estados Unidos (<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>). A partir de la creación del CICUAL de CNEA (Resolución 424/2011) y su subsiguiente reglamentación institucional durante el período 2011 a 2015, se obtuvo la Aprobación institucional de los protocolos experimentales empleados en esta tesis (Aprobación CICUAL-CNEA 01/2015).

9.3 Análisis Estadístico de los resultados de los ensayos de biodistribución y eficacia terapéutica de BNCT *in vivo* en el modelo de cáncer oral en hámster

El análisis estadístico de los valores de concentración media de B, relaciones T/S y T/BN con sus desviaciones estándar correspondientes de los protocolos con EP+GB-10 versus el control GB-

10 sin EP, fueron analizados mediante el test t no apareado. La significancia estadística se definió para un $p \leq 0,05$.

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

Resultados

1. Estudios de Biodistribución con compuestos borados

1.1 Estudios de Biodistribución en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX con BPA, GB-10 y BPA+GB-10

No se observaron signos de toxicidad con los protocolos de administración ensayados en ninguno de los animales empleados para los estudios de biodistribución con los compuestos borados BPA y/o GB-10, de acuerdo con estudios previos de nuestro laboratorio en otros modelos (ej. Heber et al 2004; Trivillin et al 2006; Cardoso et al. 2007; Pozzi et al. 2009). Cabe destacar que los intentos de aumentar el volumen de inyección intravenosa, más allá de los valores máximos ensayados en el presente estudio (aproximadamente 1,1 ml iv administrado concomitantemente con aproximadamente 1,1 ml ip) no fueron bien tolerados por los animales. Por otra parte, la solubilidad limitada del BPA restringe la preparación de concentraciones más altas de soluciones de BPA-fructosa, las cuales permitirían reducir el volumen de inyección. Las Tablas 1R y 2R muestran los resultados de la concentración de boro promedio absoluta ([B]) expresados en ppm medidos por ICP-OES, de los diferentes tejidos y las relaciones de concentración de boro Tumor/Sangre (T/S) y Tumor/Hígado Normal (T/HN), para los protocolos con compuestos borados individuales BPA ó GB-10 (Tabla 1R) y protocolos de administración con compuestos borados combinados BPA+GB-10 (Tabla 2R).

Basándonos en los lineamientos elaborados por nuestro grupo de trabajo para la selección de protocolos de administración con potencialidad terapéutica (inciso 2.2.2 de la Introducción) que establecen que los protocolos no debe presentar toxicidad; [B] en tumor debe ser ≥ 20 ppm y las relaciones de concentración de B Tumor/Sangre y Tumor/Tejido Normal deben ser ≥ 1 , los protocolos de biodistribución 3, 6 y 7 (Fig. 1R) con la administración del compuesto borado BPA y los protocolos 9, 10 y 11 (Fig. 2R) con la combinación de los compuestos BPA+GB-10, tendrían potencial utilidad terapéutica. Aunque el valor de concentración de boro en tumor del protocolo 9 (19,4 ppm) es levemente menor al límite establecido ($[B] \geq 20$ ppm) según estudios previos (ej. Trivillin et al., 2006), fue incluido dentro de los protocolos potencialmente útiles para realizar estudios radiobiológicos *in vivo*, debido a que si consideramos los valores de desviación estándar ($\pm 6,6$ ppm), la concentración promedio absoluta de boro en tumor se encontraría dentro del intervalo 12,8 - 26,0 ppm, siendo el valor máximo superior a 20 ppm. Además, el hecho de que este protocolo consiste en la administración combinada de dos compuestos borados que poseen estrategias de incorporación al tejido tumoral distintas, podría ofrecer una potencial ventaja respecto a la entrega de boro, confiriendo así mayor homogeneidad en la distribución de boro en las diferentes poblaciones de células tumorales (Heber et al., 2006).

Protocolo	1	2	3	4	5	6	7	8
	BPA 15,5 mg ¹⁰ B/Kg ip	BPA 15,5 mg ¹⁰ B/Kg iv	BPA 31,0 mg ¹⁰ B/Kg ip	BPA 31,0 mg ¹⁰ B/Kg ip + iv	BPA 31,0 mg ¹⁰ B/Kg iv split	BPA 46,5 mg ¹⁰ B/Kg ip	BPA 46,5 mg ¹⁰ B/Kg ip + iv	GB-10 50,0 mg ¹⁰ B/Kg iv
Sangre	7,0 ± 1,1 (n=5)	6,3 ± 1,0 (n=6)	11,4 ± 1,2 (n=5)	11,0 ± 2,6 (n=5)	9,8 ± 1,8 (n=6)	16,5 ± 3,1 (n=10)	15,0 ± 3,8 (n=8)	15,8 ± 2,9 (n=5)
Tumor	13,6 ± 3,1 (n=23)	10,2 ± 1,6 (n=16)	21,8 ± 7,0 (n=12)	18,3 ± 8,3 (n=19)	15,5 ± 2,7 (n=14)	38,5 ± 10,0 (n=15)	31,5 ± 10,4 (n=25)	7,1 ± 1,5 (n=15)
Hígado Normal	10,7 ± 7,1 (n=6)	6,2 ± 1,4 (n=6)	11,2 ± 1,9 (n=5)	13,6 ± 4,8 (n=5)	10,0 ± 3,1 (n=6)	15,1 ± 6,5 (n=10)	17,4 ± 5,2 (n=8)	4,8 ± 1,3 (n=5)
Riñón	23,6 ± 5,3 (n=6)	25,3 ± 4,6 (n=6)	45,1 ± 10,3 (n=5)	80,9 ± 27,0 (n=5)	35,5 ± 9,0 (n=6)	69,0 ± 32,1 (n=10)	91,1 ± 22,3 (n=8)	19,1 ± 4,2 (n=5)
Intestino	4,8 (n=1)		14,2 ± 1,9 (n=3)	12,5 (n=2)	11,9 ± 2,8 (n=5)	15,1 ± 8,2 (n=10)	20,7 ± 5,1 (n=7)	5,0 ± 2,3 (n=5)
Estómago	5,0 (n=1)		13,7 ± 1,5 (n=3)	13,0 (n=2)	10,9 ± 2,0 (n=5)	18,7 ± 11,0 (n=10)	24,2 ± 10,3 (n=8)	5,6 ± 0,9 (n=5)
Bazo	10,8 ± 2,6 (n=5)	9,1 ± 2,2 (n=6)	17,6 ± 2,9 (n=5)	16,1 ± 7,6 (n=5)	10,4 ± 2,0 (n=5)	20,1 ± 8,6 (n=10)	26,0 ± 6,1 (n=7)	8,7 ± 1,8 (n=5)
Pulmón	5,8 ± 1,9 (n=5)	6,3 ± 1,6 (n=6)	10,3 ± 1,6 (n=5)	9,1 ± 5,1 (n=5)	7,0 ± 2,5 (n=4)	12,2 ± 7,2 (n=9)	15,6 ± 5,4 (n=8)	10,3 ± 2,4 (n=5)
Piel	7,2 ± 1,9 (n=5)	10,3 (n=2)	21,6 ± 15,3 (n=5)	16,6 ± 10,9 (n=4)	7,5 ± 2,1 (n=4)	15,8 ± 9,8 (n=9)	15,7 ± 5,2 (n=6)	15,4 ± 6,5 (n=4)
Lengua	9,4 ± 2,8 (n=5)	8,5 ± 1,9 (n=6)	14,7 ± 2,5 (n=5)	14,8 ± 6,7 (n=5)	11,2 ± 2,2 (n=5)	17,8 ± 10,8 (n=9)	19,6 ± 8,3 (n=8)	7,0 ± 1,6 (n=5)
Medula	3,3 ± 0,8 (n=5)	2,3 ± 0,9 (n=3)	8,0 ± 5,8 (n=4)	8,2 ± 6,4 (n=4)	2,0 ± 0,7 (n=4)	5,5 ± 2,4 (n=8)	6,4 ± 1,0 (n=5)	0,6 (n=1)
T/S	2,0 ± 0,5 (n=23)	1,6 ± 0,3 (n=16)	2,0 ± 0,7 (n=12)	2,0 ± 0,4 (n=19)	1,5 ± 0,2 (n=14)	1,9 ± 0,4 (n=15)	2,1 ± 0,5 (n=25)	0,5 ± 0,1 (n=15)
T/HN	2,0 ± 0,5 (n=23)	1,6 ± 0,3 (n=16)	1,9 ± 0,7 (n=12)	1,4 ± 0,3 (n=19)	1,9 ± 0,4 (n=14)	2,3 ± 0,9 (n=15)	1,8 ± 0,3 (n=25)	1,5 ± 0,3 (n=15)

Tabla 1R. Protocolos de Administración con compuestos borados individuales (BPA ó GB-10) ensayados en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX. Las concentraciones de B de las muestras de sangre y tejidos para los distintos protocolos están expresadas en ppm (media ± D.E.). Por cada animal se midieron: 12 muestras de hígado normal, 2 muestras de riñón, 2 muestras de sangre y 1 muestra de cada uno de los tejidos restantes. El número de muestras medidas por tumor dependió del tamaño del mismo. Cada animal tenía un número variable de tumores. Las relaciones de concentración de boro Tumor/Sangre (T/S) y Tumor/Hígado Normal (T/HN) se calcularon para cada tumor teniendo en cuenta el valor medio de las muestras correspondientes a ese tumor particular, y el valor promedio del hígado normal o sangrecorrespondiente a la rata que portaba dicho tumor. Los resultados están expresados como media ± D.E. de las relaciones para cada uno de los tumores. (n: indica el número de ratas o tumores).

Protocolo	9	10	11
	BPA 15,5 mg ¹⁰ B/Kg iv + GB-10 50,0 mg ¹⁰ B/Kg iv	BPA 31,0 mg ¹⁰ B/Kg ip + GB-10 34,5 mg ¹⁰ B/Kg iv	BPA 46,5 mg ¹⁰ B/Kg ip + GB-10 20,0 mg ¹⁰ B/Kg iv
Sangre	23,9 ± 7,4 (n=6)	27,6 ± 9,7 (n=6)	20,4 ± 8,6 (n=7)
Tumor	19,4 ± 6,6 (n=13)	35,1 ± 9,2 (n=23)	33,2 ± 13,4 (n=17)
Hígado Normal	12,5 ± 3,5 (n=6)	26,1 ± 13,8 (n=6)	25,0 ± 9,8 (n=7)
Riñón	53,7 ± 14,0 (n=6)	126,5 ± 25,0 (n=6)	125,9 ± 38,7 (n=7)
Intestino	12,8 ± 3,9 (n=4)	16,4 ± 7,4 (n=3)	24,8 ± 5,9 (n=7)
Estómago	15,6 ± 3,7 (n=3)	20,7 ± 4,8 (n=3)	27,0 ± 8,4 (n=7)
Bazo	16,5 ± 3,4 (n=6)	31,6 ± 9,9 (n=6)	28,6 ± 9,4 (n=7)
Pulmón	17,1 ± 5,5 (n=5)	28,3 ± 5,6 (n=6)	20,8 ± 5,3 (n=6)
Piel	25,8 ± 16,0 (n=4)	28,7 ± 13,1 (n=6)	31,1 ± 17,0 (n=6)
Lengua	15,7 ± 2,6 (n=6)	27,0 ± 9,6 (n=6)	25,3 ± 8,8 (n=7)
Medula	3,0 ± 1,0 (n=5)	4,7 ± 2,0 (n=5)	6,6 ± 3,1 (n=4)
T/S	0,9 ± 0,4 (n=13)	1,3 ± 0,3 (n=23)	1,6 ± 0,9 (n=17)
T/HN	1,7 ± 0,8 (n=13)	1,4 ± 0,5 (n=23)	1,4 ± 0,2 (n=17)

Tabla 2R. Protocolos de Administración con compuestos borados combinados (BPA+GB-10) ensayados en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX. Las concentraciones de B de las muestras de sangre y tejidos para los distintos protocolos están expresadas en ppm (media ± D.E.). Por cada animal se midieron: 12 muestras de hígado normal, 2 muestras de riñón, 2 muestras de sangre y 1 muestra por cada uno de los tejidos restantes. El número de muestras medidas por tumor dependió del tamaño del mismo. Cada animal tenía un número variable de tumores. Las relaciones de concentración de boro Tumor/Sangre (T/S) y Tumor/Hígado Normal (T/HN) se calcularon para cada tumor teniendo en cuenta el valor medio de las muestras correspondientes a ese tumor particular, y el valor promedio del hígado normal o sangrecorrespondiente a la rata que portaba dicho tumor. Los resultados están expresados como media ± D.E. de las relaciones para cada uno de los tumores. (n: indica el número de ratas o tumores).

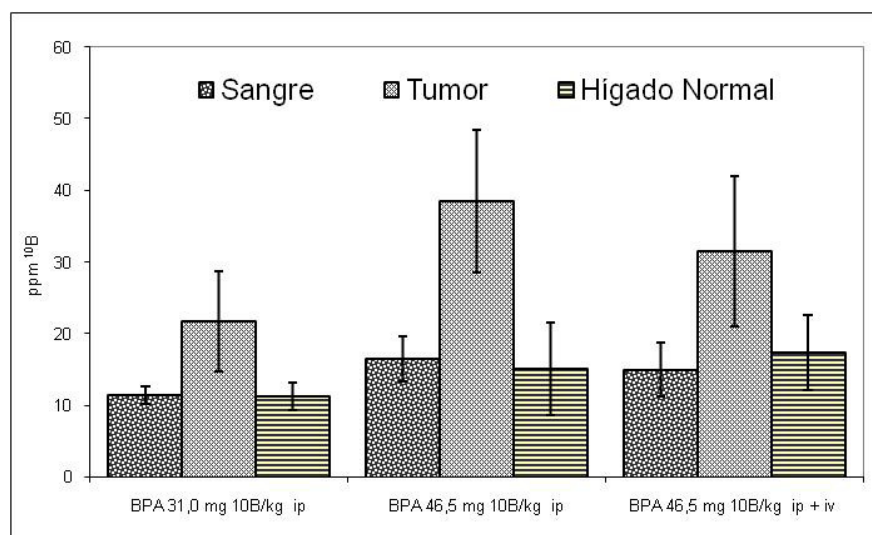


Fig. 1R. Valores de concentración absoluta de boro en sangre, tumor e hígado normal (ppm: media±D.E.) para los protocolos potencialmente útiles con administración de BPA en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX

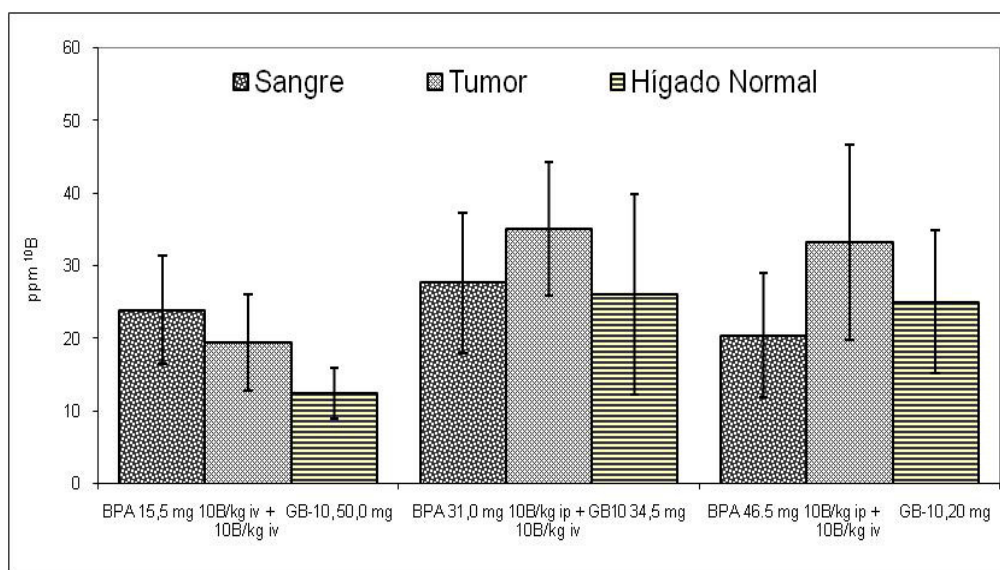


Fig. 2R. Valores de concentración absoluta de boro en sangre, tumor e hígado normal (ppm: media±D.E.) para los protocolos potencialmente útiles con administración de BPA+GB-10 en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX

Los altos valores de concentración de B en riñón obtenidos en todos los protocolos ensayados (debido a la eliminación renal de los compuestos borados) y la proximidad anatómica que presentan el hígado y los riñones en la cavidad peritoneal, sugirieron la necesidad de proteger los riñones durante la irradiación. Los protocolos que implicaron la administración intraperitoneal de compuestos borados produjeron la presencia de exceso de líquido con B residual en la cavidad peritoneal, en el momento del muestreo. El volumen de este líquido fue variable y difícil de muestrear de forma fiable. La concentración de boro absoluta en el líquido intraperitoneal fue extremadamente variable (aproximadamente entre 10 a 150 ppm). Debido a la amplia variabilidad en el volumen del líquido intraperitoneal, el muestreo no fiable y el hecho de que no se observó una correlación entre el contenido de boro en la muestra medida y el valor de concentración de B en el tumor, los valores de concentración de boro en el líquido intraperitoneal sólo se emplearon como evidencia de la presencia de boro residual en la cavidad peritoneal. Este hallazgo evidenció la conveniencia de lavar la cavidad peritoneal para eliminar el boro residual antes de las irradiaciones y así evitar posibles daños adicionales a los tejidos normales que se encuentran dentro del peritoneo. Dentro de éste contexto, se prestó particular atención al intestino. A pesar de que éste exhibió una captación relativamente baja de boro para todos protocolos (Tablas 1R y 2R), las reacciones de captura neutrónica que ocurren en los átomos de boro residuales en la cavidad peritoneal son especialmente peligrosos para la capa única de células individuales que posee el intestino. Cabe señalar que la relevancia clínica del contenido de boro en cada uno de los tejidos normales dependerá del blanco de tratamiento y de la configuración de irradiación, lo cual debe ser considerado dentro de cada contexto particular. Por ello, además de conocer los valores

de concentración de boro en tumor, los datos de biodistribución de boro en los tejidos normales son de utilidad para evaluar la viabilidad de BNCT en diferentes patologías y localizaciones.

1.1.1 Discusión

El presente estudio muestra la biodistribución de dos portadores de boro para BNCT, BPA y GB-10, ambos aceptados para su uso en seres humanos, en un modelo experimental de metástasis hepáticas en ratas BDIX. El objetivo de éste estudio fue optimizar la entrega de compuestos borados al tumor con el uso de diferentes niveles de dosis, vías de administración y combinaciones de distintos compuestos borados.

Una de las estrategias más eficaces para optimizar BNCT es maximizar la entrega de boro al tumor. Por el contrario, el incremento de la exposición a los neutrones, genera un aumento de la dosis de fondo no específica que reciben los tejidos normales y el tejido tumoral por igual, sin originar beneficios, en términos de ventaja terapéutica en tumor. Sin embargo, la captación preferencial del compuesto borado por el tejido tumoral, puede no ser tan esencial para el éxito de BNCT, como clásicamente está descrito en la literatura (Coderre et al. 1998). Estudios previos demostraron que en el caso de BNCT mediado por el compuesto borado GB-10 (químicamente no selectivo), la letalidad al tumor sería el resultado del daño selectivo a los vasos sanguíneos aberrantes de tumor, en lugar de la captación selectiva del B en las células tumorales (Trivillin et al. 2006). Por lo tanto, cuando se requiere establecer el potencial clínico de un posible protocolo de administración, se prestará especial atención al contenido de boro absoluto del tumor.

El efecto biológico de BNCT dependerá de los factores de eficacia biológica relativa (RBE) de las componentes de dosis de irradiación de alto LET y de las componentes de dosis de bajo LET, del tejido en estudio y del parámetro de evaluación. Asimismo, la microdistribución de diferentes compuestos borados determinará la eficacia biológica relativa de un compuesto borado. Como se definió en el inciso 2.1 de la Introducción, los factores de RBE para la componente de dosis boro de la reacción de captura $^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$ se denominan factores de eficacia biológica del compuesto (CBE) (Morris et al. 1994). Dentro de este contexto, los factores de RBE y CBE para las diferentes componentes de dosis de BNCT le darán al valor de la concentración de boro un significado especial, en términos de efectos biológicos. De esta forma, aunque los protocolos de administración de compuestos borados para BNCT se basan en los resultados de biodistribución y en conocimientos radiobiológicos anteriores, el potencial terapéutico de un compuesto portador de ^{10}B solamente puede ser interpretado fehacientemente en estudios radiobiológicos de BNCT *in vivo*.

La administración combinada de dos portadores de boro con diferentes propiedades y mecanismos de captación, contribuiría a una distribución de boro más homogénea en tumores heterogéneos (Heber et al. 2006). Por esta razón, los protocolos ensayados en el presente estudio que implicaron la administración combinada de BPA y GB-10 son interesantes para los estudios de BNCT *in vivo*, ya que BNCT mediado por BPA+GB-10 combinaría mecanismos de acción tanto

celulares como vasculares, los cuales estarían dirigidos a provocar daño tumoral por vías complementarias (Trivillin et al. 2006).

Sobre la base de los lineamientos que establecimos para determinar el potencial terapéutico de un posible protocolo de administración de compuesto borado (inciso 2.3 de la Introducción), seis de los protocolos ensayados indicaron que podrían ser potencialmente útiles para estudios de BNCT *in vivo*. Además, uno de los protocolos (Protocolo 2: BPA 15,5 mg¹⁰B/kg iv) fue previamente ensayado por otro grupo (Roveda et al. 2004.) en el mismo modelo experimental, determinando los valores de concentración de boro en tumor e hígado normal por una técnica diferente de medición de boro (espectrometría alfa), en lugar de la técnica de ICP-OES utilizada en ésta tesis. Los valores de concentración de boro en hígado normal estuvieron dentro del rango reportado en el presente estudio. Sin embargo, se encontraron diferencias en los valores de concentración de boro en tumor. El hecho de que los valores de concentración de boro en el tumor fueron más altos que los valores informados en ésta tesis, podría atribuirse a la diferencia de las técnicas de medición del boro, ya que en el estudio de Roveda et al. (2004), los valores de concentración de boro en tumor se corrigieron según la presencia de células tumorales no viables y estroma en las muestras, originando así un valor de concentración de boro en tumor mayor que los valores reportados en ésta tesis.

Se realizaron los cálculos de dosis de los protocolos seleccionados para evaluar la viabilidad de la realización de estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX en la facilidad térmica del RA-3, caracterizado previamente (Miller et al. 2009; Pozzi et al. 2009). A partir de éstos cálculos se concluyó que sería necesario utilizar un blindaje construido de carbonato de litio (enriquecido al 95% en ⁶Li, absorbente de neutrones térmicos) para proteger el cuerpo del animal mientras se expone el hígado al flujo de neutrones, a través de una ventana o apertura colimada en la tapa (Fig.3R).

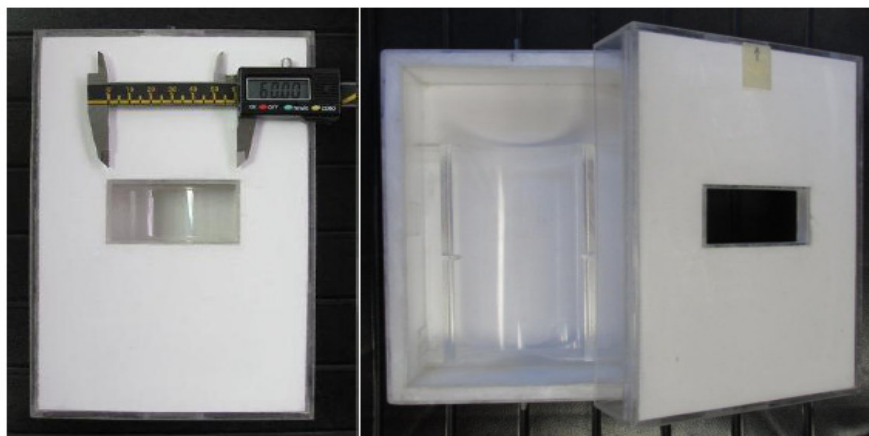


Fig. 3R. Imágenes del blindaje de neutrones de ⁶Li₂CO₃ desarrollado para la irradiación del hígado en el modelo experimental de metástasis hepáticas en ratas BDIX. En el interior se coloca una camilla de acrílico que sirve para posicionar al animal de forma reproducible. (Pozzi et al., 2009).

Sobre la base de un flujo de neutrones en campo libre de $2,22 \times 10^9$ n/cm²s en la ubicación del hígado y una tasa de dosis gamma en aire de 7,4 Gy/h en el sitio de irradiación, los protocolos de administración de los compuestos borados seleccionados entregarían, en un rango de tiempo de exposición de 27-42 minutos, una dosis física mínima absorbida total (sin corregir por los valores de RBE y CBE), de 14 Gy al tumor y una dosis absorbida total máxima de 11 Gy al hígado normal. Dado el alto contenido de boro en los riñones y su proximidad al hígado, el protocolo de tratamiento podría incluir el uso de lengüetas de acrílico para distanciar artificialmente los riñones de la abertura del colimador durante la irradiación. La dosis absorbida total del riñón posicionado dentro del blindaje, para el mismo rango de tiempo de exposición, no excedería los 13,5 Gy. Estos rangos de dosis absorbidas están dentro del intervalo de dosis terapéuticamente útil reportado para las metástasis hepáticas (Zonta et al. 2006) y el intervalo de dosis segura reportado para el hígado y el riñón normal (Cardoso et al. 2007; Zonta et al. 2006).

Otro órgano de importancia que debe ser considerado en la terapia con BNCT dentro del volumen de irradiación en el modelo de metástasis hepáticas en ratas BDIX es el intestino, ya que la colitis por radiación es un efecto adverso potencial agudo que debe ser controlado con atención (Suzuki et al., 2012). Por lo tanto, se sugiere el lavado de la cavidad peritoneal con solución fisiológica, para eliminar el boro residual antes de las irradiaciones y así evitar posibles daños adicionales a los tejidos normales que se encuentran dentro del peritoneo, por ejemplo los intestinos.

1.1.2 Conclusión

En el presente estudio se identificaron, según los resultados de biodistribución de boro, seis protocolos de administración de compuestos borados potencialmente útiles para el tratamiento con BNCT en el modelo experimental de metástasis hepáticas en ratas BDIX.

Además, los valores de concentración absoluta media de boro en los tejidos normales estudiados, podrían ser utilizados en los cálculos de dosis para estimar la viabilidad y/o eficacia terapéutica de BNCT en otros tipos tumorales y localizaciones, analizando los tejidos limitantes de dosis correspondientes en cada caso.

1.2 Estudios de Biodistribución en el modelo de metástasis pulmonares difusas en ratas BDIX con BPA, GB-10 y BPA + GB-10

No se observaron efectos tóxicos con ninguno de los protocolos de administración de boro ensayados en el modelo de metástasis pulmonares difusas en ratas BDIX. La Tabla 3R muestra los resultados de la concentración de boro media absoluta ([B]) expresada en ppm medida por ICP-OES, de los diferentes tejidos y las relaciones de concentración de B Metástasis/Pulmón (M/P) y Metástasis/Sangre (M/S), para los protocolos con compuestos borados individuales BPA ó GB-10 y protocolos de administración con compuestos borados combinados BPA+GB-10.

Los cinco protocolos estudiados mostraron captación de boro preferencial por el tejido tumoral respecto del pulmón normal (M/P: 1,2-1,9).

Los valores de [B] en el tumor para los protocolos 2 (BPA, 46,5 mg ¹⁰B/kg, ip), 4 (BPA, 46,5 mg ¹⁰B/kg, ip + GB-10, 20,0 mg ¹⁰B/kg, iv) y 5 (BPA, 31 mg ¹⁰B/kg, ip + GB-10, 34,5 mg ¹⁰B/kg, iv) variaron entre 23 y 76 ppm. Los valores de concentración de boro en tumor para los protocolos 1 (BPA, 18,0 mg ¹⁰B/kg, ip) y 3 (GB-10, 50,0 mg ¹⁰B/kg, iv) mostraron valores de concentración de boro sub-óptimos ([B]≤20 ppm) de aproximadamente 13 ppm.

Los valores de concentración de boro en sangre correspondientes a los protocolos que incluyeron GB-10 fueron iguales o mayores que los valores de concentración de boro en tumor.

Para todos los protocolos, la concentración de boro en los tejidos sanos dentro del volumen de tratamiento para BNCT de pulmón *in situ* (ej. pulmón, médula espinal, piel, corazón, timo, diafragma y músculos intercostales), fueron en general iguales o menores que los valores de concentración de boro en tumor.

Protocolo	1	2	3	4	5
	BPA 18,0 mg ¹⁰ B/Kg iv	BPA 46,5 mg ¹⁰ B/Kg ip	GB-10 50,0 mg ¹⁰ B/Kg iv	BPA 31,0 mg ¹⁰ B/Kg ip + GB-10 34,5 mg ¹⁰ B/Kg iv	BPA 46,5 mg ¹⁰ B/Kg ip + GB-10 20,0 mg ¹⁰ B/Kg iv
Sangre	6,1 ± 2,4 (n=5)	13,7 ± 2,3 (n=5)	26,8 ± 14,2 (n=6)	31,9 ± 5,9 (n=4)	77,6 ± 14,7 (n=4)
Metástasis (M)	12,0 ± 2,3 (n=17)	22,9 ± 7,2 (n=48)	12,8 ± 4,1 (n=5)	32,8 ± 8,7 (n=32)	75,7 ± 11,4 (n=18)
Pulmón (P)	nd	12,2 ± 7,2 (n=9)	10,3 ± 2,4 (n=5)	28,3 ± 5,6 (n=6)	20,8 ± 5,3 (n=6)
Pulmón (PMS)	8,1 ± 3,6 (n=5)	nd	17,4 ± 4,7 (n=12)	nd	63,8 ± 8,1 (n=4)
Piel	5,9 ± 1,7 (n=5)	18,5 ± 7,9 (n=4)	16,1 ± 8,7 (n=5)	17,4 ± 3,9 (n=3)	45,0 ± 11,2 (n=4)
Músculo Costal	10,8 ± 2,3 (n=5)	25,0 ± 2,6 (n=4)		19,5 ± 1,1 (n=3)	35,5 ± 5,8 (n=4)
Diafragma	9,5 ± 2,0 (n=5)	25,9 ± 7,7 (n=4)	4,8 ± 2,2 (n=4)	34,2 ± 5,3 (n=3)	47,2 ± 7,6 (n=4)
Xífoides	6,8 ± 2,2 (n=5)	---	9,8 ± 3,7 (n=5)	22,0 (n=1)	40,0 ± 11,1 (n=4)
Corazón	6,8 ± 2,6 (n=5)	14,9 ± 3,7 (n=4)	7,2 ± 1,4 (n=5)	18,9 ± 3,0 (n=3)	36,4 ± 8,9 (n=4)
Timo	7,5 ± 1,7 (n=5)	19,2 ± 4,7 (n=4)	4,9 ± 1,7 (n=5)	20,7 ± 6,0 (n=3)	24,5 ± 3,9 (n=4)
Médula espinal	4,3 ± 1,8 (n=5)	5,5 ± 2,4 (n=8)	1,6 ± 0,8 (n=5)	4,7 ± 2,0 (n=5)	14,7 ± 4,2 (n=3)
Hígado	7,5 ± 3,6 (n=5)	15,1 ± 6,5 (n=10)	7,2 ± 2,8 (n=5)	21,8 ± 4,5 (n=3)	52,0 ± 11,0 (n=4)
Riñón	21,4 ± 6,3 (n=5)	69,0 ± 32,1 (n=10)	23,7 ± 7,6 (n=5)	126,5 ± 25,0 (n=6)	158,6 ± 32,3 (n=4)
Bazo	6,0 ± 2,2 (n=4)	20,1 ± 8,6 (n=10)	8,7 ± 1,8 (n=5)	31,6 ± 9,9 (n=6)	53,5 ± 16,8 (n=4)
Intestino	7,5 ± 2,3 (n=5)	15,1 ± 8,2 (n=10)	5,0 ± 2,3 (n=5)	16,4 ± 7,4 (n=3)	39,1 ± 10,6 (n=4)
Estómago	9,6 ± 3,7 (n=5)	18,7 ± 11,0 (n=10)	5,6 ± 0,9 (n=5)	20,7 ± 4,8 (n=3)	43,9 ± 13,3 (n=4)
M/P	1,7 ± 0,4 (n=33)	1,9 ± 0,6 (n=48)	1,2 ± 0,4 (n=20)	1,2 ± 0,3 (n=32)	3,6 ± 0,5 (n=18)
M/S	2,2 ± 0,5 (n=33)	1,7 ± 0,4 (n=48)	0,6 ± 0,2 (n=20)	1,0 ± 0,3 (n=32)	0,8 ± 0,1 (n=18)

Tabla 3R. Protocolos de Administración con compuestos borados solos (BPA ó GB-10) y protocolos combinados (BPA+GB-10), ensayados en el modelo de metástasis pulmonares difusas en ratas BDIX. Las concentraciones de B de las muestras de sangre y tejidos para los distintos protocolos están expresadas en ppm (media ± D.E.). Las relaciones de concentración de boro Metástasis/Sangre (M/S) se calcularon para cada conjunto de metástasis teniendo en cuenta el valor medio de las muestras correspondientes a ese conjunto en particular, y el valor medio de sangre correspondiente a la rata que portaba dichas metástasis. En el caso de la relación de concentración de boro Metástasis/Pulmón se usó el valor de pulmón sano tomado de estudios previos de nuestro grupo (Garabalino et al., 2011) ya que el pulmón “mayormente sano” (PMS) tomado de las ratas con metástasis difusas de pulmón podría tener focos metastásicos no visibles, dando lugar a una gran dispersión en los datos. Los resultados están expresados como media ± D.E. (n: indica el número de ratas o metástasis; nd: no disponible).

A partir de éstos resultados, los protocolos 2, 4 y 5 se seleccionaron como protocolos de administración con potencialidad terapéutica, ya que tienen altos valores absolutos de concentración de boro en metástasis (>20ppm) y relaciones de concentración de boro Tumor/tejido normal >1. Estos protocolos serían candidatos para realizar evaluaciones radiobiológicas en estudios de BNCT *in vivo*.

Con respecto a la evaluación de las concentraciones de B considerando la posibilidad de la técnica de BNCT *ex situ*, la Tabla 4R muestra los valores de concentración de boro para las muestras de pulmón y metástasis perfundidas, en comparación con los valores para las muestras correspondientes de tejido no perfundido, expresadas en ppm ± D.E. La perfusión indujo una reducción estadísticamente significativa (test t de Student ≤ 0,0006) en la concentración de boro

en las metástasis y el tejido pulmonar, lo cual implicó un aumento en la relación de concentración de boro metástasis/pulmón (M/P) de 1,9 a 3,0.

Protocolo	1	2
	BPA 46,5 mg ¹⁰ B/Kg ip	BPA 46,5 mg ¹⁰ B/Kg iv c/Perfusión Local
Sangre	13,7 ± 2,3 (n=5)	11,7 ± 1,9 (n=3)
Metástasis (M)	22,9 ± 7,2 (n=48)(*)	11,2 ± 2,3 (n=23)(*)
Pulmón (P)	12,2 ± 7,2 (n=9)(*)	3,7 ± 3,1 (n=15)(*)
M/P	1,9 ± 0,6 (n=48)	3,0 ± 0,6 (n=23)

Tabla 4R. Protocolos de administración con BPA con o sin perfusión local. Las concentraciones de B de las muestras de sangre y tejidos están expresadas en ppm (media ± D.E.). Las relaciones de concentración de boro Metástasis/Pulmón (M/P) se calcularon para cada conjunto de metástasis teniendo en cuenta el valor medio de concentración de boro de las muestras correspondientes a ese conjunto en particular, y el valor medio de pulmón correspondiente a la rata que portaba dichas metástasis. Los resultados están expresados como media ± D.E., de las relaciones para cada una de las metástasis. (n: indica el número de ratas o metástasis). (*) Test t Student $p \leq 0,0006$.

1.2.1 Discusión

Tanto el GB-10 como el BPA están aprobados para su uso en seres humanos por la Food and Drug Administration (F.D.A.) y por lo tanto son particularmente interesantes para su evaluación en modelos experimentales (ej., Molinari et al, 2011; Kankaanranta et al, 2012). Hasta la fecha sólo se ha utilizado al BPA como portador único de boro para BNCT en metástasis pulmonares difusas. Dentro de la propagación característica en los valores de concentración de boro, los resultados reportados en el presente estudio para el protocolo 1 (BPA 18 mg B/kg iv) se encontraron dentro del rango de valores publicados previamente para BPA, suponiendo una corrección lineal, para las diferentes dosis de boro administradas (Suzuki et al., 2007; Bortolussi et al, 2011). Debido a nuestra vasta experiencia con GB-10 en el modelo del hámster, su probada eficacia terapéutica en tumor con escaso efecto en tejido normal (sobre la base de un efecto selectivo sobre los vasos sanguíneos tumorales aberrantes en lugar de una captación tumoral selectiva), su falta de toxicidad a dosis altas y la facilidad de manipuleo del compuesto (por ejemplo, Trivillin et al., 2006)) nos llevó a realizar los presentes experimentos con GB-10, BPA y BPA+GB-10. Dada la similitud en el mecanismo de incorporación de BSH y GB-10 a las células (mediante el mecanismo de difusión), la larga trayectoria en ensayos clínicos en seres humanos de BSH (ej. Yamamoto et al., 2008) y los resultados obtenidos en el presente estudio, sería importante llevar a cabo en un futuro, estudios de biodistribución y eficacia terapéutica de BNCT con GB-10 en ensayos clínicos.

Teniendo en cuenta que las estrategias actuales de tratamiento para diferentes patologías de cáncer no han logrado mejorar la supervivencia como se esperaba, BNCT surge como una modalidad de tratamiento digna de evaluación. En la radioterapia convencional externa, es difícil

administrar dosis curativas a las células malignas pulmonares sin causar neumonitis por radiación en el pulmón sano (Suzuki et al., 2007). En ésta situación, BNCT puede ofrecer un gradiente de dosis entre las células tumorales y normales, ya que los átomos de ^{10}B se acumulan preferentemente en las células tumorales. Por otra parte, el hecho de que BNCT se basa en un targeting biológico, en lugar de geométrico, lo hace ideal para el tratamiento de micrometástasis indetectables e infiltración de células tumorales (ej. Bortolussi et al., 2011; Pozzi et al., 2012). Además, con el tratamiento de BNCT no es necesario realizar ajustes debido a los movimientos respiratorios habituales del paciente (Bortolussi et al., 2011).

Si se trataran con BNCT una gran cantidad de diseminaciones metastásicas pulmonares de células grandes, acopladas a un control tumor significativo después de realizar BNCT, se debe considerar la potencial toxicidad en términos de reacciones inflamatorias agudas potencialmente inducidas en los pulmones por los restos de células muertas y productos de degradación asociados. Dentro de este contexto, la neumonitis por radiación podría ser más grave de lo previsto en base a la dosis administrada (Bakeine et al., 2009). Este fenómeno se observó en los pacientes con metástasis hepáticas tratados con BNCT *ex situ* (Zonta et al., 2006) y debe ser considerada dentro de las complejidades de la prescripción de dosis en BNCT. Sin embargo, esta cuestión no ha sido abordada en profundidad hasta la fecha.

Sobre la base de los datos de biodistribución que demostraron ser potencialmente útiles, se evaluó la viabilidad de realizar tratamientos de BNCT *in vivo* en el modelo experimental de metástasis pulmonares en ratas BDIX, en la facilidad térmica del RA-3 (Miller et al., 2009). Se determinó que para realizar las irradiaciones era necesario diseñar, construir y caracterizar un dispositivo de protección (blindaje) adecuado, construido a partir de $^6\text{LiCO}_3$, para proteger el cuerpo del animal durante la exposición de neutrones de la zona del pulmón, a través de una abertura colimada (Razetti et al., 2014). Los cálculos dosimétricos se basaron en los datos de biodistribución del protocolo 2 (BPA a 46,5 mg $^{10}\text{B}/\text{kg}$, ip) y los datos de flujo de neutrones térmicos para el dispositivo de protección fueron tomados del trabajo de Bortolussi et al., 2011. Las restricciones de dosis impuestas al pulmón sano fueron que la dosis máxima sea menor a 18.6 Gy_w , la dosis media menor a 9.1 Gy_w y que menos del 30% del volumen pulmonar reciba 9,1 Gy_w . Las restricciones de dosis también se impusieron a los órganos más sensibles expuestos a través de la abertura colimada, es decir, el corazón (dosis máxima < 10.4 Gy_w) y la médula espinal (dosis máxima < 13 Gy_w). Las restricciones de dosis adoptadas por los órganos de riesgo se tomaron del informe QUANTEC para la terapia de fotones convencional (Bentzen et al., 2010) y, cuando fue necesario, se tradujeron las dosis de fracciones individuales y las relaciones alfa/beta utilizando el modelo LQ.

Las dosis se calcularon empleando valores de factores de RBE y CBE para BPA previamente informados: CBE de 1,4 para pulmón (Kiger et al., 2008), CBE de 3,8 para el tumor (Coderre et al., 1993), CBE de 2,5 para piel (González et al., 2004), y un factor de RBE para neutrones de 3 para todos los tejidos (Kiger et al., 2008). Sobre la base de estas consideraciones dosimétricas y un tiempo medio de irradiación de 20 minutos, el pulmón recibiría una dosis media de $6,7 \pm 1,7 \text{ Gy}_w$ y una dosis máxima de $9,5 \pm 2,6 \text{ Gy}_w$ y el volumen de planificación de tratamiento (teniendo en

cuenta todo el pulmón como metástasis) recibiría una dosis media de $18,6 \pm 4,6 \text{ Gy}_w$ y una dosis máxima de $27,7 \pm 7,1 \text{ Gy}_w$. Dentro de este contexto, el tratamiento con BNCT en la facilidad térmica del RA-3 para metástasis pulmonares experimentales, sería factible y potencialmente terapéutico sin exceder la radiotolerancia en el pulmón sano.

La técnica de BNCT *ex-situ*, la cual se basa en la irradiación extracorpórea y autotrasplante, permite optimizar la distribución de dosis (Zonta et al., 2006; Wortmann y Knorr, 2012), merecería mayor cantidad de estudios. Dentro de este contexto, los datos de biodistribución obtenidos en los órganos perfundidos sugieren una posible reducción en la concentración de boro y deben tenerse en cuenta al realizar los cálculos de dosis para los tratamientos con BNCT *ex-situ* de metástasis pulmonares difusas.

1.2.2 Conclusión

El presente estudio mostró el potencial valor terapéutico de diferentes protocolos de administración de compuestos borados (BPA, GB-10 y BPA+GB-10) en el modelo de metástasis pulmonares difusas en ratas BDIX. Tres de los cinco protocolos evaluados presentaron una captación de boro en metástasis preferencial respecto del tejido normal (M/P) y de la sangre (M/S) y los resultados de valores absolutos de concentración de boro en tumores estuvieron dentro del rango potencialmente terapéutico ($[B] \geq 20 \text{ ppm}$), permitiendo considerarse su evaluación radiobiológica en estudios de BNCT *in vivo*.

De igual manera, para evaluar la homogeneidad de captación y localización del boro y para establecer la correlación espacial entre el contenido de boro y la invasión tumoral en muestras de pulmón (ej. Bortolussi et al., 2011) sería beneficioso realizar estudios de microdistribución de boro complementarios por la técnica de autorradiografía neutrónica.

Con respecto al ensayo de perfusión, en un órgano pequeño, la técnica implica ciertas restricciones que pueden causar que el órgano sufra un exceso de retención del líquido, aumentando artificialmente la reducción post-perfusión de la concentración de boro medida. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio no son concluyentes, pero sí sugieren que existirían posibles cambios en la concentración de boro en los órganos perfundidos, los cuales deben tenerse en cuenta al realizar los cálculos de dosis para los tratamientos que impliquen el tratamiento con BNCT *ex-situ* y que por lo tanto requieran la perfusión del órgano explantado con solución de preservación para mantener su funcionalidad hasta el momento en que se reimplante post-BNCT.

1.3 Estudios de Biodistribución en el modelo de pulmón sano de oveja

La Fig. 4R muestra los resultados del estudio de cinética de captación de boro para sangre de la oveja 4 ajustados siguiendo el modelo de cinética abierto de dos compartimentos usado para humanos y reportado en Kiger et al. (2001). La concentración de boro en la sangre alcanzó un valor máximo al final de la infusión de $49,5 \pm 7,8 \mu\text{g/g}$ y a los 65 minutos luego de fin de infusión el valor fue de $16,9 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$. Luego comenzó a decrecer exhibiendo el comportamiento bi-exponencial esperado.

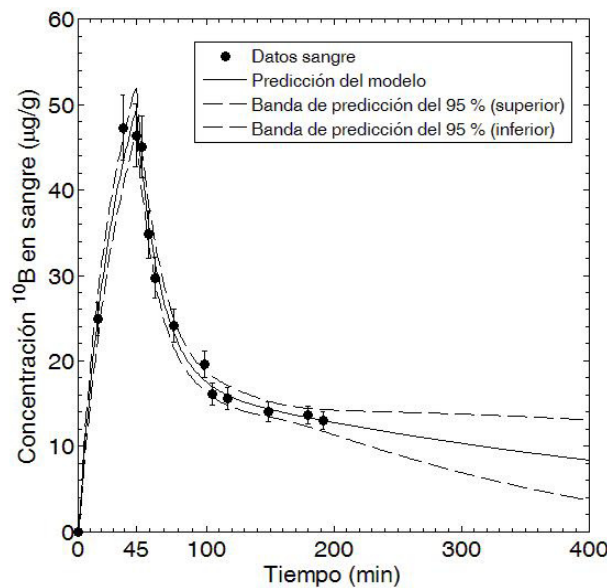


Fig. 4R. Perfil de concentración de boro medido en función de tiempo junto con el ajuste correspondiente para sangre de la oveja 4. Se muestran los errores experimentales de $\pm 8\%$ y las bandas de confianza del 95%.

Los parámetros del modelo obtenidos para el perfil de concentración de boro en sangre fueron $k_1 = 0,22 \text{ min}^{-1}$ (constante de equilibrio 1), $k_2 = 0,012 \text{ min}^{-1}$ (constante de equilibrio 2), $k_3 = 0,0068 \text{ min}^{-1}$ (constante de eliminación) y $V_d = 0,00247 \text{ Kg/Kg}$ (volumen de distribución), encontrándose éstos valores dentro de los parámetros promedio ($\pm 1\sigma$) reportados por Kiger et al.(2000).

Por otro lado, según lo mencionado en el inciso 6.4 de la Introducción de ésta tesis, realizamos la experiencia de perfusión de pulmón en ovejas, para evaluar la concentración absoluta de boro en ese órgano luego de los procesos de escisión, lavado y perfusión requeridos en el procedimiento de irradiación *ex-situ*. Previo a la realización del explante, lavado y perfusión de cada pulmón, se tomaron 6 muestras de cada uno de los pulmones (izquierdo a las 2 h y derecho a las 3 hs post administración del BPA) de la oveja 4 con el objetivo de evaluar la captación de boro pre-explante sin perfusión (Tabla 5R).

Oveja 4		
	Pulmón izquierdo	Pulmón derecho
Media	27,1	24,1
D.E.	2,7	2,1
n	6	6

Tabla 5R. Resultados de la concentración de B de los pulmones izquierdo y derecho antes de realizar el procedimiento de explante del órgano (D.E.: desviación estándar; n: número de muestras).

Luego de llevarse a cabo el procedimiento de lavado y perfusión de los pulmones, se sacaron muestras de diferentes sitios de cada órgano y se midieron las concentraciones de B por la técnica de ICP-OES (Tabla 6R).

Oveja 4		
	Pulmón izquierdo post explante, lavado y perfusión (ppm)	Pulmón derecho post explante, lavado y perfusión (ppm)
Muestra 1	14,5	13,6
Muestra 2	8,4	11,8
Muestra 3	8,3	16,2
Muestra 4	6,7	13,9
Muestra 5	7,4	16,3
Muestra 6	6,0	12,4
Muestra 7	8,5	13,4
Muestra 8	13,6	15,1
Muestra 9	8,8	13,0
Muestra 10	10,0	12,7
Muestra 11	11,3	13,5
Muestra 12	8,2	14,3
Muestra 13	10,4	12,5
Muestra 14	5,7	
Muestra 15	11,1	
Muestra 16	7,7	
Media ± D.E (n)	9,2 ± 2,5 (n=16)	13,7 ± 1,4 (n=13)

Tabla 6R. Resultados de la concentración de B de los pulmones izquierdo y derecho de la oveja 4 en ppm luego de realizar el procedimiento de explante, lavado y perfusión del órgano (D.E.: desviación estándar; n: número de muestras).

Estos valores de concentración de B de los pulmones explantados y perfundidos de la oveja 4, fueron comparados con los obtenidos en los ensayos de perfusión realizados anteriormente en las ovejas 2 y 3 (Farias y Garabalino et al., 2015). La Fig. 5R presenta los resultados de las mediciones de las muestras obtenidas en cada pulmón perfundido, y las franjas correspondientes al valor medio de la concentración de boro ($\pm 8\%$) para los pulmones (derecho e izquierdo) de la oveja 4 y los pulmones de las ovejas 2 y 3.

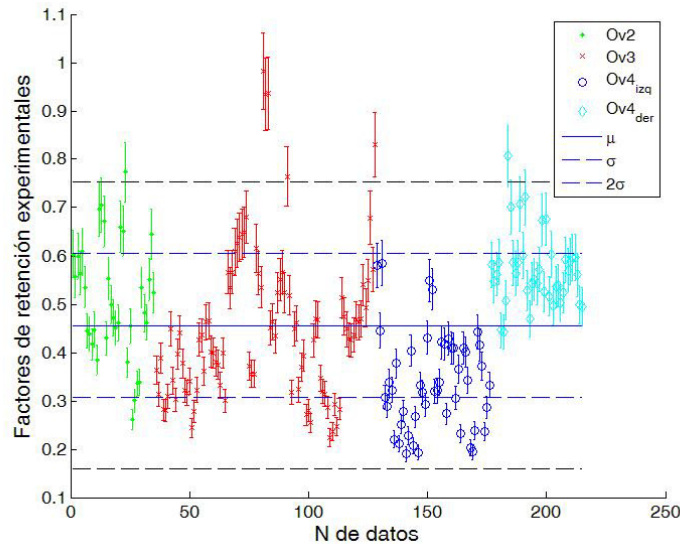


Fig.5R Comparación de la concentración de boro en los pulmones (izquierdo y/o derecho) de las ovejas 2, 3 y 4. Cada punto representa el valor medio de la concentración de boro en cada una de las muestras del pulmón explantado y perfundido, con el error asociado ($\pm 8\%$), de la oveja 2 (verde), 3 (rojo) y 4 (azul y celeste).

Se observó que en más del 95% del total de las muestras medidas (n de muestras de ovejas 2 y 3 = 128; n de muestras de oveja 4 = 29; n total de muestras de las ovejas 2,3 y 4 = 157), la concentración de boro de los cuatro pulmones perfundidos de las tres ovejas, se encuentran dentro del intervalo $\pm 2\sigma$.

La concentración de B en los pulmones perfundidos es similar a los ensayos anteriores (Farias y Garabalino et al. 2015) donde también se muestra que la captación de BPA es uniforme en ambos pulmones. En este contexto, calculamos el porcentaje de boro retenido en cada uno de los pulmones de la oveja 4 luego de los procesos de escisión, lavado y perfusión, expresándolos como Factor de Retención (según el inciso 6.3 de Materiales y Métodos), obteniéndose los valores de $0,34 \pm 0,10$, para pulmón izquierdo y $0,57 \pm 0,08$ para pulmón derecho.

La Fig. 6R muestra las distribuciones empíricas de los factores de retención de BPA de los pulmones de las ovejas 2,3 y 4 por separado y de los cuatro lóbulos pulmonares de las 3 ovejas juntas (considerando las 157 muestras tomadas) luego del procedimiento de perfusión, ajustadas adecuadamente a partir de distribuciones log-normales.

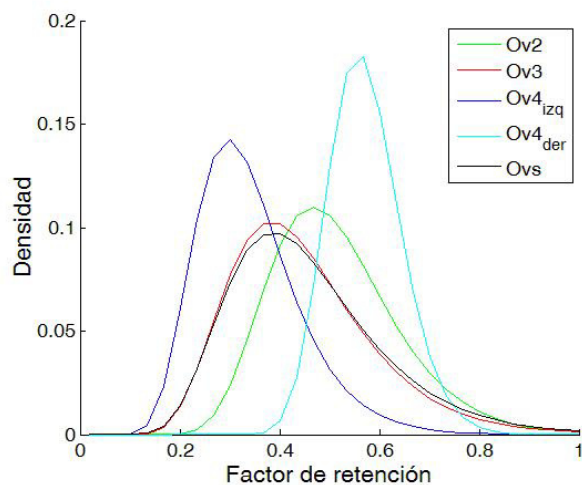


Fig.6R Funciones de densidad de probabilidad de los factores de retención a partir de los datos empíricos de los pulmones perfundidos de la oveja 2 (Ov2: verde), 3 (Ov3: rojo) y 4 (Ov4_{der}: celeste y Ov4_{izq}: azul) y del conjunto de las 157 muestras tomadas de los 4 pulmones perfundidos (Ovs: negro).

De éstos resultados se puede inferir que la perfusión arterial del órgano con las soluciones que aseguran las condiciones de preservación generaría, de forma inevitable, una distribución de boro remanente no homogénea en el órgano explantado. También se observó que el valor de factor de retención (f_R) de todas las muestras de pulmón perfundidas fue de $0,46 \pm 0,15$, lo cual sugiere que un amplio porcentaje del volumen pulmonar retiene alrededor de la mitad de la concentración de boro alcanzada pre-perfusión.

1.3.1 Discusión

Se pudo determinar que los resultados de los valores de k en sangre para la oveja 4 se encontraron dentro de los parámetros promedio ($\pm 1\sigma$) reportados previamente por nuestro grupo de trabajo (Farías y Garabalino et al., 2015) y por Kiger et al. (2001) para 10 pacientes tratados por BNCT a los que se le administró la misma dosis de BPA que la considerada en los estudios en oveja.

La concentración de boro en sangre para el modelo animal, 60 minutos luego del fin de infusión, fue de $16,9 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$. Este valor fue muy similar a los valores de concentración media de boro en sangre reportados en humanos, cercanos a $20 \mu\text{g/g}$ (Farías y Garabalino et al., 2015), para la misma dosis de BPA y el mismo tiempo post-administración. Estos resultados sugieren que el modelo animal se ajusta al humano. Por lo tanto, se sugiere que el modelo pre-clínico en animal grande sería un sustituto adecuado para inferir la cinética y captación de compuestos borados en humanos.

Los resultados de los perfiles de concentración de boro en pulmón medidos en el trabajo previo de Farías y Garabalino et al., 2015; sugieren fuertemente que la distribución de BPA es

espacialmente homogénea en dicho órgano. El hecho de que la relación Pulmón/Sangre (P/S) permanezca casi constante en el momento en que comienza la fase de liberación lenta, permitiría que la concentración sanguínea de boro se use como una cuantificación indirecta de la concentración de boro estimada en el pulmón sano explantado. Estas relaciones serían muy valiosas en un escenario clínico debido a la complejidad ya veces la imposibilidad de medir la concentración de boro en pulmón durante el tratamiento. Cabe destacar que los estudios de biodistribución se realizaron utilizando ambos pulmones, haciendo que los resultados sean igualmente válidos para el pulmón izquierdo y derecho.

El modelo animal preclínico propuesto para éste ensayo también permitió el estudio del pulmón explantado. Se esperaba que la concentración de boro disminuyera como resultado de la aplicación del protocolo de conservación, mediante perfusión, requerido para preservar la función del pulmón tratado para ser reimplantado. En éste trabajo se obtuvo la distribución del factor de retención de boro después de la perfusión de órganos para cuatro pulmones sanos provenientes de tres ovejas. El valor del factor de retención que resulta del análisis de los 4 pulmones sanos explantados de las ovejas y los datos de pulmón perfundido en el modelo de metástasis pulmonares difusas en ratas BDIX mostrados en Resultados de ésta tesis (inciso 1.2) indican que la perfusión genera una pérdida de más del 50% del boro incorporado. Los factores de retención obtenidos en el modelo animal pequeño para pulmón sano y tumor fueron de $0,33 \pm 0,31$ y $0,49 \pm 0,18$, respectivamente. En este modelo, la pérdida del compuesto borado en el pulmón sano parecería ser superior a la pérdida que ocasiona la perfusión en tumor, aunque ésta diferencia no alcanzó significancia estadística. Cabe aclarar que, debido a las complicaciones técnicas asociadas con la perfusión del pulmón en el modelo de animal pequeño, es posible que el órgano retenga un exceso de fluidos, disminuyendo en forma artificial la concentración de boro en el tejido sano.

Los estudios de biodistribución de BPA realizados con ovejas adultas normales mostraron que la cinética del boro en sangre, pulmón y piel representaría adecuadamente el comportamiento y la captación absoluta del boro esperada en tejidos humanos, proporcionando así valores que pueden ser usados en cálculos dosimétricos (Farías y Garabalino et al, 2015). El estudio de la cinética del boro en un único animal grande por muestreos sucesivos proporciona un perfil cinético "verdaderamente *in vivo*", al contrario de lo que ocurre en el caso de los estudios de biodistribución realizados en animales pequeños, donde el perfil cinético se reconstruye a partir de los datos correspondientes de diferentes grupos de animales eutanasiados en diferentes momentos.

1.3.2 Conclusión

Este trabajo aborda los requisitos preclínicos y la viabilidad de BNCT para el tratamiento de tumores pulmonares difusos considerando un nuevo procedimiento de irradiación *ex situ*. Las nuevas ideas derivadas de este trabajo eran inexistentes hasta la fecha y son absolutamente necesarias para iniciar el estudio de radiotolerancia de pulmón sano utilizando BNCT.

Los resultados presentados en éste trabajo refuerzan la hipótesis según la cual el modelo pre-clínico en animal grande sería un sustituto adecuado para inferir la cinética y captación del compuesto en humanos y así poder determinar una dosimetría precisa y segura para los pacientes.

1.4 Estudio de Biodistribución en el modelo de cáncer oral en hámster con BSH

Los resultados de la variación en el peso corporal durante el estudio de toxicidad con BSH en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster, se muestran en la Fig. 7R.

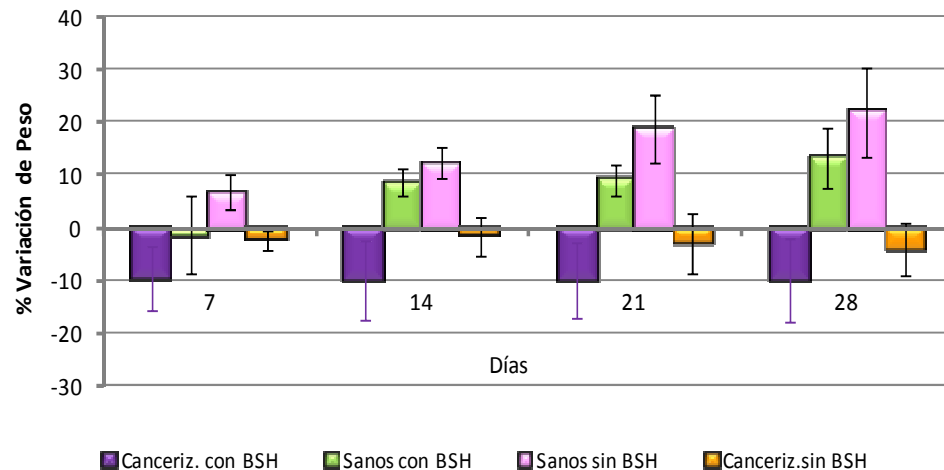


Fig.7R Resultados de la variación en el peso corporal durante el ensayo de toxicidad del BSH en el modelo de cáncer oral en hámster. Variación del peso corporal durante un período de 28 días con o sin administración de BSH 50 mg¹⁰B/Kg iv en animales sanos o cancerizados con DMBA.

Se pudo observar que los animales sanos (no cancerizados) inyectados o no con el compuesto borado, aumentaron de peso de forma gradual en un porcentaje que varió entre 6,8 y 22 % a lo largo de un período de 28 días. En cambio, en el caso de los animales cancerizados a los cuales no se les administró BSH, se pudo notar una disminución del peso corporal de entre 1,6 y 2,4 %. Una diferencia aún más notoria se observó en los hamsters cancerizados inyectados con la solución de BSH. En éste grupo las disminuciones del peso corporal estuvieron alrededor del 10 % a los 7 días post-administración de BSH. Además, podemos mencionar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de hámsters cancerizados con BSH comparado con los grupos de cancerizados sin BSH y normales sin BSH. Sin embargo, se observó que, en el grupo de hámsters cancerizados que recibieron la dosis de BSH 50 mg¹⁰B/Kg iv, la disminución de peso fue estadísticamente significativa vs los animales sanos sin la administración de BSH a los 7, 14, 21 y 28 días ($p= 0,0455$, $p= 0,0259$, $p= 0.0176$ y $p= 0,0251$, respectivamente). Además se encontró una variación de peso corporal a los 14 días entre el grupo de hámsters cancerizados sin BSH y normales sin BSH ($p=0,0249$). Entre los grupos de hamsters normales con o sin administración de BSH, no se notaron diferencias de peso significativas. A pesar que al final del período de 28 días los animales cancerizados con BSH no recuperaron el peso perdido, no se observaron cambios en los signos clínicos y demás aspectos considerados en la evaluación de toxicidad (aspecto general, pelaje, movilidad, síntomas neurológicos, presencia de diarrea, etc.).

Frente a éstos resultados y paradilucidar el contenido de BSH ydímeros en las soluciones de BSH nos contactamos con la firma proveedora del compuesto borado (Katchem Ltd.- República Checa) en el 14th International Congress on Neutron Capture Therapy. El Dr. Otomar Kriz gentilmente se llevó una muestra de nuestro BSH en polvo y la analizó por medio de la técnica de HPLC en las condiciones empleadas por el proveedor para estudios de control de calidad. Los resultados fueron: pureza de BSH 98,3 %, contenido de BSSB 1,3 % y contenido de BS(O)SB 0,4 %.

En base a estos resultados y estudios clínicos y experimentales en otras patologías (por ejemplo Gibson et al., 2003), se decidió utilizar el BSH 0,084 M a una dosis de BSH 50 mg¹⁰B/Kg para los estudios de biodistribución subsiguientes.

No se observaron efectos tóxicos con ninguno de los protocolos de administración analizados en los estudios de biodistribución con BSH 50 mg¹⁰B/Kg iv realizados en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. La Tabla 7R muestra los resultados del estudio cinético de la concentración de boro media absoluta ([B]) en la sangre y los diferentes tejidos, expresados en ppm como media ± D.E, medida por las técnicas de ICP-OES ó ICP-MS. La Tabla 8R muestra las relaciones de concentración de boro Tumor/Bolsa Normal (T/BN) y Tumor/Sangre (T/S), correspondientes a los diferentes tiempos ensayados con BSH a una dosis de 50 mg¹⁰B/Kg.

Protocolo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSH 50 mg¹⁰B/Kg iv									
Tiempo post adminis.	3 hs	4 hs	5 hs	6 hs	7 hs	8 hs	9 hs	10 hs	12 hs
Sangre (S)	62,5 ± 24,8 (n=5)	60,8 ± 17,0 (n=5)	37,1 ± 5,4 (n=5)	82,6 ± 15,5 (n=6)	23,4 ± 9,3 (n=5)	56,3 ± 19,0 (n=4)	31,1 ± 10,5 (n=5)	66,7 ± 10,1 (n=3)	14,4 ± 9,0 (n=5)
Tumor (T)	30,1 ± 15,0 (n=19)	26,0 ± 8,6 (n=33)	24,3 ± 9,3 (n=17)	34,2 ± 7,1 (n=18)	23,7 ± 14,0 (n=15)	28,3 ± 6,4 (n=13)	24,1 ± 7,9 (n=27)	34,7 ± 7,2 (n=7)	9,2 ± 2,4 (n=19)
Bolsa Normal (BN)	27,2 ± 11,2 (n=5)	21,4 ± 6,9 (n=5)	21,3 ± 6,4 (n=5)	30,9 ± 6,4 (n=5)	17,1 ± 10,1 (n=5)	21,7 ± 4,6 (n=4)	17,5 ± 5,9 (n=5)	27,2 ± 3,2 (n=3)	5,3 ± 2,4 (n=5)
Precan.	34,7 ± 12,4 (n=5)	30,4 ± 8,5 (n=5)	26,5 ± 8,3 (n=5)	39,5 ± 10,8 (n=5)	18,9 ± 10,5 (n=5)	25,1 ± 7,2 (n=4)	21,4 ± 7,7 (n=5)	29,9 ± 2,9 (n=3)	5,9 ± 2,7 (n=5)
Carrillo	23,7 ± 12,3 (n=5)	21,4 ± 9,4 (n=5)	16,8 ± 5,7 (n=5)	37,1 ± 26,1 (n=5)	13,7 ± 8,4 (n=5)	16,3 ± 5,1 (n=4)	22,3 ± 2,4 (n=5)	19,5 ± 5,0 (n=3)	4,2 ± 1,8 (n=5)
Paladar	40,2 ± 18,4 (n=4)	33,2 ± 12,2 (n=5)	24,3 ± 5,5 (n=5)	49,4 ± 8,6 (n=3)	18,0 ± 9,0 (n=5)	22,1 ± 5,7 (n=4)	28,2 ± 5,8 (n=5)	44,1 ± 15,4 (n=3)	8,4 ± 2,4 (n=5)
Parótida	11,3 ± 5,1 (n=5)	19,1 ± 17,8 (n=5)	10,8 ± 3,6 (n=5)	21,9 ± 11,6 (n=4)	8,6 ± 3,3 (n=4)	10,0 ± 3,9 (n=3)	7,9 ± 1,6 (n=5)	10,6 ± 0,8 (n=3)	2,6 ± 0,9 (n=5)
Lengua	29,0 ± 15,1 (n=4)	19,4 ± 11,9 (n=5)	20,4 ± 4,9 (n=5)	33,2 ± 6,0 (n=5)	17,6 ± 11,0 (n=5)	21,3 ± 6,2 (n=4)	15,7 ± 8,6 (n=5)	21,0 ± 2,8 (n=3)	4,9 ± 1,4 (n=5)
Hígado	143,1 ± 80,2 (n=5)	171,3 ± 76,7 (n=5)	94,5 ± 31,2 (n=5)	214,1 ± 86,4 (n=5)	51,1 ± 33,8 (n=5)	77,5 ± 25,1 (n=4)	76,8 ± 36,0 (n=5)	93,3 ± 38,0 (n=3)	13,5 ± 6,3 (n=5)
Bazo	23,8 ± 10,5 (n=5)	20,3 ± 10,9 (n=4)	18,5 ± 8,4 (n=5)	28,4 ± 6,0 (n=4)	11,6 ± 5,1 (n=5)	22,8 ± 3,2 (n=4)	14,4 ± 5,3 (n=5)	46,6 ± 2,5 (n=3)	4,1 ± 0,9 (n=5)
Riñón	91,0 ± 36,8 (n=5)	100,7 ± 30,6 (n=4)	112,7 ± 61,6 (n=5)	93,7 ± 35,4 (n=5)	43,7 ± 25,1 (n=5)	43,7 ± 12,5 (n=4)	65,0 ± 24,9 (n=5)	84,5 ± 22,9 (n=3)	18,6 ± 6,4 (n=5)
Pulmón	60,9 ± 28,4 (n=4)	26,8 ± 16,4 (n=4)	25,5 ± 1,2 (n=5)	40,7 ± 18,3 (n=4)	9,2 ± 3,5 (n=4)	26,6 ± 6,5 (n=4)	28,1 ± 11,0 (n=5)	32,6 ± 9,5 (n=3)	8,4 ± 2,1 (n=5)
Piel	32,8 ± 7,1 (n=5)	18,6 ± 8,6 (n=5)	25,9 ± 9,1 (n=5)	26,2 ± 15,3 (n=5)	22,6 ± 16,1 (n=5)	24,4 ± 5,3 (n=8)	17,4 ± 5,0 (n=5)	23,8 ± 4,7 (n=3)	5,7 ± 3,4 (n=5)
Médula espinal	1,1 ± 0,8 (n=4)	5,6 ± 3,9 (n=5)	4,1 ± 1,8 (n=5)	5,5 ± 2,4 (n=5)	2,2 ± 1,6 (n=5)	1,7 ± 0,4 (n=4)	4,4 ± 1,2 (n=5)	2,0 ± 0,2 (n=3)	0,7 ± 0,2 (n=5)
Cerebro	1,3 ± 1,0 (n=4)	2,2 ± 1,8 (n=4)	1,4 ± 0,5 (n=5)	4,5 ± 2,2 (n=5)	0,9 ± 0,4 (n=4)	1,3 ± 0,5 (n=4)	2,3 ± 0,8 (n=5)	0,9 ± 0,4 (n=3)	0,5 ± 0,2 (n=5)

Tabla 7R. Protocolos del estudio de biodistribución con BSH 50 mg¹⁰B/Kg ensayados en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Las concentraciones de B de las muestras de sangre y tejidos para los distintos protocolos están expresadas en ppm (media ± D.E.). (n: indica el número de hamsters o tumores).

Protocolo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BSH 50 mg ¹⁰B/Kg iv									
Tiempo post adminis.	3 hs	4 hs	5 hs	6 hs	7 hs	8 hs	9 hs	10hs	12hs
T/BN	1,3± 0,4 (n=19)	1,4± 0,4 (n=33)	1,3± 0,4 (n=17)	1,1± 0,2 (n=18)	1,8 ± 0,3 (n=15)	1,3± 0,2 (n=13)	1,4± 0,4 (n=27)	1,3± 0,2 (n=7)	1,8± 0,6 (n=19)
T/S	0,6 ± 0,2 (n=19)	0,4± 0,1 (n=33)	0,6± 0,2 (n=17)	0,4± 0,1 (n=18)	1,0± 0,2 (n=15)	0,6± 0,2 (n=13)	0,8± 0,2 (n=27)	0,5± 0,1 (n=7)	0,6± 0,4 (n=19)

Tabla 8R. Relaciones de concentración de boro Tumor/Bolsa Normal (T/BN) y Tumor/Sangre (T/S) calculadas para cada tumor, teniendo en cuenta la concentración de B en ese tumor y el valor medio de la bolsa normal o sangre correspondiente al hámster que portaba dichos tumores. Los resultados están expresados en ppm como media ± D.E., de las relaciones para cada uno de los tumores. (n: indica el número de tumores).

La concentración de boro en el tumor alcanzó un valor máximo de aproximadamente 24-35 ppm, entre 3 y 10 h después de la administración de BSH 50 mg¹⁰B/Kg. Se observó una gran dispersión en los valores de concentración absoluta de boro en tumor. La relación T/BN osciló entre 1,1 y 1,8 entre las 3 y 12 hs post administración del BSH.

Los valores de concentración de boro absoluta en tejido precanceroso se encontraron, en general, en el mismo intervalo que los valores de tejido normal de la bolsa y los tumores, en cada uno de los tiempos ensayados. Los valores de concentración de boro en sangre fueron consistentemente más altos que los valores de concentración de boro en la bolsa normal, tejido precanceroso y tejido tumoral. En los casos en que los valores de concentración de boro en muestras de sangre y tejidos se cotejaron por ICP-MS, no se encontraron diferencias significativas con los valores obtenidos por ICP-OES.

El comportamiento promedio de la concentración de boro en sangre, tejido precanceroso y bolsa normal del estudio de biodistribución con BSH 50 mg¹⁰B/Kg en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hamster se obtuvo ajustando los datos a un modelo cerrado de dos compartimentos. Se calcularon para cada uno de los ajustes los valores estadísticos de R-cuadrado (R²): 0,997 para sangre; 0,774 para bolsa normal; 0,775 para tejido precanceroso y 0,744 para tumor, mostrando que el modelo de dos compartimentos explica al menos el 74% de la variación de los datos sobre el valor medio (Fig. 8R). Cabe destacar que, a pesar de las oscilaciones que se observan en la Tabla 8R en la concentración media de boro en sangre, el modelo muestra una tendencia de decrecimiento de las concentraciones de boro con el tiempo.

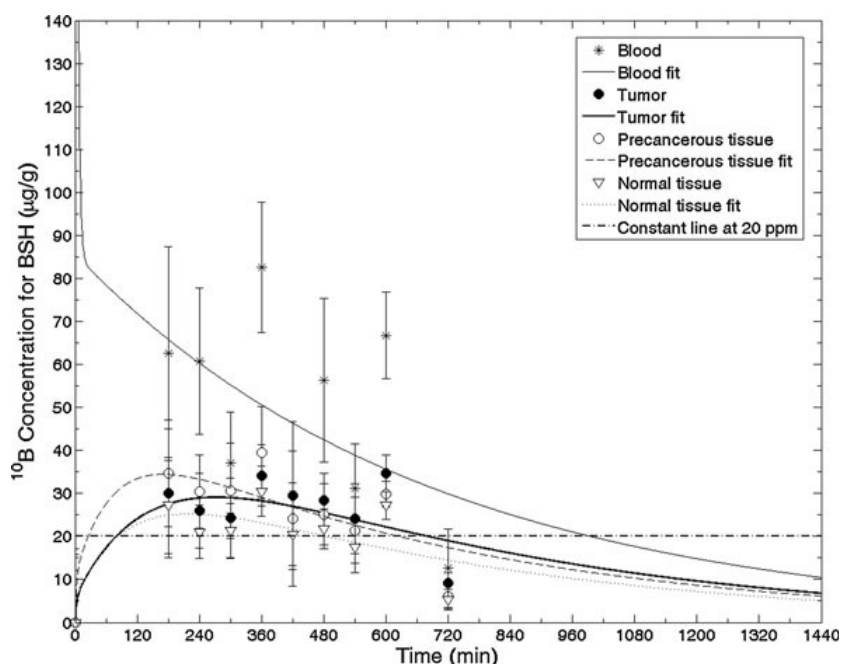


Fig. 8R. Concentración media de $^{10}\text{B} \pm \text{D.E.}$ de los diferentes tiempos ensayados para sangre, bolsa normal, tejido precanceroso y tumor, ajustados según el modelo de dos compartimentos. El ajuste se realizó con todos los valores individuales para cada tejido. Los perfiles de concentración de boro están representados en función del tiempo después de la administración de BSH $50 \text{ mg}^{10}\text{B}/\text{Kg}$. La línea punteada en el valor constante de 20 ppm indica el valor mínimo de concentración de boro en el tumor considerado terapéuticamente útil. (Obtenido de Garabalino et al., 2013)

La Fig. 9R se construyó sobre la base de las curvas ajustadas de la Fig. 8R y el objetivo fue determinar el "mejor" escenario de irradiación que optimiza el intervalo entre la administración de BSH y la irradiación con neutrones, en el reactor nuclear RA-3 (Miller et al., 2009). De acuerdo con estudios previos de las dosis toleradas en el tejido precanceroso limitante de dosis en el modelo de cáncer oral en hámster (ej. Kreimann et al 2001b; Trivillin et al., 2006), se estableció la dosis de 5 Gy como la dosis total absorbida límite para el tejido precanceroso. La Fig. 9R muestra la dosis total absorbida para diferentes tiempos de inicio del tratamiento (intervalo de tiempo entre la administración de BSH y la irradiación), la contribución de la componente de dosis de boro y la componente de dosis del sólo haz, y los tiempos de irradiación correspondientes.

Teniendo en cuenta la restricción de dosis de 5 Gy para tejido precanceroso como así también el requisito de que la concentración de boro en tumor debe ser $\geq 20 \text{ ppm}$ y que el intervalo de tiempo en el cual se haría la irradiación debe ser tal que la dosis de irradiación en tumor sea mayor que la dosis en el tejido precanceroso, el intervalo óptimo entre la administración del BSH y la irradiación con neutrones oscilaría entre 7 y 11 h (420 y 660 min). El tiempo de irradiación para alcanzar una dosis terapéutica sería de entre 5 y 6 min. Debido a las oscilaciones en los valores aparentes de concentración de boro en sangre, ésta no fue utilizada como una restricción para determinar el intervalo óptimo de irradiación. Sin embargo, el intervalo

entre 7 y 11 h post administración del BSH se superpone con los valores de boro en sangre dentro del rango más bajo.

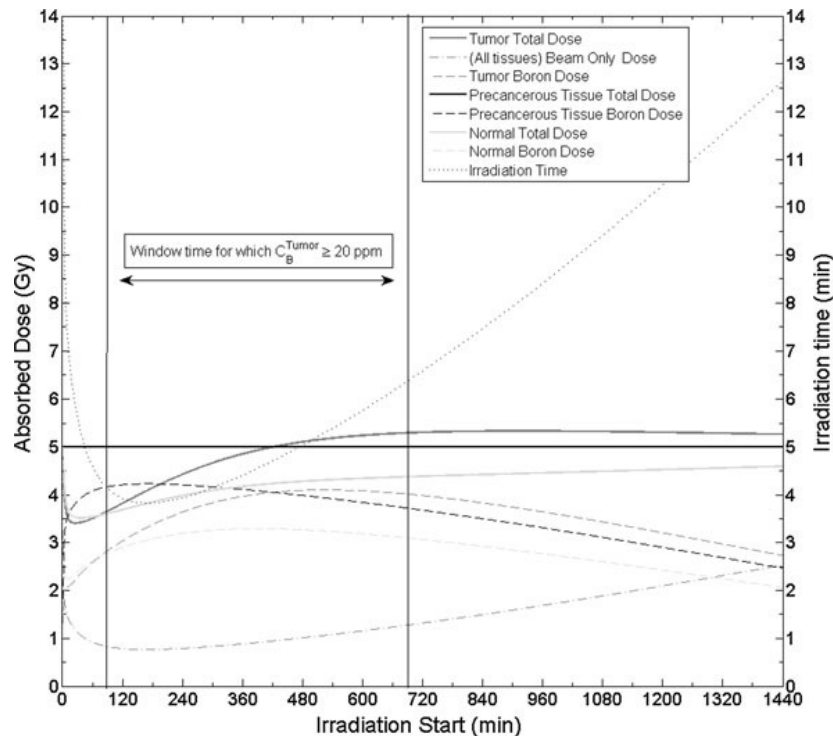


Fig.9R. Representación de la dosis total absorbida en tumor (línea sólida de color gris oscuro), entejiado precanceroso (línea negra sólida en 5 Gy) y en bolsa normal (línea sólida de color gris claro) para diferentes tiempos (post-administración de BSH) de inicio de irradiación. También se muestra la contribución de la componente de dosis de boro en el tumor (línea oscura gris discontinua), tejido precanceroso (línea negra discontinua) y en bolsa normal (línea gris clara discontinua) y la contribución de la componente de dosis de sólo haz para todos los tejidos (línea gris oscura con puntos de trazas). El tiempo de irradiación se representa en función del tiempo de inicio (línea negra punteado) (Obtenido de Garabalino et al., 2013).

Los elevados valores de concentración absoluta media de boro en riñón (ej. $112,7 \pm 61,6$ ppm) e hígado (ej. $214,1 \pm 86,4$ ppm) sugieren la necesidad de proteger estos órganos si se encuentran dentro del volumen de tratamiento.

1.4.1 Discusión

Se conoce que el riñón es el principal órgano excretor de BSH del cuerpo (Sweet et al., 1986). Esto se pudo comprobar ya que la concentración residual de boro en el riñón superó varias veces a los encontrados en otros órganos (Janku et al., 1993). Además el BSH produciría un efecto directo sobre el nefrón del riñón y por éste motivo, se producirían disturbios en la función renal y cardiovascular (LaHann et al., 1996) y una anemia asociada con la administración como una

consecuencia secundaria de un déficit de eritropoyetina, derivado del daño de los sitios de producción de la misma situados en las células peritubulares del riñón (Janku et al., 1993).

En estudios previos pre-clínicos realizados con BSH en conejos (Janku et al., 1993) se detectaron severas lesiones nefróticas luego de inyecciones diarias repetidas de BSH con dosis de 25 y 50 mg/Kg. Luego a través de las mediciones del clearance de insulina y el volumen de orina excretado se observó que una administración de dosis simple de BSH (como las sugeridas para estudios clínicos), podía inducir cambios en la función renal reversibles en riñones de ratas sanas (Horn et al., 1997). Estos resultados sugirieron que la presencia del grupo dianiónico sulfhidrilo (SH⁻) fuertemente nucleofílico del BSH es responsable de los efectos diuréticos y de la reducción de la tasa glomerular de filtración. Sin embargo, se sospechó que estos efectos podrían deberse a algunas impurezas presentes en la solución de BSH (1,1 % de BSSB). Con el fin de dilucidar si la presencia del grupo SH⁻ o de las impurezas en la solución de BSH eran las responsables de los efectos nefrotóxicos, Horn y colaboradores repitieron los experimentos en ratas utilizando polvo de BSH, cuyo proveedor (Centronic Ltd., Inglaterra), garantizaba la presencia de menos del 0,5% de dímeros. Ellos encontraron que las alteraciones de la función renal serían independientes del origen del borocaptato, así como del contenido de sus productos oxidados en la preparación. Aunque no se puede excluir un efecto directo de BSH sobre el nefrón, parece que los cambios en la función renal en la rata están mediados, al menos en parte, por alteraciones en la función del sistema cardiovascular, como describió LaHann et al. (1996). Según estos autores, la elevación inicial de la presión arterial debido a un efecto inotrópico positivo en el corazón y un aumento masivo de la resistencia periférica, que resulta en una redistribución significativa del flujo sanguíneo periférico, es seguida por hipotensión. Por otra parte, sería difícil conectar los cambios observados de la función renal a nivel molecular con la estructura de la "jaula de borohidruro" en sí. Sin embargo, es más probable que la presencia del grupo dianiónico SH⁻ altamente nucleófilo sea responsable de los efectos descritos por la reacción con sitios de macromoléculas biológicas deficientes en electrones, a saber proteínas (ej. Nakagawa y Nagai, 1976 a,b,c ;Zhu-Tang et al., 1995). Dicha visión puede estar respaldada por la toxicidad varias veces mayor del borocaptato en comparación con la toxicidad del anión simple de dodecaburohidrato B₁₂H₁₂ (Soloway et al., 1967).

Por otro lado, los estudios de Marshall y colaboradores (1989) mostraron que una disminución del peso corporal en ratas con gliomas inyectadas con el dímero BSSB (dosis 490 mg/Kg), de hasta el 16 %, podría ser atribuida a efectos hepatotóxicos reversibles en los primeros días post administración del dímero BSSB. En base a éstos antecedentes y los anteriormente mencionados, nosotros podemos considerar que los resultados de los estudios de toxicidad realizados con la solución de BSH (98,3 % BSH, 1,3 % BSSB y 0,4% BS(O)SB)) en éste trabajo coincidirían parcialmente con los de Marshall y colaboradores (1989). En nuestro caso la dosis administrada de BSSB, en base a su % en la solución de BSH, sería de 0,65 mg/Kg. En estos niveles de dosis de BSSB no se observaron síntomas de toxicidad en los animales durante los 28 días de seguimiento.

Con respecto a la conservación del BSH, el proveedor del mismo (Katchem Spol S.R.O.) especifica que mientras el BSH se encuentre en forma sólida, es estable por al menos 16 meses, si

es almacenado protegido de la luz y el oxígeno a temperatura ambiente. Los primeros productos de oxidación son el dímero BSSB ($\text{Na}_4[\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SSB}_{12}\text{H}_{11}]$) y el sulfóxido BS(O)SB ($\text{Na}_4[\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{S(O)SB}_{12}\text{H}_{11}]$), que aparecen 4 días después de haber preparado la solución para su administración. Por lo tanto, las soluciones de BSH pueden ser almacenadas a temperatura ambiente, sólo por unos pocos días. Por éste motivo, ellos realizaron ensayos para estudiar si se podría evitar la formación del dímero y sus óxidos. Para ello, prepararon soluciones de BSH (con ningún contenido de dímero u óxido, medido por la técnica de cromatografía líquida de alta performance, HPLC) usando agua estéril (filtrada con filtro de porosidad $0,22 \mu\text{m}$), y viales donde se colocarían las soluciones, previamente burbujeados con gas nitrógeno (N_2), para desplazar las moléculas de oxígeno que estuvieran presentes. Una vez colocados un tapón de goma y uno de aluminio en los viales, las soluciones de BSH fueron almacenadas a temperatura ambiente o en freezer a -22° durante 6 meses, en cámaras en ausencia de oxígeno. Ellos demostraron mediante ensayos de HPLC que durante éste lapso de tiempo, no se detectó la presencia del sulfóxido BS(O)SB en las soluciones almacenadas a baja temperatura, pero existía un 2,0% de dímero BSSB, unos minutos después de haber roto el septum del vial, donde la solución tuvo acceso al oxígeno del aire. En cambio, en las soluciones almacenadas a temperatura ambiente se reportó la presencia de 2,9 % del dímero BSSB, sólo a cinco días de su almacenamiento. Por otro lado, la presencia de altos contenidos de BSSB en la solución fresca, confirma el peligro de oxidaciones catalíticas en presencia de algunos metales. Ellos concluyeron que a pesar de los recaudos en la conservación y preparación de las muestras de BSH, siempre existía una probabilidad de que se formen dímeros y óxidos de dímero.

Debido a éstos resultados y que al principio de nuestros experimentos el polvo de BSH, una vez preparadas las soluciones en condiciones anóxicas (descrito en Materiales y Métodos), era conservado en la heladera a 4°C , sin ninguna protección frente a la presencia de oxígeno, decidimos que nos resultaría de gran utilidad determinar la posible presencia de dímeros y óxido de BSH. Nosotros intentamos realizar estudios de HPLC para determinar el contenido de BSSB o BS(O)SB de las soluciones utilizadas en ésta tesis, pero fracasamos debido a que no se pudieron realizar en las mismas condiciones que especificaba el proveedor por falta de equipamiento y reactivos. Por lo tanto, como mencionamos anteriormente, el proveedor determinó, a pedido nuestro, mediante HPLC, la pureza del polvo de BSH y el contenido de impurezas (98,3 % BSH, 1,3 % BSSB y 0,4 % BS(O)SB) concluyendo que a pesar que existía la presencia de dímero ésta se encontraba en su límite máximo permitido de 1,1 % (Gabel, 1993). Debido a todas las razones expuestas decidimos, una vez realizadas las soluciones, guardar el polvo de BSH en un atmósfera libre de oxígeno. Para ello, insuflamos un globo con nitrógeno gaseoso (N_2) y dentro de él colocamos el BSH. Además, las soluciones de BSH utilizadas en los estudios de biodistribución en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, se prepararon y se administraron antes de doce horas de transcurrida su elaboración.

Los valores de concentración de boro en tumor obtenidos en el estudio de biodistribución con borocaptato de sodio, empleado como único portador de boro, entre las 3 hs y 10 hs post administración del mismo, a una dosis de $50 \text{ mg }^{10}\text{B/kg}$ (88 mg BSH/kg) en el modelo de cáncer

oral del hámster, se encontraron dentro del rango observado en los estudios clínicos (Bendel et al. 2010) y se determinó que se hallan dentro de un rango terapéuticamente útil para realizar estudios de BNCT *in vivo* en el reactor nuclear RA-3 (Pozzi et al., 2009). Los valores absolutos de concentración de boro en tumor se asemejan a los reportados previamente para GB-10 y BPA en este modelo, pero los tiempos de retención fueron más largos (Heber et al., 2004). Como se ha descrito anteriormente para otros compuestos de boro en diferentes modelos experimentales y en diferentes tipos de tumores en pacientes (ej. Heber et al. 2004; Cardoso et al. 2009), la dispersión de los valores de concentración de boro en tumor entre los animales individuales fue grande. No se observó una captación preferencial del tumor en ninguno de los tiempos ensayados. Sin embargo, esto no implica necesariamente que el compuesto no deba ser elegido como un portador de boro único para tratamientos con BNCT. Posiblemente, podría actuar selectivamente en el tumor a través de daño selectivo en los vasos sanguíneos aberrantes de tumor, de manera similar al compuesto borado GB-10 (Trivillin et al., 2006). Los elevados valores de concentración de boro en sangre obtenidos en el presente trabajo podrían implicar un riesgo potencial de daño vascular (Wittig et al., 2009). No obstante, la concentración de boro alta en sangre podría contribuir a un daño selectivo a tumor ya que favorecería el daño selectivo a nivel estructural y funcional de los vasos sanguíneos tumorales alterados, preservando al mismo tiempo los vasos sanguíneos del tejido normal y del tejido precanceroso, como fuera descrito anteriormente en los estudios de BNCT mediado por GB-10 (Trivillin et al., 2006).

A pesar del gran uso del BSH en ensayos *in vivo* y clínicos, se conoce muy poco acerca de los mecanismos por los cuales, éste compuesto se acumula en las células tumorales (Kageji et al., 1998). Kageji y colaboradores, en el año 2002, elaboraron una hipótesis acerca de la captación del BSH en células del sistema nervioso. Ellos propusieron que el BSH ingresaba a las células tumorales de glioma a través de la BHE dañada e interactuaba con las membranas celulares formándose un complejo entre el BSH y las fosfatidilcolinas de las membranas. Luego, éste complejo ingresaba al citoplasma y podía atravesar eventualmente la membrana nuclear. De ésta manera, el boro es retenido dentro del núcleo y citoplasma de las células tumorales y gradualmente es eliminado, lo cual explicaría la presencia de boro en éstas células en tiempos relativamente largos (aproximadamente 48 hs).

Si bien en el presente trabajo se observó que el BSH no se incorporó preferencialmente a los tumores exofíticos de la bolsa de la mejilla del hámster, esto coincide con lo observado en estudios previos por otros grupos (ej. Obayashi et al., 2004). La naturaleza difusiva de BSH contribuiría a una distribución más homogénea de boro en tumor (Ono et al., 1999; Obayashi et al., 2004), siendo ésta una cuestión fundamental para la eficacia terapéutica de BNCT. Además, el BSH se incorporaría a las células quiescentes que característicamente son refractarias a la incorporación de BPA (Ono et al., 1996).

Las similitudes entre los valores de concentración de boro para BSH del presente trabajo y los obtenidos con GB-10 (Heber et al. 2004) en éste mismo modelo experimental de cáncer oral, en términos de niveles de incorporación al tumor y la falta de selectividad, puede atribuirse al mecanismo similar de incorporación por difusión pasiva descrito para ambos compuestos borados

(Heber et al., 2004; Yoshida et al., 2002). Sin embargo, no deberían descartarse la existencia de mecanismos alternativos de captación de boro (Neumann et al., 2002).

Si bien la dispersión característica de los valores de concentración de boro ha sido ampliamente reportada para diferentes compuestos de boro y en diferentes tipos de tumores (ej. Trivillin et al., 2006), las oscilaciones en los valores medios de boro en función del tiempo observadas en el presente estudio de cinética con BSH (en particular para la sangre y también en otros tejidos como el hígado) fueron inesperados. Dado que es imposible tomar muestras secuenciales del mismo animal experimental durante un período de 12 hs, las mediciones realizadas en función del tiempo en distintos lotes de animales tienen cierto grado de incerteza. El conocimiento disponible a la fecha no nos brinda una explicación de las oscilaciones observadas, si fueran reales y se produjeran en los animales individuales a lo largo del tiempo. Los efectos beneficiosos (Trivillin et al., 2006) o perjudiciales de los valores altos de concentración de boro en sangre sólo pueden ser determinados en estudios de BNCT *in vivo*.

Debido al alto contenido de boro en el riñón y en el hígado, debe prestarse especial atención a la protección de estos órganos durante la irradiación con neutrones. Sin embargo, suponiendo que estos niveles de concentración del compuesto no son químicamente tóxicos en sí mismos, estos valores no serían una preocupación para el tratamiento de tumores de cáncer de cabeza y cuello, ya que el riñón y el hígado no se encontrarían dentro del volumen de tratamiento. En particular, en el caso del modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, el cuerpo del animal está protegido por un blindaje de neutrones durante la irradiación con el haz de neutrones mientras que se expone la bolsa con tumores (ej. Molinari et al., 2011).

Los valores de concentración de boro de BSH en sangre, tumor y tejidos normales obtenidos en el presente estudio tienden a ser más altos con tiempos de retención más prolongados que los reportados para otros modelos experimentales con niveles de dosis similares (ej. Wittig et al., 2009; Obayashi et al., 2004; Ichikawa et al., 2009; Yoshida et al., 2008). Sin embargo, son similares a los valores de concentración de boro en pacientes con gliomas luego de la infusión iv de BSH (50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$) (Goodman et al., 2000). Estas diferencias en los valores de concentración de boro se pueden atribuir al modelo experimental empleado y a diferencias en el protocolo de administración (en bolo vs infusión). Las variaciones también podrían deberse al hecho de que el método utilizado para determinar las concentraciones de boro utilizado en la presente tesis, no puede distinguir entre las concentraciones que derivan del fármaco original (BSH) y las de los metabolitos de compuestos borados y / o productos de oxidación (ej. BSSB) que podrían haberse formado en el animal *in vivo* (Gibson et al., 2003). Además, podría también contribuir a éste efecto el hecho de que la retención del dímero BSSB es significativamente más larga, que la del monómero de BSH (Elhanati et al., 2001). Por supuesto, otras fuentes de variación no pueden ser descartadas en éste contexto.

1.4.2 Conclusión

En éste estudio de biodistribución con BSH (50 mg $^{10}\text{B}/\text{Kg}$) se obtuvieron concentraciones de boro terapéuticamente útiles para el tratamiento con BNCT en el modelo experimental de

cáncer oral. Los presentes datos de biodistribución sugieren al BSH como potencial portador único de boro para el tratamiento de tumores de cáncer de cabeza y cuello con BNCT. Además se pudo establecer la viabilidad del tratamiento con BNCT-BSH en la facilidad térmica del Reactor Nuclear RA-3 para el modelo experimental de cáncer oral.

El conocimiento de los valores de concentración de boro en órganos como riñón, hígado, bazo, pulmón, médula espinal y cerebro contribuyen a evaluar el riesgo potencial de toxicidad asociado a BNCT en tejidos normales, para el tratamiento de otros tumores en sitios distintos de los de cáncer de cabeza y cuello.

1.5 Estudios de Biodistribución en el modelo de cáncer oral en hámster con BSH+BPA

La Tabla 9R muestra los valores absolutos de concentración de boro para sangre y tejidos obtenidos del estudio de biodistribución con BSH+BPA en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Teniendo en cuenta los tejidos que serían clínicamente más relevantes en el caso de cáncer de cabeza y cuello, la concentración media de boro se encontró dentro del mismo rango de valores para los 3 protocolos ensayados (BSH 50,0 mg¹⁰B/Kg iv + BPA 15,5 mg¹⁰B/Kg ip; BSH 34,5 mg¹⁰B/Kg iv + BPA 31,0 mg¹⁰B/Kg ip; BSH 20,0 mg¹⁰B/Kg iv + BPA 46,5 mg¹⁰B/Kg ip), tanto en el tumor (70-85 ppm) como en el tejido precanceroso (47-68 ppm), y bolsa normal (43-66 ppm). Los valores de la concentración de boro en médula espinal y cerebro fueron igualmente bajos para los 3 protocolos, con valores medios que oscilaron entre 6 y 11 ppm.

Con respecto a la captación preferencial de boro del tumor vs el tejido normal de la bolsa (T/BN), para los 3 protocolos, se obtuvieron relaciones que oscilaban entre 1,5 y 2. No se encontraron diferencias en la concentración de boro en el tejido precanceroso entre los protocolos ensayados con BSH+BPA. Donde sí hubo diferencias de captación de boro entre los distintos protocolos fue en la sangre: protocolo 1 (80,0 ± 11,0 ppm), protocolo 2 (122,1 ± 34,5 ppm) y protocolo 3 (42,7 ± 9,1 ppm).

Protocolo	1	2	3
	BSH 50,0 mg ¹⁰ B/Kg iv + BPA 15,5 mg ¹⁰ B/Kg ip	BSH 34,5 mg ¹⁰ B/Kg iv + BPA 31,0 mg ¹⁰ B/Kg ip	BSH 20,0 mg ¹⁰ B/Kg iv + BPA 46,5 mg ¹⁰ B/Kg ip
Sangre (S)	80,4 ± 10,7 (n=5)	122,1 ± 34,5 (n=3)	42,7 ± 9,1 (n=3)
Tumor (T)	71,0 ± 38,3 (n=21)	85,2 ± 15,0 (n=14)	85,2 ± 20,4 (n=3)
Bolsa Normal (BN)	41,1 ± 6,8 (n=5)	66,2 ± 20,2 (n=3)	43,3 ± 4,5 (n=3)
Precan.	58,9 ± 11,6 (n=5)	68,2 ± 12,1 (n=3)	46,6 ± 7,7 (n=3)
Médula Espinal	8,2 ± 2,0 (n=5)	9,2 ± 4,0 (n=3)	8,9 ± 2,0 (n=3)
Cerebro	5,8 ± 1,6 (n=5)	9,5 ± 3,3 (n=3)	11,3 ± 1,5 (n=3)
Piel	43,1 ± 12,2 (n=5)	60,3 ± 8,7 (n=3)	48,3 ± 9,4 (n=3)
Hígado	258,7 ± 15,3 (n=4)	274,3 ± 33,6 (n=3)	55,5 ± 12,9 (n=3)
Riñón	116,1 ± 18,4 (n=4)	205,9 (n=2)	86,5 (n=2)
Pulmón	41,6 ± 8,2 (n=5)	53,0 ± 12,6 (n=3)	26,0 ± 9,8 (n=3)
T/BN	1,7 ± 0,8 (n=21)	1,5 ± 0,5 (n=14)	2,0 ± 0,5 (n=3)
T/S	0,9 ± 0,5 (n=21)	0,8 ± 0,3 (n=14)	2,1 ± 0,8 (n=3)

Tabla 9R. Protocolos de administración de BSH+BPA ensayados en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Las concentraciones de B de las muestras de sangre y tejidos para los distintos protocolos están expresadas en ppm (media ± D.E.). Las relaciones de concentración de boro Tumor/Bolsa Normal (T/BN) y Tumor/Sangre (T/S) se calcularon para cada tumor en particular teniendo en cuenta el valor medio de las muestras correspondientes a ese tumor, y el valor medio de bolsa normal o sangrecorrespondiente al hámster que portaba dichos tumores. Los resultados están expresados en valores de media ± D.E., de las relaciones para cada uno de los tumores. (n: indica el número de hamsters o tumores).

1.5.1 Discusión

Basándonos en estudios de BNCT previos realizados por nuestro grupo de trabajo en el modelo de cáncer oral de bolsa de la mejilla del hámster empleando los compuestos BPA y GB-10 (Kreimann et al., 2001b; Pozzi et al., 2009; Trivillin et al., 2004; 2006), definimos pautas para establecer el valor terapéutico potencial de los protocolos de administración evaluados (inciso 2.2.2 de la Introducción). Se sabe que si la concentración absoluta de boro en tumor es alta, se podrán realizar irradiaciones de tiempos más cortos, logrando una reducción concomitante en la dosis de fondo (Coderre y Morris, 1999) que afecta en forma similar al tumor y los tejidos normales que se encuentran dentro del volumen de tratamiento. El grado de selectividad de incorporación del compuesto borado a tumor es decir la relación de concentración de boro T/BN, fue similar para los tres protocolos en los tiempos post-administración estudiados.

Se sabe que el BPA se incorpora selectivamente a tumor en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster, aunque lo hace de forma heterogénea (Kreimann et al., 2001a; Heber et al., 2006). Dentro de este contexto, la co-administración de BPA y BSH sería una opción acertada para mejorar la captación selectiva de boro en el tumor y optimizar la homogeneidad en la distribución (Ono et al., 1996; Obayashi et al., 2004; Wittig et al., 2009). Por ejemplo, Yokoyama en el año 2006, reportó que existía mayor acumulación de B en gliomas en ratas cuando se administraba en forma conjunta BSH (100 mg/Kg) y BPA (500 mg/Kg), alcanzando valores de concentración de B en tumor suficientemente altos, manteniendo un nivel seguro de concentración de boro en cerebro y sangre. Además, la coadministración de BPA y BSH mostró una relación de concentración de boro Tumor/Tejido Normal mayor que con la administración de BPA solo. Curiosamente, la coadministración de BSH y BPA proporcionó una concentración de boro relativamente más alta de lo esperado, tanto en el tejido tumoral como en la sangre, es decir, la concentración de boro obtenida por la coadministración produjo niveles más altos que la que correspondería a la mera suma de cada compuesto administrado separadamente. Aunque estos resultados son consistentes con los ensayos realizados en el modelo de glioma en ratas por el grupo de Barth y colaboradores (Barth et al., 1996), todavía no se ha determinado el mecanismo de éste fenómeno. Además no se ha resuelto si se el efecto del aumento de captación de boro por la coadministración sólo se produce en modelos experimentales de roedores o si se aplica también a los modelos humanos.

Por otro lado, se conoce que otra característica de la captación de boro en el tumor que condiciona el resultado terapéutico de BNCT es la microlocalización de ^{10}B en los tejidos (Santa Cruz y Zamenhof, 2004; Smith et al., 2001). Nosotros estimamos que podrían existir diferencias potenciales entre los tres protocolos con BSH+BPA ensayados en términos de eficacia terapéutica y/o radiotoxicidad debido a las diferencias en la homogeneidad y microdistribución de boro que no pueden ser evidenciadas por las técnicas de medición de boro con ICP-OES. Además, la combinación de compuestos borados con mecanismos de incorporación diferentes, generarían distintos factores de eficacia biológica del compuesto (CBE) que afectarían posiblemente la respuesta de los tejidos a BNCT (Coderre y Morris, 1999).

El papel radiobiológico de las diferencias en los valores de boro en la sangre aún no se ha determinado. Aunque los valores altos de concentración de boro en sangre observados en este trabajo implicarían un riesgo potencial de daño vascular (Wittig et al., 2009), podrían potenciar el daño selectivo, a nivel estructural y funcional, de los vasos sanguíneos tumorales alterados, mientras se preservarían los vasos sanguíneos del tejido normal y del tejido precanceroso.

1.5.2 Conclusión

Podemos concluir que los tres protocolos de administración de BSH+BPA ensayados en el presente estudio con una dosis de boro total entre 65,5 – 66,5 mg¹⁰B/Kg, proporcionaron un contenido de boro similar en el tumor para todos los casos, y serían potencialmente terapéuticos para ser utilizados en BNCT.

Dados los resultados alentadores obtenidos en los estudios de eficacia terapéutica de BNCT en el modelo de cáncer oral en hámster con GB-10 como portador único de boro y la combinación de BPA+GB-10, administrados en forma conjunta, sin radiotoxicidad asociada al tejido precanceroso y al tejido normal (Trivillin et al. 2006), los resultados de biodistribución con BSH+BPA del presente estudio, ameritan realizar estudios de BNCT *in vivo*.

1.6 Estudio de Biodistribución en el modelo de cáncer oral con liposomas MAC y liposomas MAC+TAC

Las proporciones de animales con signos de toxicidad correspondientes a los diferentes lotes de liposomas MAC+TAC administrados en bolo o con la técnica Syringe infusion, empleados en el ensayo de toxicidad se muestran en la Tabla 10R.

	Lote 1	Lote 2	Lote 3 bolo c/ agit.	Lote 3 Inf c/agit.	Lote 4 bolo Frasco 1 c/agit.	Lote 4 inf Frasco 1 c/agit.	Lote 4 bolo Frasco 1 agit. 30 dias antes	Lote 4 Sin agit. Frasco 2, Tº Amb.	Lote 5 c/agit. Tº Amb.
+	2	1	2	3	1	1	0	0	1
-	0	1	4	3	1	1	3	3	5
Tox	2/2	1/2	2/6	3/6	1/2	1/2	0/3	0/3	1/6

Tabla 10R. Resultados de los ensayos de toxicidad con liposomas MAC+TAC. (+: con signos de toxicidad; -: sin signos de toxicidad; Tox: relación entre animales con toxicidad/animales sin toxicidad)

Los signos de toxicidad clínicos fueron: muerte súbita inmediatamente post-inyección del compuesto, aumento de la temperatura corporal, dificultad en la inyección por obstrucción de la vena, coloración azul-grisácea alrededor de la herida o en la boca (Fig. 10R), contracción involuntaria de la pata derecha (del mismo lado que se administra el compuesto) y evidencia de dolor, permanencia de rigidez en la extremidad contraída; a partir de las 24 hs post administración de los liposomas se notó la presencia de necrosis en bolsa cancerizada y en la zona de la herida por exposición de la vena yugular para realizar la inyección, inicio del proceso de gangrena en patas y/o manos (Fig. 10R), y mal estado general del animal.

La observación de los síntomas descritos en el párrafo anterior fue errática, es decir no todos los animales presentaron todos los síntomas. Los resultados de los estudios realizados con los Lotes 1, 2 y 3 se obtuvieron con la solución de los liposomas fríos, recién sacados de la heladera y los porcentajes de toxicidad oscilaron entre 33 % y 100%. Se pudo observar que del Lote 4 con administración en bolo ó infusión de la solución de liposomas fríos del Frasco 1 agitados, hubo un 50% de casos con síntomas de toxicidad. Al contrario, con el mismo lote pero con la solución agitada 30 días antes y fría ó con la solución sin agitar y a temperatura ambiente, no se observó toxicidad. Con respecto al Lote 5, donde los liposomas fueron agitados y administrados a temperatura ambiente, el porcentaje de toxicidad disminuyó al 16,6 %. Los animales que no mostraron signos de toxicidad fueron estudiados por 28 días y luego sacrificados.

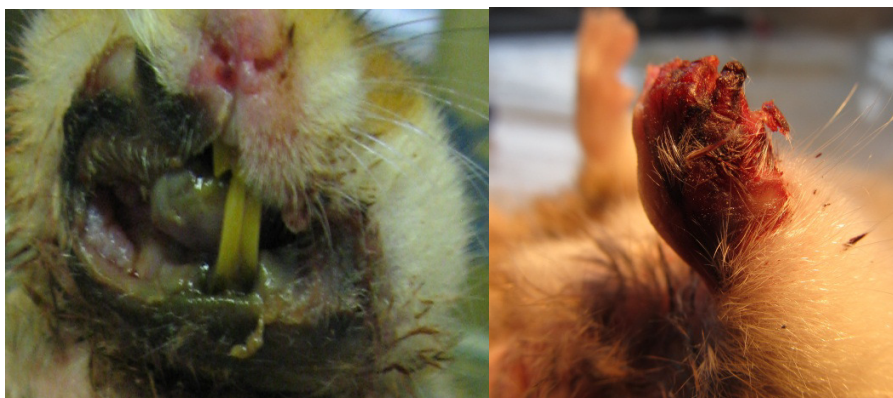


Fig. 10R Algunos signos de toxicidad presentados por la administración de liposomas MAC+TAC en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Derecha: coloración azul –grisácea alrededor de la boca; izquierda; inicio del proceso de gangrena en patas y/o manos.

En base a los resultados obtenidos de los diferentes lotes de liposomas MAC+TAC y las diversas formas de administración ensayadas, como así también cambios en la temperatura y condiciones de ausencia o presencia de agitación de la solución, se decidió que la administración de los liposomas se realizaría con la solución a temperatura ambiente y agitación mínima. En esas condiciones no se observaron signos de toxicidad post-inyección del compuesto en el transcurso de los estudios subsiguientes.

Los resultados de los estudios de biodistribución con los liposomas MAC se muestran en la Tabla 11R. Aunque el grado de selectividad en la incorporación a tumor frente al tejido normal de la bolsa fue notablemente elevado, alcanzando relaciones mínimas de concentración de boro T/BN = $12,2 \pm 5,8$, la concentración absoluta media de boro en el tumor fue sub-óptima, con valores que oscilaron entre 15-18 ppm aproximadamente. No se observó selectividad en la incorporación de boro a tumor respecto de sangre para el tiempo post administración de 16 hs. con liposomas MAC ($T/S_{16 \text{ hs.}} = 0,6 \pm 0,3$). Sin embargo, los datos sugieren una mejoría en las relaciones T/S en los protocolos de tiempo mayores ($T/S_{30 \text{ hs.}} = 0,9 \pm 0,3$ y $T/S_{48 \text{ hs.}} = 1,3 \pm 0,6$).

Con respecto a los órganos que generalmente realizan el metabolismo y eliminación de los compuestos (hígado y riñón) no se observó una acumulación importante de boro (aproximadamente entre 4-10 ppm). Lo mismo sucedió en el bazo (10-15 ppm).

Liposomas MAC (6 mg B/Kg iv)			
Protocolo	1	2	3
	16 hs.	30 hs.	48 hs.
Sangre (S)	29,1± 8,8 (n=5)	17,7± 7,7 (n=6)	14,5± 5,1 (n=5)
Tumor (T)	15,2± 7,5 (n=14)	14,6± 3,0 (n=16)	18,4± 4,1 (n=10)
Bolsa Normal (BN)	1,7± 0,9 (n=5)	1,4± 0,6 (n=6)	1,4± 0,5 (n=5)
Precan.	5,8± 2,9 (n=5)	6,9± 3,1 (n=6)	4,8± 2,0 (n=5)
Bazo	14,9± 8,5 (n=5)	12,6± 6,2 (n=6)	10,6± 2,1 (n=5)
Hígado	10,8± 4,8 (n=5)	6,6± 2,0 (n=6)	4,1± 0,7 (n=5)
Riñón	8,4± 2,4 (n=5)	4,8± 0,7 (n=6)	4,7± 1,0(n=5)
T/BN	14,6± 11,1 (n=14)	12,2± 5,8 (n=16)	14,0± 7,1 (n=10)
T/S	0,6± 0,1 (n=14)	0,9± 0,3 (n=16)	1,3± 0,6 (n=10)

Tabla 11R. Protocolos de biodistribución con liposomas MAC. Los datos se consignan para los diferentes tiempos post administración en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Las concentraciones de B de las muestras de sangre y tejidos para los distintos protocolos están expresadas en ppm (media ± D.E.). Las relaciones de concentración de boro Tumor/Bolsa Normal (T/BN) y Tumor/Sangre (T/S) se calcularon para cada tumor en particular teniendo en cuenta el valor medio de las muestras correspondientes a ese tumor, y el valor medio de bolsa normal o sangre correspondiente al hámster que portaba dichos tumores. Los resultados están expresados como media ± D.E. de las relaciones para cada uno de los tumores. (n: indica el número de hamsters o tumores).

Los resultados de biodistribución con los liposomas MAC+TAC se presentan en la Tabla 12R y en la Fig. 11R. En los tiempos post administración de 16, 30, 48 y 54 hs. las concentraciones absolutas de boro en tumor fueron de aproximadamente 40-70 ppm. A las 72 hs. después de la administración de liposomas MAC+TAC, los valores de concentración de boro en tumor disminuyeron considerablemente hasta \cong 20 ppm. Las relaciones de concentración de boro Tumor/Bolsa Normal (T/BN) fueron marcadamente elevadas, con relaciones que oscilaron entre 8:1 y 27:1. Los valores absolutos de concentración de boro en los tejidos normales de la bolsa se encontraron dentro del intervalo 1,9 a 8,1 ppm. Los valores de concentración de boro en tejido precanceroso se hallaron entre 4,5 y 15,1 ppm, situándose por encima de los valores de tejido de bolsa normal.

Las relaciones de concentración de boro Tumor/Sangre (T/S) fueron inferiores a las relaciones T/BN, pero mostraron una incorporación selectiva a tumor, particularmente a las 48, 54 y 72 hs. cuando las mismas fluctuaron entre 1,9:1 y 3:1 (Tabla 12R). Aunque la selectividad en la incorporación a tumor fue mayor a las 72 hs, en ese tiempo los valores absolutos de concentración

de boro en tumor apenas alcanzaron el umbral de 20 ppm, establecido como requerimiento de utilidad terapéutica (Garabalino et al., 2011). Con respecto a los órganos en los cuales ocurre el metabolismo y eliminación de los compuestos, no se observó una acumulación relevante de boro en el hígado ni en el riñón a las 48 y 54 hs. post administración de los liposomas MAC+TAC (aproximadamente entre 16-30 ppm). En cambio, se notó una acumulación moderada en el bazo a las 48 hs. post administración (\cong 69 ppm).

Los datos de biodistribución obtenidos en el presente estudio indican que los valores de concentración de boro absolutos y relativos son potencialmente terapéuticos, en particular con los liposomas MAC+TAC (Fig. 12R).

Liposomas MAC+TAC (18 mg B/Kg iv)					
Protocolo	1	2	3	4	5
	16 hs.	30 hs.	48 hs.	54 hs.	72 hs.
Sangre (S)	122,2 \pm 30,8 (n=5)	49,1 \pm 18,4 (n=5)	34,1 \pm 5,9 (n=5)	18,2 \pm 7,7 (n=5)	6,7 \pm 1,7 (n=5)
Tumor (T)	71,5 \pm 34,8 (n=18)	48,4 \pm 19,1 (n=12)	66,6 \pm 16,1 (n=11)	43,9 \pm 17,6 (n=10)	20,1 \pm 10,8 (n=17)
Bolsa Normal (BN)	8,1 \pm 1,2 (n=5)	6,9 \pm 6,1 (n=5)	7,0 \pm 5,5 (n=5)	1,9 \pm 1,2 (n=5)	2,2 \pm 2,2 (n=5)
Precan.	15,1 \pm 4,3 (n=5)	11,7 \pm 6,0 (n=5)	11,3 \pm 6,2 (n=5)	9,6 \pm 2,2 (n=5)	4,5 \pm 2,4 (n=5)
Bazo	106,6 \pm 39,2 (n=5)	73,6 \pm 55,2 (n=5)	69,3 \pm 10,6 (n=5)	26,1 \pm 7,9 (n=5)	15,0 \pm 7,7 (n=5)
Hígado	81,9 \pm 20,9 (n=5)	37,6 \pm 9,7 (n=5)	31,3 \pm 7,5 (n=5)	19,7 \pm 1,8 (n=5)	16,7 \pm 7,5 (n=5)
Riñón	30,0 \pm 4,9 (n=5)	24,5 \pm 1,6 (n=6)	23,1 \pm 1,9(n=5)	16,3 \pm 3,8 (n=5)	10,6 \pm 4,2(n=5)
T/BN	8,8 \pm 3,4 (n=18)	12,4 \pm 8,1 (n=12)	12,9 \pm 6,8 (n=11)	27,7 \pm 10,9 (n=10)	26,8 \pm 34,9 (n=17)
T/S	0,5 \pm 0,1 (n=18)	1,1 \pm 0,4 (n=12)	1,9 \pm 0,5 (n=11)	2,8 \pm 2,1 (n=10)	3,0 \pm 0,9 (n=17)

Tabla 12R. Protocolos de biodistribución con liposomas MAC+TAC. Los datos se consignan para los diferentes tiempos post administración en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Las concentraciones de B de las muestras de sangre y tejidos para los distintos protocolos están expresadas en ppm (media \pm D.E.). Las relaciones Tumor/Bolsa Normal (T/BN) y Tumor/Sangre (T/S) se calcularon para cada tumor en particular teniendo en cuenta el valor medio de las muestras correspondientes a ese tumor, y el valor medio de bolsa normal o sangrecorrespondiente al hámster que portaba dichos tumores. Los resultados están expresados en ppm como media \pm D.E., de las relaciones para cada uno de los tumores. (n: indica el número de hamsters o tumores).

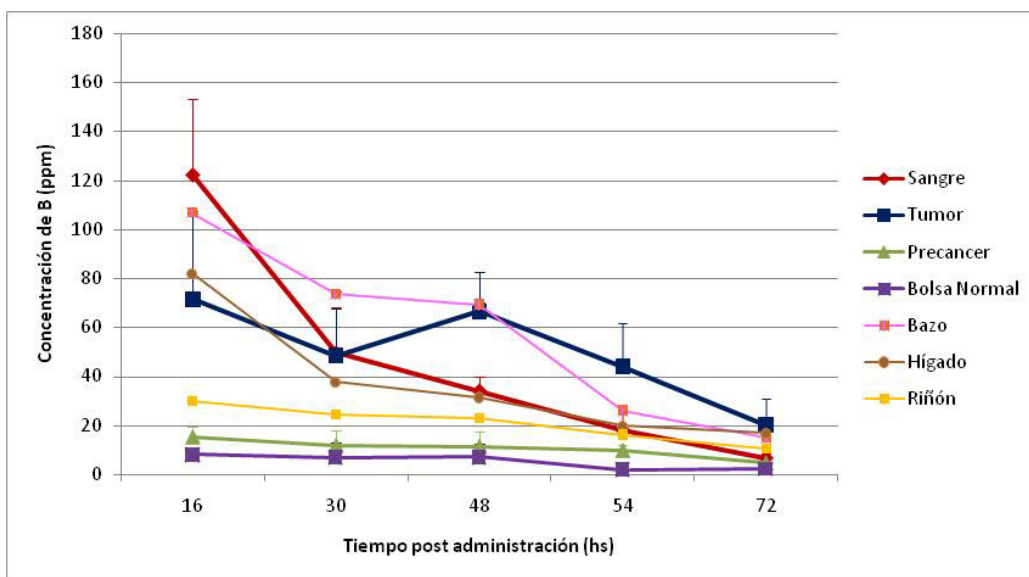


Fig. 11R Estudio en función del tiempo de la biodistribución con liposomas MAC+TAC a las 16, 30, 48, 54 y 72 hs. post administración. La concentración de boro (media \pm D.E.) para sangre y demás tejidos están graficados según los resultados de la Tabla 10R.

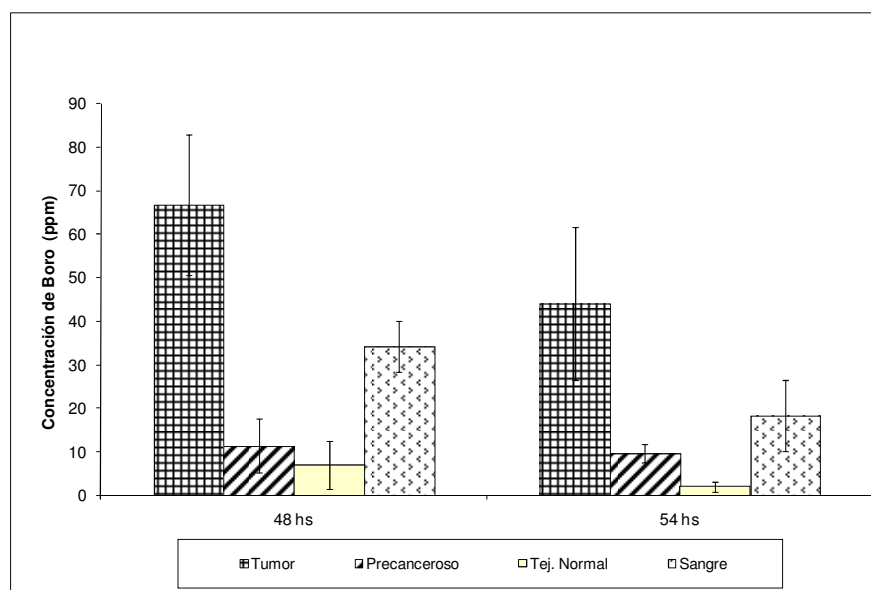


Fig. 12R Valores de concentración de boro (media \pm D.E.) en los tejidos clínicamente más relevantes para el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, para los protocolos con potencialidad terapéutica para BNCT (48 y 54 hs.) con liposomas MAC+TAC.

1.6.1 Discusión

Los estudios de toxicidad realizados con los liposomas MAC+TAC en el modelo de cáncer oral en hámsters revelaron que es importante determinar las condiciones de administración. La temperatura y la agitación de las soluciones de liposomas podrían estar vinculadas a las propiedades químicas y físicas. Si la agitación se realiza en forma enérgica podría ocurrir que las membranas lipídicas de los liposomas se rompieran y se unieran con otros liposomas en igual situación (generando liposomas de mayor diámetro) ó liberando el compuesto TAC. En cuanto a la temperatura, al ser los liposomas de naturaleza lipídica, el aumento de la temperatura (sea por suministro de calor o por aumento de la misma generada por la energía cinética de las partículas durante la agitación) o disminución de la misma, provoca cambios físico-químicos en la solución. En base a éstas observaciones, nosotros propusimos que los signos de toxicidad observados en los animales inyectados con liposomas MAC+TAC, podrían estar vinculados a la formación de trombos venosos, provocados por la administración de la solución de liposomas a temperatura no ambiente, de modo que se formarían agregados de los mismos en el sitio de inyección o en sitios cercanos, provocando los efectos de necrosis en los animales. Otro fenómeno que podría ocurrir es la liberación del compuesto TAC, por exceso de agitación, el cual podría tener efectos tóxicos *per se*. Por lo tanto, se determinó que los liposomas deberían ser suministrados a temperatura ambiente y con agitación mínima.

En relación a la toxicidad de los liposomas, podemos mencionar que el grupo de Hawthorne, estudiando la biodistribución con liposomas DAC-16 en ratones BALB/c portadores de tumores EMT6 observaron un 100 % de mortalidad 24 ó 48 post administración iv en la cola de los ratones, con dosis de solución de liposomas de 6 a 30 mg B/Kg (Li et al., 2006). Ellos atribuyeron éstos resultados a las altas concentraciones del ión potasio (K^+) utilizado en lugar de sodio (Na^+) para el desarrollo del compuesto DAC-16. Pero nuevamente observaron 100% de mortalidad en los ratones 24-48 hs post administración de los liposomas DAC-16 con sodio. Para dilucidar éste problema, inyectaron a los ratones una suspensión de liposomas vacíos (sin compuesto DAC-16) y encontraron que ninguno de los ratones luego de 48 hs de administración presentaba efectos de toxicidad. Aunque los resultados de biodistribución con liposomas DAC-16 eran favorables, su uso se discontinuó debido a su elevada toxicidad. Por lo tanto, el tema de la toxicidad con liposomas en modelos animales es una dificultad que debe ser considerada.

En el presente estudio se describió por primera vez, la biodistribución *in vivo* de boro entregada por liposomas MAC y liposomas MAC+TAC en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla de hámster. En particular, mediante la administración intravenosa con liposomas MAC+TAC, se pudo suministrar de forma selectiva cantidades potencialmente terapéuticas de boro a los tumores de hamsters, correlaciones de concentración de boro tumor / tejido de bolsa normal (T/BN) y tumor/ sangre (T/S) que serían potencialmente útiles para el tratamiento de tumores con BNCT en el período de tiempo comprendido entre las 48-54 hs. post-administración de los liposomas MAC+TAC. Los elevados valores de concentración de boro en tumor a las 16 y 30 hs. post administración de liposomas MAC+TAC, estuvieron asociados con altos valores de concentración de boro en sangre, lo cual podría plantear cierta preocupación en

términos de la existencia de una potencial radiotoxicidad. A pesar que la relación T/BN con el protocolo de 72 hs. post administración de liposomas MAC+TAC fue similar al protocolo de 54 hs. post administración ($T/BN \cong 27:1$), la concentración absoluta de boro en tumor del protocolo de 54 hs. fue el doble de la observada 72 hs. post administración (44 ppm vs 20 ppm), lo cual es una ventaja terapéutica para BNCT, ya que garantiza que ocurran las suficientes reacciones de captura entre el B y los neutrones, generando así los verdaderos efectores de alto LET (partículas α , ${}^7\text{Li}$) del daño celular.

El contenido de boro en el tejido precanceroso en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster de gran relevancia para el tratamiento con BNCT ya que el tejido precanceroso es el tejido limitante de dosis. La mucositis que se desarrolla en el tejido precanceroso como efecto radiotóxico limita la dosis que puede administrarse a tumor (ej, Molinari et al., 2011). En un escenario clínico, la mucositis oral confluyente es un efecto secundario frecuente y limitante de la dosis durante la radioterapia convencional para tumores avanzados de cabeza y cuello (Coderre y Morris, 1999; Sonis et al., 2004). En este contexto, el bajo contenido de boro entregado por los liposomas MAC y MAC+TAC al tejido precanceroso (Tablas 9R, 10R, Fig. 9R), entre 4-15 ppm, sería un beneficio, en términos de una posible reducción de la mucositis. Además, el hecho de que los valores de concentración de boro en el tejido precanceroso son, en general, más altos que los valores en bolsa normal, brindaría una ventaja terapéutica. Permitiría inducir con BNCT un efecto terapéutico en tejido precanceroso mediante la inhibición del desarrollo tumoral en este tejido, sin provocar daño significativo al tejido de la bolsa normal (Heber et al., 2007; Monti Hughes et al., 2009).

La incorporación de $\text{K}[\text{nido-7-CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{-7,8-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]$ y las especies hidrófilas $\text{Na}_3[\text{ae-B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3]$ dentro de los liposomas mejoraron las concentraciones máximas de boro en tumor. Los liposomas MAC+TAC presentarían ventajas, en términos de concentración absoluta de boro en tumor, sobre otros compuestos de boro tales como el BPA y el GB-10 que se han utilizado como portadores de boro únicos en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster (Kreimann et al., 2001a; Heber et al., 2004). Los valores máximos de concentración de boro en tumor obtenidos con MAC+TAC son aproximadamente 20-30% más altos que los obtenidos con los protocolos de administración de BPA o GB-10 que a su vez dieron como resultado tasas de control tumoral del 70-90%, siendo el Control tumoral = Remisión Completa + Remisión Parcial. (ej. Kreimann et al., 2001b; Trivillin et al., 2006). Además, la selectividad en la incorporación a tumor vs la bolsa normal (T/BN) con los liposomas MAC+TAC fue mayor que la reportada para BPA y GB-10 en este modelo (Kreimann et al., 2001a; Heber et al., 2004), dando lugar a una relación tumor/tejido sano con mayor potencial terapéutico. En el caso de los liposomas MAC+TAC, los tiempos de retención de boro en los tumores son considerablemente más largos comparados con los de BPA y GB-10. Esto permitiría que el tumor mantenga los valores terapéuticos de boro durante un período de 48-54 hs (en comparación con 3-4 hs para BPA y GB-10), mientras que proporcionaría una oportunidad para que las concentraciones de boro en otros tejidos, particularmente sangre, disminuyan. Esta característica podría brindar una ventaja en cuanto a la logística de la irradiación. La mayor retención de boro en tumor se atribuye a la susceptibilidad del

compuesto TAC ($\text{Na}_3[\text{ae-B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3]$) de sufrir la oxidación intracelular seguida del ataque nucleofílico y reacción con restos de proteínas intracelulares (Feakes et al., 1994).

Los valores elevados de concentración absoluta de boro en tumor, su captación selectiva y los tiempos de retención prolongados, sugieren que los protocolos de administración estudiados con MAC+TAC tendrían potencial terapéutico. En éste sentido se ha estudiado la incorporación dentro de liposomas de BSH o GB-10 en modelos experimentales en ratones y no se han logrado concentraciones de boro en tumor potencialmente terapéuticas (Shelly et al., 1992). Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, la eficacia radiobiológica debe ser determinada con estudios de BNCT *in vivo*.

Tal como se ha descrito anteriormente para otros compuestos borados, en diferentes modelos experimentales y en ensayos clínicos (ej, Heber et al., 2006; Cardoso et al., 2009), la dispersión en los valores de concentración absoluta de boro en tumor reportados en éste trabajo fue grande. Este tema es de gran preocupación para la comunidad de BNCT (ej Ono et al., 1999; Trivillin et al., 2006) y se ha propuesto que ésta heterogeneidad se debería en gran medida a características tales como la diversidad biológica entre células patológicas y la variación del flujo sanguíneo dentro del tumor (Coderre et al., 1998; Gibson et al., 2003).

Las relaciones de concentración de boro entre el tumor y el tejido normal, para el caso de un ensayo clínico para el tratamiento de carcinoma de células escamosas con BNCT-BPA, variaron de 1,8 a 4,4 (Kato et al., 2004). En este contexto, la elevada concentración absoluta de boro en tumor y las altas relaciones T/BN con los liposomas MAC+TAC del presente estudio, serían particularmente útiles dado que el valor más bajo dentro de la amplia gama de valores obtenidos, sería potencialmente útil para BNCT.

Para examinar la factibilidad de realizar estudios de BNCT *in vivo* en la facilidad térmica del reactor RA-3 (Miller et al., 2009; Pozzi et al., 2009), se realizaron cálculos de dosis empleando los valores de boro correspondientes a los protocolos con mayor potencial terapéutico (MAC-TAC, 48 y 54 hs. post-administración). Estos cálculos tuvieron en cuenta el uso de un blindaje de carbonato de litio (enriquecido al 95% en ^6Li), desarrollado y construido ad hoc para proteger de neutrones térmicos el cuerpo del animal mientras que la bolsa con los tumores queda fuera del blindaje, expuesta a la nube de neutrones. Para los cálculos se tomó un flujo de neutrones térmicos de aproximadamente $8,2 \times 10^9 \text{n/cm}^2 \text{s}^{-1}$ en la posición más externa de la bolsa expuesta y en la posición central se asumió un flujo de $7,0 \times 10^9 \text{n/cm}^2 \text{s}^{-1}$. Estos valores son aproximadamente un 25% más bajos que el flujo no perturbado medido en el lugar. En gran parte la depresión del flujo podría deberse al efecto del blindaje utilizado. El flujo de neutrones térmicos en todas las ubicaciones dentro de la estructura del blindaje es al menos 20 veces menor que el flujo en la bolsa expuesta. La tasa de dosis de rayos gamma en aire en la ubicación de irradiación es de $6,5 \pm 0,5 \text{ Gy/h}$. En base a estos valores, BNCT mediado por los liposomas MAC-TAC (48 y 54 hs. post-administración) podría entregar al tumor un total de dosis absorbida de 7,5 Gy (sin corregir con los valores de RBE y CBE) en un intervalo de tiempo de exposición de 3-4,5 min. La dosis total absorbida asociada al tejido de la bolsa normal expuesta sería de aproximadamente 0,6-1,9 Gy, mientras que la dosis total absorbida asociada al tejido precanceroso que rodea a los tumores sería de aproximadamente 1,5-2,6 Gy. De acuerdo a estudios previos de BNCT en el modelo de

cáncer oral de bolsa de la mejilla de hámster empleando diferentes portadores de boro (Pozzi et al., 2009), estos rangos de dosis absorbidas estarían en consonancia con dosis terapéuticamente útiles en términos de respuesta tumoral y toxicidad. En particular, la dosis absorbida al tejido precanceroso, limitante de dosis, está muy por debajo de la dosis absorbida máxima de 5 Gy que se prescribe rutinariamente a éste tejido en este modelo, cuando se utiliza BPA como portador de boro. Además, en el caso de BNCT mediado por GB-10, el tejido precanceroso tolera dosis absorbidas de aproximadamente 8 Gy. En un ensayo clínico de BNCT para cáncer de cabeza y cuello recurrente, se empleó la dosis absorbida en la membrana mucosa como el factor limitante de la dosis y se limitó a 6 Gy o menos para cada uno de los dos tratamientos BNCT administrados (Kankaanranta et al., 2012). En este sentido, sería posible administrar dosis absorbidas a tumor por encima de los 7.5 Gy calculados, sin exceder la tolerancia del tejido precanceroso que limita la dosis.

Por último, observamos que los valores de contenido absoluto de boro en el bazo con la administración de liposomas MAC+TAC fueron más elevados que los de hígado y riñón. Sin embargo, suponiendo que los niveles del compuesto en el bazo no fueran químicamente tóxicos en sí mismos, esto no generaría una preocupación para el tratamiento de tumores de cáncer de cabeza y cuello, ya que el bazo no se encontraría dentro del volumen de tratamiento. En particular, en el caso del modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, el cuerpo del animal está protegido mientras la bolsa que porta tumores se expone al haz de neutrones como se ha descrito anteriormente (ej. Molinari et al., 2011).

Los liposomas MAC dieron lugar a relaciones altas de concentración de boro entre tumor y tejido normal (T/BN entre 12,2 y 14,6), pero el contenido absoluto de boro en tumor fue sub-óptimo ([B] entre 14,6 – 18,4 ppm). A pesar de éstos resultados, se podría plantear la posibilidad de realizar estudios futuros para evaluar los potenciales beneficios y la toxicidad de liposomas MAC con la administración de una dosis mayor a la ensayada en el presente trabajo. En estudios previos en ratones BALB/c con tumores EMT6 (Feakes et al., 1995), el compuesto MAC fue empleado como único portador de boro con el mismo nivel de dosis utilizado en ésta tesis, dando lugar a concentraciones insuficientes de boro en el tumor. Por lo tanto, se podría combinar la administración de liposomas MAC con otro compuesto borado para aumentar la concentración de boro en tumor y, por consiguiente, la ventaja terapéutica de BNCT.

1.6.2 Conclusión

Los resultados del presente estudio sugieren el potencial terapéutico de los liposomas portadores de boro en términos de valores de biodistribución. Quedaría por determinar el valor terapéutico de la microdistribución de este compuesto.

En particular, los liposomas MAC+TAC administrados por vía intravenosa a una dosis de 18 mg B/kg pc sería un protocolo particularmente atractivo para realizar estudios de eficacia terapéutica y radiotoxicidad a las 48 y 54 hs. después de la administración.

1.7 Estudios de Biodistribución en el modelo de cáncer oral en hámster con GB-10 y Electroporación

La Tabla 13R muestra los valores de [B] en ppm medidos por ICP-OES para sangre, tumor, bolsa normal y tejido precanceroso y las relaciones de concentración de boro Tumor/Sangre (T/S) y Tumor/Bolsa normal (T/BN) para los tres protocolos ensayados con GB-10 (50 mg ¹⁰B/Kg iv), con y sin Electroporación (EP) (P1B, P2B y P3B), 3 hs. post-administración de GB-10. Los datos obtenidos fueron analizados con el Test t no apareado. En los dos protocolos de EP ensayados, EP Tardía+GB-10 (P1B) y EP Temprana+GB-10 (P2B), se observó un aumento estadísticamente significativo en la captación de B en tumor vs el control sólo GB-10 (P3B) (p=0,0368 y p <0,0001, respectivamente). Respecto de los resultados de las relaciones T/S, el protocolo P1B (0,5±0,2) no mostró un aumento significativo (p=1,00) comparado con el control sin EP P3B (0,5±0,2). Lo mismo ocurrió en cuanto a las relaciones T/BN, ya que sólo se encontraron diferencias significativas (p ≤ 0,0001) entre el protocolo P2B (2,3±0,8) y el control P3B (1,0±0,4). Por el contrario, el protocolo P1B (0,9±0,4) no mostró una incorporación selectiva a tumor del compuesto GB-10 con EP tardía, al igual que en el caso de GB-10 sin EP (p=0,4959). Estos resultados sugieren que la EP Temprana mejoraría la incorporación absoluta y relativa del compuesto borado al tumor.

	P1B	P2B	P3B
	GB-10+ EP tardía	GB-10 + EP temprana	Sólo GB-10
Sangre (S)	26,5± 8,7 (n=3)	21,7± 10,7 (n=4)	16,7± 3,4 (n=5)
Tumor (T)	11,9± 4,6 (n=10)	20,2± 9,6 (n=15)(*)	9,5± 2,4 (n=31)
Bolsa Normal (BN)	12,7± 2,4 (n=3)	10,0± 4,6 (n=4)	11,4± 2,5 (n=5)
Tejido Precanceroso	12,9± 4,2 (n=3)	8,9± 1,1 (n=4)	12,4± 1,4 (n=5)
T/BN	0,9± 0,4 (n=10)	2,3± 0,8 (n=15) (*)	1,0± 0,4 (n=31)
T/S	0,5± 0,2 (n=10)	1,3± 0,4 (n=15)(*)	0,5± 0,1 (n=31)

Tabla 13R. Protocolos de biodistribución con GB-10 50 mg ¹⁰B/Kg iv con y sin EP en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Las concentraciones de B de las muestras de sangre y tejidos para los distintos protocolos están expresadas en ppm (media ± D.E.). Las relaciones Tumor/Bolsa Normal (T/BN) y Tumor/Sangre (T/S) se calcularon para cada tumor en particular, teniendo en cuenta el valor medio de las muestras correspondientes a ese tumor, y el valor medio de bolsa normal o sangre correspondiente al hámster que portaba dichos tumores. Los resultados correspondientes a las relaciones están expresados como valores de media ± D.E., de las relaciones para cada uno de los tumores. (n: indica el número de hamsters o tumores). (*) Test t No apareado p ≤ 0,0001.

A fin de contribuir al estudio de la factibilidad de mejorar el targeting de boro en el modelo de cáncer oral en hámster mediante la técnica de electroporación, se buscó explorar posibles cambios en la microdistribución de boro inducidos por la electroporación. Dichas variaciones no pueden ser detectadas por mediciones globales, como por ejemplo la técnica de ICP-OES. Se utilizó la técnica de ARN para analizarla microdistribución cualitativa de ^{10}B en muestras de las bolsas de los hamsters correspondientes a los protocolos de GB-10 con y sin EP. Los resultados de este estudio se muestran en la Fig. 13R. Las diferencias de concentración pueden visualizarse en la imagen autorradiográfica a través de las variaciones en los niveles de grises. Un análisis de la microdistribución cualitativa del compuesto permitió inferir que en el protocolo GB-10+EP tardía (P1B) no se observaron diferencias en la densidad de trazas de boro global, pero sí una sugerente menor captación de boro en tumores respecto de los correspondientes al protocolo GB-10 sin EP (P3B). A pesar de esta disminución en la captación, la distribución de boro en el tumor fue homogénea, con un leve incremento de la captación en el estroma (E) respecto del parénquima (P). Por el contrario, el tumor del protocolo GB-10+EP temprana (P2B) presentó una captación global cualitativa de ^{10}B notablemente mayor que la observada con los otros protocolos de GB-10 sin EP (P3B) y con EP tardía (P1B). Además, en la imagen autorradiográfica de éste caso se observó que las regiones correspondientes al parénquima tumoral presentaron niveles de grises mayores que en el estroma, indicando una acumulación preferencial del compuesto en las regiones de parénquima tumoral, tal como se reportó previamente en animales infundidos con BPA, un compuesto de acumulación selectiva en tumor (Portu et al., 2015).

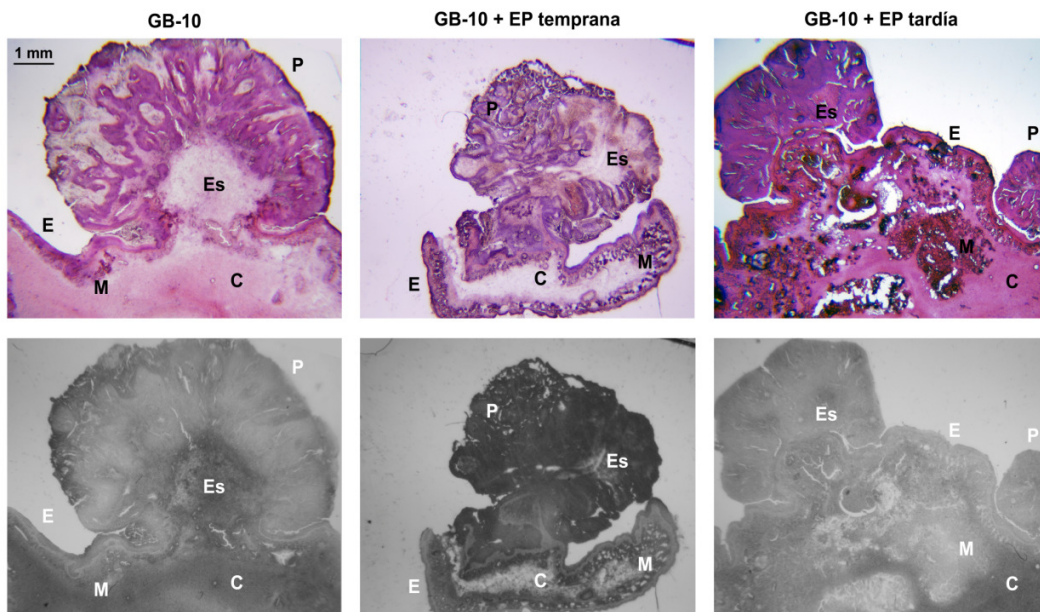


Fig.13R Imágenes histológicas coloreadas con H&E (panel superior) y autorradiográficas (panel inferior) de tumor y tejido precanceroso de la bolsa de la mejilla del hámster proveniente de los protocolos GB-10 sin EP, GB-10 + EP temprana y GB-10 + EP tardía. P: parénquima, Es: estroma, C: tejido conectivo, E: epitelio, M: músculo. Magnificación original: 1,25x.

Por su parte, las imágenes autorradiográficas de tejido precanceroso del protocolo GB-10+EP tardía, al igual que en el caso de Sólo GB-10, mostraron mayor densidad de trazas en la región correspondiente al tejido conectivo (C) que en el epitelio (E) y el músculo (M), cuyas distribuciones fueron similares entre sí (Fig. 13R).

El análisis autorradiográfico cualitativo del tejido precanceroso para el protocolo de GB-10+EP temprana reveló una gran variabilidad en los resultados de la distribución del GB-10, tanto en el tejido conectivo como en el músculo, mostrando variaciones de mayor captación del tejido conectivo o del músculo (Fig. 14R). En todos los casos, el epitelio fue la estructura que menor captación presentó.

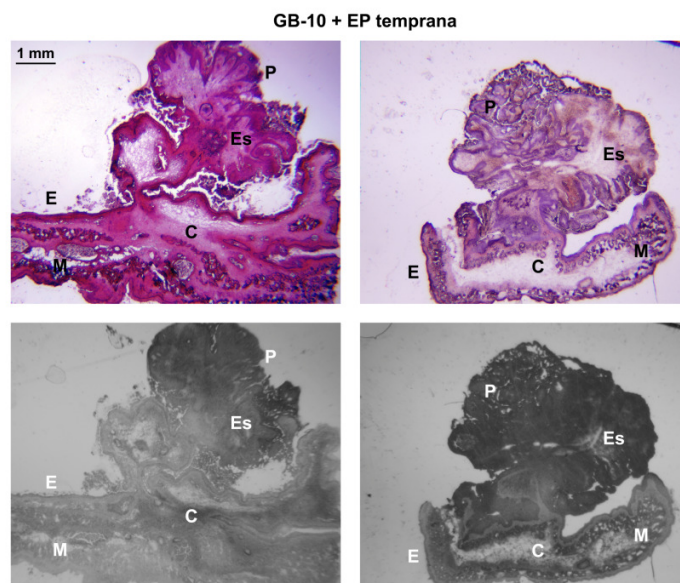


Fig.14R Imágenes histológicas coloreadas con H&E (panel superior) y autorradiográficas (panel inferior) de tumor y tejido precanceroso de la bolsa de la mejilla del hámster proveniente del protocolo GB-10 + EP temprana, donde se muestra la variabilidad de trazas en las estructuras del tejido precanceroso (a) el tejido conectivo muestra mayor captación de boro con respecto al músculo y (b) el tejido conectivo presenta menor densidad de trazas que el músculo. P: parénquima, Es: estroma, C: tejido conectivo, E: epitelio, M: músculo. Magnificación original: 1,25x.

1.7.1 Discusión

Estudios previos de biodistribución *in vivo* e *in vitro* con diferentes compuestos borados combinados con EP, demostraron que la EP puede mejorar el targeting de boro en diversas células tumorales. En estos estudios se observó un aumento en la incorporación selectiva y retención de B en los tumores electroporados versus tumores sin EP, aumentando la relación de concentración de boro Tumor/Sangre (Cemazar et al., 2000; Ono et al., 2000). En el presente trabajo se realizó por primera vez un estudio de biodistribución *in vivo* con el compuesto GB-10 combinado con EP, en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Los resultados mostraron que es posible suministrar selectivamente cantidades potencialmente terapéuticas de boro a los

carcinomas de células escamosas de hámster, mediante la administración iv de GB-10 y la aplicación de EP. Por lo tanto, podemos concluir que se lograron concentraciones absolutas y relativas de boro en el tumor que serían compatibles con el tratamiento de BNCT.

Debido a la variedad de poblaciones celulares dentro de un tumor heterogéneo se ha postulado que la administración combinada de diferentes compuestos borados, con distintas propiedades y mecanismos de captación complementarios, puede mejorar la eficacia terapéutica de BNCT, optimizando el targeting de boro en tumor (Ono et al., 1999; Trivillin et al., 2006; Heber et al., 2006). En estudios previos hemos comprobado la eficacia terapéutica de BNCT mediado por la administración combinada de GB-10 y BPA. Los resultados del presente estudio brindan evidencia de otra estrategia para mejorar el targeting de boro en tumor. En particular, la combinación de la técnica de EP temprana con el compuesto GB-10 mejoraría el targeting de boro en los tumores respecto del control de sólo GB-10. De este modo, la EP podría actuar como un sistema de administración de fármacos no específico para mejorar la incorporación del compuesto borado GB-10 en tumores de la bolsa del hámster.

Se sabe que cuando se emplea la EP para favorecer la acción de una droga quimioterapéutica (electroquimioterapia o ECT), ésta debe ser aplicada cuando el agente quimioterapéutico está presente en una concentración apropiada en los tejidos. En nuestro caso decidimos ensayar 2 tiempos distintos de aplicación de EP, un protocolo de EP temprana en el cual se espera una concentración alta de boro en sangre en el momento de la EP y otro de EP tardía en la cual se espera una concentración menor de boro en sangre pero mayor acumulación en tumor. La elección de estos dos momentos diferentes de EP respecto de la administración del GB-10, se realizó con el objetivo de estudiar si uno de ellos favorecía la incorporación del compuesto borado a las células tumorales permeabilizadas por la EP. En la literatura, muchos autores han demostrado que en patologías de cáncer de cabeza y cuello la ventana de tiempo para realizar la ECT es entre 8-28 minutos después la administración intravenosa de bleomicina (Mevio et al., 2012). Coincidentemente, en nuestros tratamientos, los mejores resultados de biodistribución de ^{10}B en el tumor se obtuvieron con el protocolo de EP temprana (10 min post administración de GB-10). Por otro lado, una característica importante de la ECT es el efecto denominado "vascular lock", que se describe como la capacidad de la técnica de EP para inducir cambios vasculares provocando la disminución del flujo sanguíneo en el área de tratamiento. El fenómeno se produce debido a la presencia de la vasculatura desorganizada e inmadura, típica de los vasos tumorales, y al efecto reflejo de vasoconstricción mediado por el sistema simpático que aparece después de la ECT. Esto provoca menor lavado del compuesto administrado, el cual se mantiene por más tiempo en las áreas electroporadas. De este modo, el tratamiento puede ser más eficaz debido a la persistencia prolongada del fármaco en la zona del tumor.

En lo referente a la distribución del compuesto borado dentro de las estructuras celulares en el tumor, se demostró previamente con la técnica de autorradiografía neutrónica (Portu et al., 2015) que en el protocolo con GB-10 sin EP, la relación de concentraciones entre el estroma y el parénquima tumoral (E/P) es 1,5. En el presente estudio, los tumores con EP tardía presentarían una distribución más homogénea, con un leve aumento en la captación de boro en el estroma (E)

respecto del parénquima (P). Por el contrario, en el caso del protocolo de GB-10+EP temprana, la microdistribución sería contraria a la esperada para el compuesto. Es decir que, al menos en algunas regiones, habría mayor acumulación en parénquima vs estroma, lo que favorecería la eficacia terapéutica de BNCT mediada por el compuesto borado GB-10. Estos resultados de microdistribución son muy similares a los encontrados en estudios de ARN para éste mismo modelo, luego de la administración de BPA (Fig. 15R).

En trabajos previos (Portu et al, 2015), se demostró que en la bolsa de la mejilla del hámster se produce una acumulación no selectiva en diferentes áreas ó regiones de tumor, tejido precanceroso y tejido normal con GB-10. La distribución de BPA sería más heterogénea que la distribución de GB-10, debido a los mecanismos de transporte activos del BPA, que permitiría la localización preferencial de B en las células neoplásicas (Wittig et al., 2000) metabólicamente más activas. Al igual que lo observado previamente en las imágenes autorradiográficas en tumores de animales infundidos con BPA, la combinación de EP temprana+GB-10 presenta una acumulación preferencial del compuesto en las regiones activas del tumor, lo cual podría mejorar la eficacia terapéutica de BNCT, luego del tratamiento con BNCT/GB-10 + EP temprana.

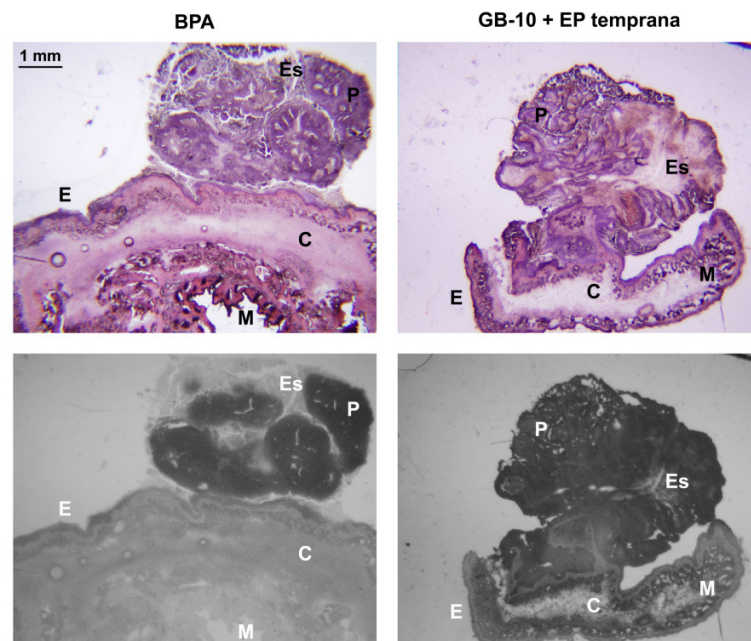


Fig.15R Imágenes histológicas coloreadas con H&E (panel superior) y autorradiográficas (panel inferior) de tumor y tejido precanceroso de la bolsa de la mejilla del hámster proveniente de los protocolos BPA y GB-10 + EP temprana. P: parénquima, Es: estroma, C: tejido conectivo, E: epitelio, M: músculo. Magnificación original: 1,25x.

Con respecto al tejido precanceroso, en trabajos previos realizados con animales del mismo modelo experimental infundidos con GB-10, las imágenes autorradiográficas revelaron una mayor acumulación de trazas en el tejido conectivo (C) en relación al músculo (M) ó el epitelio (Ep), donde los valores fueron menores y semejantes entre sí. En éste trabajo se encontró que en

el protocolo con GB-10+EP tardía se mantuvo la misma distribución cualitativa de B en el tejido precanceroso que en el protocolo sólo GB-10.

En el caso de estudios previos de ARN realizados con BPA en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, las imágenes autorradiográficas mostraron que en el tejido precanceroso existió mayor densidad de trazas de B en el epitelio (Ep) en comparación con valores semejantes entre sí y menores en el tejido conectivo y el músculo (Portu et al., 2015). Las imágenes obtenidas del tejido precanceroso del protocolo GB-10+EP temprana revelaron que el epitelio fue el de menor captación de B comparado con el tejido conectivo y el músculo. Además se observó una amplia variabilidad en la relación de densidad de trazas entre el tejido conectivo y el músculo, ya que en algunos casos dicha relación favorecía al músculo y en otros al tejido conectivo (Fig.14R). Dado que nosotros propusimos que la electroporación actuaría sólo en el tumor y en el entorno inmediato, parte del trabajo futuro consistiría en confirmar estas diferencias de acumulación de boro en el tejido precanceroso para el protocolo GB-10+EP temprana en un mayor número de casos y cuantificar la concentración de boro en las diferentes estructuras tisulares.

1.7.2 Conclusión

Los resultados de éste estudio evidenciaron que la optimización en la biodistribución y microdistribución cualitativa del boro mediante la EP temprana podría ser una herramienta para mejorar la eficacia terapéutica de BNCT/GB-10 *in vivo* en la facilidad térmica del RA-3 en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, empleando compuestos borados aprobados para su uso en humanos, sin evidencia de radiotoxicidad asociada.

2. Estudios de eficacia terapéutica y radiotoxicidad de BNCT *in vivo* en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster

2.1 Estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de cáncer oral con liposomas MAC+TAC

La Tabla 14R muestra los resultados obtenidos de la serie de experimentos preliminares que se utilizaron para establecer el intervalo de dosis de radiación óptimo, 4 semanas post tratamiento con BNCT mediado por liposomas MAC+TAC (18 mg B/Kg iv).

Dosis	3,5 Gy	4 Gy	5 Gy	6 Gy	7 Gy	Sólo Haz	SHAM
Remisión Parcial(RP)	62%	28%	37%	24%	45%	14%	16%
Remisión Completa (RC)	8%	42%	33%	65%	28%	14%	0%
Sin Respuesta(SR)	31%	23%	29%	11%	28%	72%	84%
Control Tumoral (CT=RP+RC)	70%	70%	70%	89%	73%	28%	16% (*)
n Tumores	17	57	102	17	11	36	77
n hámsters	2	4	25	2	2	6	12
Mucositis Máxima	1	2	2	4	5	1	1

Tabla 14R. Resultados de los estudios preliminares de la respuesta tumoral 4 semanas post tratamiento con BNCT/MAC+TAC a diferentes dosis absorbidas a tejido precanceroso. (*) Reducción espontánea del volumen tumoral.

El estudio preliminar a 3,5 Gy mostró un grado de mucositis leve en el tejido precanceroso (grado 1) y un Control Tumoral (CT=RP+RC) del 70%. En el caso de 6 y 7 Gy a tejido precanceroso se obtuvieron grados de mucositis severa en el tejido precanceroso (grado 4 y grado 5 con pérdida de tejido, respectivamente), cuyo pico máximo se alcanzó a las 2 semanas post-BNCT. En el tejido de la bolsa restante disponible para la evaluación, el CT fue de 89% y 73% para 6 y 7 Gy a tejido precanceroso respectivamente. En el protocolo de control SHAM (cancerizado, no tratado), sólo el 16% de los tumores experimentó una reducción espontánea en el volumen tumoral (sólo RP) y no hubo remisiones completas (RC). El control tumoral (CT) para la dosis de 5 Gy a tejido precanceroso, 4 semanas post tratamiento con BNCT/MAC+TAC fue del 70 %, del cual el 33% correspondió a RC. Los resultados de éstos estudios preliminares de BNCT con diversas dosis de irradiación de neutrones nos llevaron a realizar los tratamientos subsiguientes de BNCT con una dosis de 5 Gy a tejido precanceroso para evitar efectos de mucositis severa en el tejido precanceroso. Los tratamientos con ésta dosis de irradiación causaron sólo mucositis de grado leve (máximo de grado 2) en tejido precanceroso. El tejido normal no desarrolló mucositis con

ninguno de los protocolos ensayados. La dosis de 5 Gy a tejido precanceroso corresponde a una dosis de irradiación de 21 Gy al tejido tumoral.

Los resultados de los estudios de biodistribución con liposomas MAC+TAC (48 hs.) mostrados en ésta tesis (Resultados 1.5) mostraron valores de concentración de boro absoluta en tumor de $66,6 \pm 16,1$ ppm y relaciones de concentración de boro tumor/tejido precanceroso (T/Pr) de aproximadamente 6: 1. Éstos datos convirtieron a los liposomas MAC+TAC en portadores de boro extremadamente atractivos para realizar estudios radiobiológicos de eficacia terapéutica y radiotoxicidad de BNCT *in vivo*. Se pudo administrar una dosis de radiación absorbida de 5 Gy al tejido precanceroso limitante de la dosis (4 Gy al tejido normal), con una dosis de radiación absorbida asociada en tumor de 21 Gy. Además, debido al alto contenido absoluto de boro en el tejido tumoral, la componente de radiación de boro de la dosis total en tumor fue del 90% (Tabla 15R). Esto es claramente una ventaja ya que maximiza la componente de boro selectiva en tumor de la dosis total.

Tratamiento	Tejido	[B] ppm	Fotones γ (Gy)	Protones inducidos (^{14}N) (Gy)	Componente B (Gy)	Dosis Absorbida (Gy)	
						Dosis Fondo Total	Dosis Total
BNCT/ MAC+TAC	Tumor	$66,6 \pm 1,6$	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	19 ± 6	$1,7 \pm 0,2$	21 ± 6
	Tejido Precanceroso	$11,3 \pm 6,2$	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	3 ± 2	$1,7 \pm 0,2$	5 ± 2
	Bolsa Normal	$7,0 \pm 5,5$	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	2 ± 2	$1,7 \pm 0,2$	4 ± 2
Sólo Haz	Tumor, tejido precanceroso y normal	---	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	---	$1,7 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$

Tabla 15R. El valor medio del flujo de neutrones en la posición de irradiación fue de $7,7 \times 10^9 \pm 8 \times 10^{11}$ n/cm² s y el tiempo de irradiación varió entre 8-9 min. Los valores se presentan como media \pm D.E.

La Tabla 16R muestra los resultados de las dobles aplicaciones de BNCT/MAC+TAC a diferentes intervalos (4, 6 y 8 semanas) posteriores al primer tratamiento con BNCT, con distintos tiempos de seguimiento *in vivo* respecto de la primera aplicación de BNCT/MAC+TAC. Ambas aplicaciones se realizaron a una dosis de 5 Gy a tejido precanceroso, con la administración de la dosis completa de MAC-TAC en cada aplicación.

Los tratamientos con doble aplicación de BNCT/MAC+TAC que se realizaron con intervalos de 4 (P1L), 6 (P2L) y 8 (P3L) semanas entre tratamientos, con distintos tiempos de seguimiento respecto a la segunda aplicación de BNCT, produjeron resultados de CT de 71%, 79% y 88%, respectivamente. Estos CT estuvieron asociados a tasas de RC del 52%, 37% y 50%,

respectivamente, siendo todos éstos valores más altos, comparados con el protocolo de único tratamiento BNCT/MAC+TAC (P1L) cuyo resultado fue de 33%. En el caso del grupo de Sólo Haz(SH), la tasa de CT 4 semanas después del tratamiento, fue de sólo el 28%, del cual el 14% correspondió a RC.

El aumento del control tumoral (CT) obtenido con el protocolo BNCT/MAC+TAC aplicación única fue estadísticamente significativo respecto del grupo Sólo Haz (SH) ($p= 0,0001$).

La mucositis en el tejido precanceroso con los protocolos de doble tratamiento con BNCT fue leve y no superó el grado 2.

	BNCT MAC+TAC Único	BNCT MAC+TAC Doble (4+6)	BNCT MAC+TAC Doble (6+4)	BNCT MAC+TAC Doble (8+8)	Sólo Haz	SHAM
Dosis	P1L	P2L	P3L	P4L	SH	SHAM
Remisión Parcial (RP)	37%	19%	42%	38%	14%	16%
Remisión Completa (RC)	33%	52%	37%	50%	14%	0%
Sin Respuesta (SR)	29%	30%	21%	13%	72%	84%
Control Tumoral (CT=RP+RC)	70%	71%	79%	88%	28%	16% (*)
n Tumores	102	27	19	16	36	77
n hamsters	25	5	4	6	6	12
Mucositis Máxima en tejido precanceroso	2	2	2	1	1	1

Tabla 16R. Resultados de respuesta tumoral correspondiente a las dobles aplicaciones de BNCT/MAC+TAC en el último tiempo de seguimiento, respecto de la primera aplicación de BNCT/MAC+TAC. (P2L: segunda aplicación de BNCT 4 semanas posteriores a la primera, con seguimiento de 6 semanas post segundo BNCT; P3L: segunda aplicación de BNCT 6 semanas posteriores a la primera con seguimiento de 4 semanas post segundo BNCT y P4L: segunda aplicación de BNCT 8 semanas posteriores a la primera, con seguimiento de 8 semanas post segundo BNCT).(*) Reducción espontánea del volumen tumoral.

La Tabla 17R muestra los resultados de la respuesta tumoral a las 4 semanas post tratamiento con única o doble aplicación de BNCT/MAC+TAC, discriminando el volumen de los tumores pre-tratamiento. En el caso de las dobles aplicaciones se consignan los resultados de respuesta tumoral 4 semanas post-segunda aplicación de BNCT. Se observó que para todos los protocolos ensayados, la incidencia de RC fue mayor para los tumores chicos ($< 10 \text{ mm}^3$). La escasez relativa de los tumores grandes ($> 100 \text{ mm}^3$) en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster impidió el análisis estadístico de este grupo particular de tumores en la mayor parte de los casos. Podemos mencionar que sólo en el caso del protocolo P4L, con doble aplicación de BNCT/MAC+TAC, se observaron RC en tumores grandes (33%), mientras que con los otros protocolos dobles, las RC en los tumores grandes fueron 0%. Éstos resultados no pueden ser considerados concluyentes ni admiten un análisis estadístico, debido al escaso tamaño muestral

(n=1 para el protocolo P2L y n=0 para el protocolo P3L) de éste tamaño tumoral. En el caso del protocolo P1L de BNCT/MAC+TAC única aplicación, a pesar que tampoco se obtuvieron RC en los tumores grandes, el tamaño muestral de los mismos (n=9) alcanzó para establecer que la tasa de RC de los tumores chicos de éste protocolo fue significativamente mayor que en los tumores grandes (p = 0,0082). En el protocolo Sólo Haz (SH) sólo se observaron RC en los tumores chicos (21%).

	BNCT MAC+TAC Único			BNCT MAC+TAC Doble (4+6)			BNCT MAC+TAC Doble (6+4)			BNCT MAC+TAC Doble (8+8)			Sólo Haz		
	P1L			P2L			P3L			P4L			SH		
	C	M	G	C	M	G	C	M	G	C	M	G	C	M	G
Remisión Parcial (RP)	18%	60%	63%	6%	38%	100%	27%	75%	---	17%	57%	67%	8%	27%	0%
Remisión Completa (RC)	48%	19%	0%	61%	38%	0%	55%	13%	---	67%	29%	33%	21%	0%	0%
Sin Respuesta (SR)	34%	21%	37%	33%	24%	0%	18%	12%	---	16%	14%	0%	71%	73%	100%
Control Tumoral (CT=RP+RC)	66%	79%	63%	67%	76%	100%	82%	88%	---	84%	86%	100%	29%	27%	0%
n	56	37	9	18	8	1	11	8	---	6	7	3	24	11	1

Tabla 17R. Resultados de la respuesta tumoral de los tratamientos con única (P1L) o doble aplicación de BNCT/MAC+TAC (P2L: segunda aplicación de BNCT 4 semanas posteriores a la primera, con seguimiento de 6 semanas post segundo BNCT; P3L: segunda aplicación de BNCT 6 semanas posteriores a la primera con seguimiento de 4 semanas post segundo BNCT y P4L: segunda aplicación de BNCT 8 semanas posteriores a la primera, con seguimiento de 8 semanas post segundo BNCT) y Sólo Haz (SH) discriminando el volumen de los tumores pre-tratamiento, a las 4 semanas post tratamiento.

La Fig. 16R muestra gráficamente la respuesta tumoral para los protocolos más representativos de BNCT/MAC+TAC, mientras que la Fig. 17R ilustra, un ejemplo del aspecto macroscópico de una bolsa portadora de tumor antes y después del tratamiento con BNCT/MAC+TAC único a 5Gy con Remisiones Completas (RC) y Remisión Parcial (RP) de carcinomas exofíticos de células escamosas en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster.

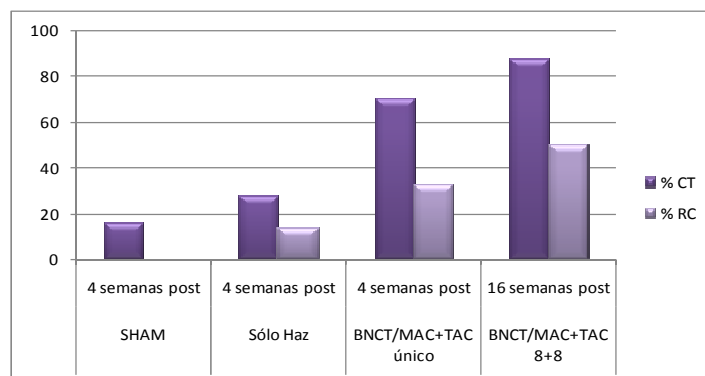


Fig. 16R Histograma de porcentajes de la respuesta tumoral, sin discriminar el volumen tumoral pre-tratamiento, correspondientes a los protocolos más representativos (basados en los resultados de la Tabla 14R) (CT: Control Tumoral; RC: Remisión Completa)

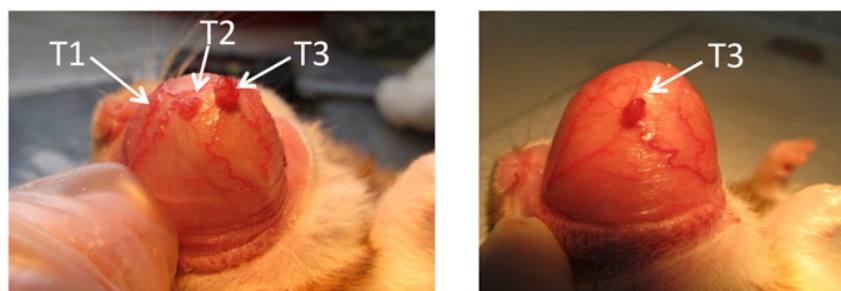


Fig. 17R Ejemplo representativo de una bolsa de hámster portadora de tumores pre tratamiento (izquierda) y 14 días post tratamiento (derecha) con 5 Gy de dosis absorbida a tejido precanceroso. El tumor 1 ($1,3 \text{ mm}^3$) y el tumor 2 (7 mm^3) sufrieron remisiones completas, mientras que el tumor 3 ($17,9 \text{ mm}^3$) presentó remisión parcial, de forma que el volumen final fue de $6,6 \text{ mm}^3$ (RP=63%). El tejido precanceroso que rodea al tumor exhibió mucositis grado 1 antes y después del tratamiento.

2.1.1 Discusión

En éste estudio de eficacia terapéutica de BNCT utilizando liposomas MAC+TAC no se observó radiotoxicidad en el tejido normal en ninguno de los protocolos ensayados. En general, los valores de peso corporal de los animales oscilaron ligeramente durante el período post-tratamiento evaluado. En ocasiones fue necesario sacrificar a los animales como resultado de uno o más de los siguientes factores, todos ellos no relacionados con una toxicidad potencial inducida por BNCT: crecimiento excesivo de tumores tratados que no respondieron, crecimiento excesivo de tumores nuevos que se desarrollaron a partir de tejido precanceroso y declinación general causada por trastornos hepáticos y digestivos generados por el carcinógeno dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) (Eveson et al., 1981). Los animales que se siguieron durante períodos más largos desarrollaron con frecuencia adenocarcinomas mamarios sub-cutáneos en la región abdominal, posiblemente relacionados con el tratamiento con DMBA (Moon et al., 1976). En esos casos, los adenocarcinomas fueron extirpados quirúrgicamente, permitiendo que el seguimiento de los animales continuara.

En nuestros estudios anteriores de control tumoral, utilizando otros agentes borados en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, establecimos el período de seguimiento de 4 semanas después de un tratamiento con BNCT o después del segundo tratamiento en el caso de protocolos que involucraron doble BNCT (Trivillin et al., 2006; Molinari et al., 2011). En este trabajo, por primera vez, fue posible extender el período de seguimiento a 16 semanas en el caso de protocolos de tratamiento con BNCT, principalmente como consecuencia de un buen resultado terapéutico, es decir, un buen control del tumor, una mucositis leve y escaso desarrollo de tumores nuevos.

En los resultados mostrados en la Tabla 19R, que comparan las respuestas tumorales en el último tiempo evaluado para los protocolos con uno o dos tratamientos de BNCT/MAC+TAC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el CT. Esto implicaría que los protocolos con doble tratamiento sostienen una tasa de CT del 70-88% durante un período de 10-16 semanas

después del primer tratamiento con BNCT/MAC+TAC. Este período de tiempo constituye alrededor de un 13% de la vida de un hámster saludable. Si fuera posible una extrapolación directa, éste correspondería a un período clínicamente significativo de ~ 10 años en un ser humano.

Con respecto al desarrollo de tumores nuevos (es decir, tumores que no se encontraban presentes al final del protocolo de carcinogénesis) a partir del tejido precanceroso, el 100% de los animales del grupo SHAM mostraron tumores nuevos a las 4 semanas de seguimiento (Heber et al., 2010). En el caso del protocolo de tratamiento BNCT/MAC+TAC único, el 64% de los hamsters a las 4 semanas de seguimiento desarrollaron nuevos tumores, mientras que aproximadamente el 75-80% de los hamsters de los protocolos con doble tratamiento BNCT/MAC+TAC (en el tiempo de seguimiento más largo en cada caso) desarrollaron nuevos tumores. Esto implicaría que los protocolos que involucran dos tratamientos con BNCT/MAC+TAC tendrían un efecto inhibitorio parcial en el desarrollo de nuevos tumores. Aunque previamente se demostró el éxito terapéutico de BNCT mediado por BPA en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster (Heber et al., 2006; Kreimann et al., 2001b), sin duda nos enfrentamos al reto actual de optimizar esta técnica mediante el uso de enfoques que también podrían ser útiles en otros modelos experimentales y, eventualmente, en un escenario clínico. En el caso del cáncer de cabeza y cuello, una estrategia terapéutica sería exitosa si se lograra una amplia respuesta tumoral asociada a un mínimo desarrollo de mucositis en el tejido precanceroso y una inhibición en el desarrollo de nuevos tumores a partir de tejido precanceroso. En este contexto, los protocolos de tratamiento de BNCT mediados por los liposomas MAC-TAC ensayados en esta tesis, indujeron una respuesta tumoral $\geq 70\%$ con mucositis extremadamente leve (grado 1-2) en el tejido precanceroso y ninguna toxicidad en el tejido normal. Además, estos protocolos inhibieron parcialmente el desarrollo de nuevos tumores a partir de tejido precanceroso. Con estos resultados pudimos demostrar por primera vez que la combinación de buena respuesta tumoral, mucositis aceptable e inhibición parcial del desarrollo de nuevos tumores, permite un período de seguimiento más largo (hasta 16 semanas) más allá del período de tiempo previamente establecido (4 semanas) en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. El tratamiento repetido con BNCT/MAC+TAC produjo una respuesta tumoral sostenida de 70-88% (37-56% de RC) y un efecto inhibitorio parcial sobre el desarrollo de nuevos tumores en el tejido precanceroso hasta 16 semanas después del primer tratamiento de BNCT.

Nuestra hipótesis de trabajo fue que el tratamiento repetido con BNCT/MAC+TAC sería una estrategia que minimizaría la mucositis en el tejido precanceroso limitante de dosis. También buscamos elegir un intervalo que minimice la repoblación de células tumorales, lo cual se conoce que pone en peligro la respuesta terapéutica. Basándose en el hecho conocido de que la mucositis es un proceso de múltiples etapas iniciado por lesiones de la mucosa, asociados a un aumento de la producción de citoquinas inflamatorias, que causan daño directo a la mucosa e inician ciclos de retroalimentación positiva (Mais, 2006), el intervalo entre los dos tratamientos, permitiría la disminución parcial del proceso inflamatorio antes de que se administre la segunda dosis, evitando así el aumento de la mucositis. En cuanto a la eficacia terapéutica, se sabe que el alargamiento del tiempo de tratamiento global en la radioterapia convencional (es decir, tratamientos con bajo LET) reduce la toxicidad a costa de la disminución de la probabilidad del control tumoral (Dörr et al.,

2005). Sin embargo, en el caso de BNCT que implica una combinación de componentes de radiación de alto y bajo LET, un tratamiento repetitivo permitiría el re-direccionamiento de boro hacia poblaciones celulares que fueron refractarias a la primera aplicación y posteriormente proliferaron (Molinari et al., 2011; Monti Hughes et al., 2013). Dentro de los períodos de tiempo entre aplicaciones evaluados (intervalos de 4, 6 y 8 semanas entre aplicaciones), los datos del presente estudio no revelaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta tumoral atribuibles a las diferencias entre los intervalos. Esto proporciona cierta flexibilidad en la selección del mejor momento para realizar la segunda aplicación de BNCT, en terapias personalizadas (Kato et al., 2004). Sin embargo, es cierto que algunos pacientes podrían estar en condiciones demasiado frágiles para beneficiarse de un doble protocolo de aplicación. Los tres intervalos de tiempos ensayados entre las dos aplicaciones de BNCT (4, 6 y 8 semanas) posiblemente impedirían el aumento de la mucositis después del segundo tratamiento y minimizarían de manera similar la repoblación celular. Se sabe que la inflamación asociada con la mucositis puede inducir la promoción tumoral, activando lesiones premalignas (Grivennikov et al., 2006; Pérez et al., 2005) y además es una de las características del cáncer, que actúa en cualquier etapa de la tumorigénesis (Multhoff y Radons, 2012). En este contexto, el hecho de que el tratamiento con BNCT/MAC+TAC pueda administrarse sin aumentar la mucositis, no sólo es importante en términos de prevención de toxicidad, sino también en términos de inhibición del desarrollo de nuevos tumores. El desarrollo de nuevos tumores en el tejido precanceroso modelaría el desarrollo de segundos tumores primarios en la mucosa oral cancerizada (Monti Hughes et al., 2013) y, por lo tanto, puede considerarse un parámetro que afectaría el resultado terapéutico a mediano y largo plazo en carcinomas de células escamosas en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster.

2.1.2 Conclusión

Podemos concluir que, en el modelo de cáncer oral de bolsa de mejilla de hámster, BNCT mediado por los liposomas MAC+TAC pudo lograr un control tumoral sostenido y robusto durante un período de seguimiento prolongado de 16 semanas. Al final del mismo, sólo un 13% de los tumores mostraron crecimiento, mientras que en los animales no tratados (SHAM) y en animales con tratamiento Sólo Haz (SH), a las 4 semanas post-tratamiento el 84% y 72% respectivamente de los tumores continuaron creciendo. El control tumoral con BNCT/MAC+TAC estuvo asociado a un grado de mucositis leve en el tejido precanceroso, con un efecto inhibitor parcial sobre el desarrollo de nuevos tumores, sin toxicidad en tejido normal.

2.2 Estudios de BNCT *in vivo* en el modelo de cáncer oral con GB-10+Electroporación

Los resultados de los estudios de biodistribución con GB-10+EP temprana mostrados en ésta tesis (Resultados 1.6) revelaron valores de concentración de boro absoluta en tumor de $20,2 \pm 9,6$ ppm y relaciones de concentración de tumor/tejido precanceroso (T/Pr) de 2,3:1. En base a estos datos la dosis de radiación absorbida al tejido precanceroso limitante de dosis fue de 2,1 Gy, al tejido normal de 2,2 Gy y la dosis de radiación absorbida asociada en tumor fue de 3,7 Gy.

Los resultados de respuesta tumoral a los 28 días post-tratamiento con BNCT/GB-10 con o sin Electroporación (EP) se muestran en las Tablas 18R y 19R. En la Tabla 18R los resultados del control tumoral están presentados sin discriminar por volumen tumoral en el momento de la irradiación, mientras que en la Tabla 19R se observan los resultados discriminando por volumen tumoral en el momento de irradiación según una escala arbitraria (C: chicos $<10 \text{ mm}^3$; M+G: medianos y grandes $\geq 10 \text{ mm}^3$). La discriminación por volumen tumoral se realizó para explorar la potencial influencia del mismo en la respuesta final de los tumores tratados con BNCT. La respuesta tumoral se expresó como Remisión Completa (RC), Remisión Parcial (RP) o Control Tumoral (CT: RC + RP).

	BNCT/ GB-10+EP tardía	BNCT/ GB-10+EP temprana	Control BNCT/GB-10	Control Solo EP	Control Sólo Haz	Control EP tardía + Solo Haz	Control EP temprana+ Solo Haz
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Remisión Parcial (RP)	40%	46%	42%	26%	18%	31%	28%
Remisión Completa (RC)	30%	46%	6%	8%	0%	19%	10%
Sin Respuesta (SR)	30%	8%	52%	66%	82%	50%	62%
Control Tumoral (CT=RP+RC)	70%	92%	48%	33%	18%	50%	38%
n Tumores	23	46	33	38	50	16	32

Tabla 18R. Tabla de porcentajes de Respuesta Tumoral de distintos protocolos de EP combinada con BNCT/GB-10 y protocolos control, RP: Remisión Parcial; RC: Remisión Completa; SR: Sin Respuesta; CT: Control Tumoral (CT: RP+RC); n: número de tumores.

	BNCT/ GB-10+ EP tardía		BNCT/ GB-10+ EP temprana		Control BNCT/GB-10		Control Sólo EP		Control Sólo Haz		Control EP tardía + Sólo Haz		Control EP temprana + Sólo Haz	
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	C	M+G	C	M+G	C	M+G	
Remisión Parcial(RP)	33%	45%	23%	75%	33%	50%	18%	33%	18%	17%	0%	56%	14%	50%
Remisión Completa(RC)	50%	9%	65%	20%	7%	6%	18%	0%	0%	0%	43%	0%	18%	0%
Sin Respuesta (SR)	17%	46%	12%	5%	60%	44%	64%	67%	82%	83%	57%	44%	68%	50%
Control Tumoral (CT=RP+RC)	83%	54%	88%	95%	40%	56%	36%	33%	18%	17%	43%	56%	32%	50%
n	12	11	26	20	15	18	17	21	38	12	7	9	22	10

Tabla 19R. Tabla de porcentajes de Respuesta Tumoral de distintos protocolos de EP combinada con BNCT/GB-10 y protocolos control, discriminando por volumen tumoral inicial. RP: Remisión Parcial; RC: Remisión Completa; SR: Sin Respuesta; CT: Control Tumoral (CT: RP+RC); n: número de tumores; C: tumores chicos (volumen <10mm³); M+G: tumores medianos y grandes (volumen ≥ 10mm³).

Considerando la respuesta sin discriminar por volumen tumoral pre-tratamiento (Tabla 20R), el CT de BNCT/GB-10(P3) fue de 48%. Los valores de CT de ambos grupos tratados con BNCT/GB-10 + EP (P1 y P2) fueron mayores que el valor de BNCT/GB-10. En el caso de BNCT/GB-10+ EP tardía (P1) el CT fue del 70%, pero a pesar de la diferencia con BNCT/GB-10 sin EP, ésta no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, el CT del protocolo BNCT/GB-10+EP temprana fue del 92% y la diferencia con el control BNCT/GB-10 fue altamente significativa ($p < 0,0001$). El análisis de las remisiones completas (RC), mostró que el valor del protocolo P1(RC=30%) fue significativamente mayor que el valor de 6% de BNCT/GB-10 ($p = 0,0244$). Asimismo, el valor de RC de 46% de BNCT/GB-10+EP temprana (P2) fue significativamente mayor que el valor de 6% del control BNCT/GB-10 sin EP ($p = 0,0001$).

Comparando cada protocolo BNCT/GB-10+EP (P1 y P2) con su correspondiente protocolo de EP+ Sólo Haz (P6 y P7 respectivamente) para evaluar el efecto de la radiación de fondo, se observó que si bien el CT de BNCT/GB-10+EP tardía (P1) de 70% fue mayor que el CT de 50% de EP tardía + Sólo Haz (P6), esta diferencia no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, en el caso de BNCT/GB-10+EP temprana (P2), el CT de 92% fue significativamente mayor que el CT de 38% de EP temprana+Sólo Haz (P7) ($p < 0,0001$). En cuanto a las remisiones completas (RC), el valor de 30%

de BNCT/GB-10 EP tardía no fue significativamente mayor que el valor de RC de 19% del control EP tardía + Sólo Haz. Sin embargo, el valor de RC de 46% de BNCT/GB10+EP temprana fue significativamente mayor que el valor de RC de 10% del control EP temprana+ Sólo Haz ($p=0,0027$).

Se compararon los protocolos de BNCT/GB-10+EP (P1 y P2) con el protocolo de Sólo EP (P4) para evaluar el aporte a la respuesta de la EP sola, como único tratamiento. El CT de 70% en el caso de BNCT/GB-10+EP tardía y el CT de 92 % en el caso de BNCT/GB-10 +EP temprana (P2) fueron significativamente mayores que el CT de 33% del grupo Sólo EP ($p=0,0093$ y $p<0,0001$, respectivamente). En cuanto a las remisiones completas (RC), el valor de 30% del P1 fue significativamente más alto que el de 8% del protocolo Sólo EP ($p=0,0324$). Asimismo, el valor de 46% del P2 fue significativamente más alto que el de 8% de Sólo EP ($p=0,0002$).

Los valores de CT del grupo SHAM (cancerizado sin tratar) de 16% representan las remisiones parciales espontáneas del modelo de cáncer oral. El valor de 18% de CT correspondiente a Sólo Haz fue similar, indicando que la radiación de fondo a la fluencia neutrónica empleada no tiene un efecto significativo sobre la respuesta tumoral. Ninguno de los dos grupos (Sham y Sólo Haz) mostró casos de remisiones completas.

Considerando los valores de respuesta tumoral discriminando por volumen tumoral en el momento de la irradiación (Tabla 21R), se observaron diferencias cuando se consideraron los tumores chicos (C) o los tumores medianos + grandes (M+G). El valor de CT para tumores chicos de 83% de EP BNCT/GB-10+EP tardía fue significativamente mayor que el correspondiente valor de CT de 40% para BNCT/GB-10 ($p=0,0473$). Sin embargo, para éstos mismos protocolos los valores de CT fueron similares en el caso de tumores medianos + grandes (M+G). En el caso de BNCT/GB-10+EP temprana, el valor de CT de 88% para tumores chicos fue significativamente mayor que el correspondiente valor de 40% para BNCT/GB-10 ($p=0,0030$). Un efecto similar se observó para los tumores medianos + grandes (95% vs 56%, $p=0,0067$). En el caso de las remisiones completas (RC) de tumores chicos, la EP aumentó el control tumoral significativamente de 7% para BNCT/GB-10 a 50% para BNCT/GB-10+ EP tardía ($p=0,0237$) y a 65% para BNCT/GB-10+ EP temprana ($p=0,0003$).

Se comparó cada protocolo BNCT/GB-10+EP (P1 y P2) con su correspondiente protocolo de EP+Sólo Haz (P6 y P7) para evaluar el efecto de la radiación de fondo en la respuesta tumoral discriminando por volumen tumoral en el momento de la irradiación. En el caso de BNCT/GB-10+EP tardía, el CT de los tumores chicos de 83% fue mayor que el correspondiente valor de 43% de EP tardía+ Sólo Haz (P6). Sin embargo, esta diferencia no alcanzó significancia estadística. En el caso de los tumores medianos + grandes los valores fueron similares (54% vs 56%). Para el protocolo BNCT/GB-10+EP temprana (P2), el CT fue significativamente mayor comparado con EP temprana+ Sólo Haz (P7), tanto para los tumores chicos (88% vs 32%, $p<0,0001$) como para los medianos + grandes (95% vs 50%, $p=0,0088$). En cuanto a las remisiones completas (RC) en tumores chicos, los valores de BNCT/GB-10+EP tardía fueron similares a los del correspondiente grupo EP tardía + Sólo Haz (50% vs 43%). Sin embargo, en las RC de tumores chicos de BNCT/GB-10+ EP temprana, el valor de 65% fue significativamente mayor que el correspondiente valor de 18% de EP tardía + Sólo Haz ($p=0,0014$).

Discriminando por volumen tumoral, se compararon los protocolos de BNCT/GB-10+EP (P1 y P2) con el protocolo de Sólo EP (P4) para evaluar el aporte a la respuesta de la EP como únicotrataamiento. En el caso del protocolo del protocolo P1, el CT fue mayor que para Sólo EP, tanto para los tumores chicos (83% vs 36%) como para los medianos + grandes(54% vs 33%). Sin embargo, esta diferencia solamente alcanzó significancia estadística para los tumores chicos ($p=0,0216$). En el caso del protocolo P2, el CT fue significativamente mayor que para Sólo EP tanto para los tumores chicos (88% vs 36%, $p=0,0006$) como para los medianos + grandes (95% vs 33%, $0,0001$). En cuanto a las remisiones completas (RC) de tumores chicos, el valor de 50% para BNCT/GB-10+ EP tardía fue mayor que el valor de 18% para Sólo EP, pero esta diferencia no alcanzó significancia estadística. En el caso del protocolo P2, el valor de RC de tumores chicos de 65% fue significativamente mayor que el correspondiente valor de 18% para Sólo EP ($p=0,0042$).

La Tabla 20R muestra el grado de mucositis máxima alcanzada en el tejido precanceroso limitante de dosis y el grado de mucositis en el último tiempo analizado (28 días post-tratamiento). Los grados 0, 1 y 2 se consideran mucositis leve, el grado 3 se considera mucositis moderada y los grados 4 y 5 se consideran mucositis severa. Se considera que la mucositis severa es un efecto no deseado que limita la dosis que se puede administrar a tumor. Asimismo, lo deseable es que la mucositis sea reversible y que no exceda un grado leve a los 28 días de seguimiento.

		BNCT/ GB-10+EP tardía	BNCT/ GB-10+EP temprana	Control BNCT/GB-10	Control Sólo EP	Control Sólo Haz	Control EP tardía + Sólo Haz	Control EP temprana + Sólo Haz
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Mucositis Máxima en tejido precanceroso	G0-G2	100%	89%	100%	100%	100%	100%	80%
	G3	0%	11%	0%	0%	0%	0%	0%
	G4-G5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	20%
Mucositis 28 días en tejido precanceroso	G0-G2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	G3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	G4-G5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	n	5	9	5	5	6	5	5

Tabla 20R. Tabla de porcentajes de Mucositis (radiotoxicidad) de distintos protocolos de EP combinada con BNCT/GB-10 y protocolos control, clasificada en Mucositis Máxima (alcanzada en algún momento post-tratamiento) y Mucositis 28 días (al final del período de seguimiento), ambas post-irradiación (n: número de hamsters; G0-G2: mucositis leve, G3: mucositis moderada y G4-G5: mucositis severa).

Ninguno de los protocolos ensayados indujo mucositis severa en tejidoprecanceroso. En todos los casos, la mucositis en tejido precanceroso revirtió a un grado menor o igual a G2 a los 28 días de seguimiento post irradiación. Se destaca el hecho que BNCT/GB-10+EP (P1 y P2) no induce mucositis severa en tejido precanceroso. Este hallazgo tiene gran relevancia clínica ya que el aumento en eficacia terapéutica logrado con BNCT/GB-10+EP vs BNCT/GB-10 no está asociado a un efecto tóxico indeseable.

La Fig. 18Ra ilustra un ejemplo del aspecto macroscópico de una bolsa portadora de tumor antes, durante los controles y al finalizar el seguimiento post BNCT/GB-10+EP temprana, en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. En la Fig. 18Rb se pueden observar remisiones completas y parciales de tumores exofíticos rodeados de tejido precanceroso en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster.



Fig. 18R a. Imágenes macroscópicas de la bolsa de la mejilla del hámster en todos los tiempos donde se realizó el seguimiento de la respuesta tumoral y de mucositis en tejido precanceroso (pre-tratamiento, 7, 14, 21 y 28 días) post-BNCT/GB-10+EP temprana.

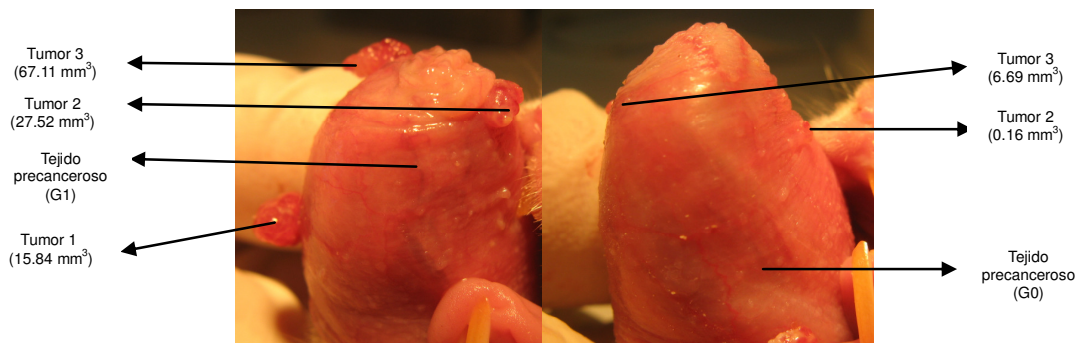


Fig. 18R b. Imagen macroscópica de la bolsa de la mejilla del hámster cancerizada con DMBA. (Izquierda) Pre-tratamiento, con tumores (T1, T2 y T3) rodeados de tejido precanceroso con mucositis Grado 1. (Derecha) 28 días post Protocolo BNCT/GB-10+EP temprana (P2), exhibiendo RC del T1 y RP de los T2 y T3, rodeados de tejido precanceroso con grado 0 de mucositis.

2.2.1 Discusión

En este trabajo se comprobó por primera vez que la técnica de electroporación aumenta la eficacia terapéutica de BNCT mediado por GB-10 en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, con seguimiento *in vivo*. Los valores de CT (RC+RP) en general de los dos protocolos de BNCT/GB-10+EP a los dos tiempos ensayados para la aplicación de la EP (temprana y tardía respecto de la administración del compuesto borado GB-10), fueron mayores que el control tumoral de BNCT/GB-10. Pero cabe destacar que con BNCT/GB-10+EP temprana el control tumoral fue de 92%, significativamente mayor que el control tumoral con BNCT/GB-10 de 48% ($p < 0,0001$). Sin embargo, en el caso de BNCT/GB-10+EP tardía, si bien el control tumoral fue mayor que con BNCT/GB-10, la diferencia no fue estadísticamente significativa (70% vs 48%, $p = 0,1708$). El leve efecto de control tumoral inducido por la EP sola (no relacionado con la administración de un compuesto borado), aumentaría el efecto de la radiación de fondo. Sin embargo, el control tumoral inducido por los protocolos que combinan radiación de fondo con EP es significativamente menor que el CT que se logra con BNCT/GB-10+EP.

En particular, se observó un aumento de las RC de los tumores chicos, tanto con el protocolo BNCT/GB-10+EP temprana (65%) como el de BNCT/GB-10+EP tardía (50%), en comparación con el protocolo BNCT/GB-10 (7%). Pero con el protocolo EP temprana, a diferencia del protocolo con EP tardía, también se observó un aumento significativo vs los controles Sólo EP (18%) y EP temprana + Sólo Haz (18%). Para el caso del CT en los tumores medianos y grandes, el protocolo BNCT/GB-10+EP tardía no aumentó significativamente la respuesta vs los controles BNCT/GB-10, Sólo EP y EP tardía + EP. Por el contrario, con el protocolo BNCT/GB-10+EP temprana se observaron aumentos significativos del CT de tumores medianos y grandes (95%) respecto de los controles BNCT/GB-10 (56%), Sólo EP (33%) y EP temprana + Sólo Haz (50%). Estos resultados indican que, si bien ambos protocolos que incluyen electroporación aumentan la eficacia terapéutica, la electroporación temprana (10 minutos post-administración intravenosa del compuesto) resultaría más beneficiosa. Este hallazgo podría deberse a una mayor disponibilidad de boro (GB-10) en sangre 10 minutos post-administración de GB-10 que a las 2 hs 50 minutos post-administración. Estudios previos de farmacocinética de GB-10 en el modelo experimental de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, muestran que la concentración de boro en sangre a los 10 minutos post-administración intravenosa es aproximadamente 4 veces mayor que a las 3 horas post-administración (Heber et al., 2004).

Si comparamos los resultados obtenidos de eficacia terapéutica de BNCT/GB-10+EP temprana en el modelo de cáncer oral en hámster, con trabajos previos realizados por nuestro laboratorio con BNCT/BPA en el mismo reactor (RA-3) con igual fluencia neutrónica ($1,9 \times 10^{12} \text{ n/cm}^2$) (Molinari et al., 2012) podemos observar diferencias en las respuestas tumorales. El CT general (sin discriminar por volumen tumoral) aumentó del 67 % (BNCT/BPA) al 92% (BNCT/GB-10+EP temprana). En particular, el CT para los tumores chicos con BNCT/BPA vs BNCT/GB-10+EP temprana muestra un leve aumento del 67% al 88%. La mayor diferencia se encuentra en el aumento del CT de los tumores medianos y grandes con BNCT/GB-10+EP temprana (95%) en

comparación al tratamiento BNCT/BPA (61%). Las remisiones completas de los tumores chicos aumentaron del 49% con BNCT/BPA al 65% con BNCT/GB-10+EP temprana. Este aumento en eficacia terapéutica de BNCT/GB-10+EP temprana vs BNCT/BPA se asoció a una ventajosa reducción en la mucositis en el tejido precanceroso del 80% Grado 3-4 con BNCT/BPA al 11% Grado 3 con BNCT/GB-10+EP temprana.

Otra técnica utilizada con similar estrategia a la EP es la sonoporación. A diferencia de la EP que se basa en el uso de campos eléctricos, la sonoporación es un método físico que emplea una fuente externa de energía de ultrasonido para inducir por ejemplo, la transferencia de genes a las células. En base a esta técnica se realizaron estudios *in vivo* en ratones nude con tumores de la línea SAS (SCC) para evaluar la captación de agentes borados (BPA o BSH) y la eficacia terapéutica de BNCT (mediado por BPA o mediado por BSH) combinada con sonoporación. En relación a los estudios de cinética de distribución de los compuestos borados, los resultados mostraron que en el caso de BSH los tumores sonoporados incrementaron significativamente la captación de boro versus los tumores control sin sonoporación. Sin embargo, en el caso de BPA, la sonoporación no indujo diferencia significativa en la concentración de boro en tumor. Los estudios de eficacia de BNCT + Sonoporación *in vivo* mostraron que, luego de un mes de seguimiento, el crecimiento de los tumores fue suprimido cuando se aplicó BNCT mediado por BPA y sonoporación (Yamatomo et al., 2013).

Podemos concluir a partir de estos resultados, que la EP temprana aumenta la eficacia terapéutica de BNCT/GB-10, incrementando la respuesta tumoral tanto en tumores chicos como en tumores medianos y grandes, sin mucositis severa en tejido precanceroso. Estos hallazgos podrían atribuirse parcialmente a los resultados obtenidos en los estudios de biodistribución con GB-10+EP temprana realizados en esta tesis (Resultados 1.6). En ellos, se observó un aumento significativo en la captación de B en tumor con el protocolo GB-10+EP temprana vs el protocolo GB-10 sin EP. Además, estos resultados coinciden con los obtenidos por la técnica de autorradiografía neutrónica mostrados (Resultados 1.6). Una mayor densidad de trazas en la zona de tumor con el protocolo GB-10+EP temprana vs el protocolo GB-10 indica una variación a nivel cualitativo en la microdistribución de boro en tumor inducida por EP. Al igual que lo observado previamente en las imágenes autorradiográficas en tumores de animales infundidos con BPA, la combinación de GB-10+EP temprana presenta una acumulación preferencial del compuesto en las regiones activas del tumor, lo cual explicaría el aumento de las respuestas tumorales luego del tratamiento con BNCT/GB-10+EP temprana.

2.2.2 Conclusión

Los resultados de éste estudio evidenciaron que BNCT mediada por GB-10 *in vivo* combinada con EP podría ser una herramienta para mejorar la eficacia terapéutica de BNCT, sin mucositis severa en el tejido limitante de dosis (tejido precanceroso). En particular, éste efecto es más evidente con el protocolo BNCT/GB-10+EP temprana, donde no sólo se obtuvieron resultados

beneficiosos de control tumoral de tumores chicos, sino también en el caso de los de volumen mediano y grande.

Discusión general

En este trabajo de tesis se abordaron estudios de biodistribución de boro en diferentes modelos experimentales de cáncer *in vivo* para estudiar la potencialidad de distintos compuestos borados y estrategias de administración para el tratamiento con BNCT de: metástasis hepáticas de cáncer de colon, metástasis difusas de cáncer de colon en pulmón y cáncer oral. También se realizaron estudios de biodistribución de boro en un modelo de pulmón sano en oveja para evaluar la radiotoxicidad del órgano sano y además explorar la posibilidad de tratamiento con la modalidad de BNCT *ex situ*. Por último, se realizaron estudios radiobiológicos de eficacia terapéutica y radiotoxicidad de BNCT a nivel experimental para el tratamiento de cáncer oral con dos de los protocolos ensayados previamente en los estudios de biodistribución.

El cáncer se considera una de las principales causas de muerte a nivel mundial y la incidencia de esta enfermedad seguramente seguirá creciendo en función del creciente aumento de la expectativa de vida. El conocimiento actual sobre la complejidad del desarrollo del cáncer y su origen multifactorial demuestran la imposibilidad de basarse en un único tratamiento y justifican el avance en el desarrollo de nuevas estrategias, orientadas principalmente a resolver los casos que no responden a las terapias estándar, disminuir la toxicidad del tratamiento, mejorar la calidad de vida del paciente y evitar cirugías mutilantes.

La radioterapia es uno de los principales métodos de tratamiento que en los últimos años se ha perfeccionado con el avance de nuevas tecnologías, principalmente con el desarrollo de mejores equipos y sistemas que permiten el suministro más exacto y preciso de la dosis de radiación ionizante que se prescribe. Estos avances tecnológicos también permiten que hoy exista un gran avance en la aplicación de tratamientos con iones y partículas cargadas, aprovechando el beneficio del uso de la radiación de alto LET.

La Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT), es una modalidad terapéutica binaria dentro de la radioterapia, que combina el direccionamiento bioquímico del agente terapéutico al tumor (compuesto borado) y la irradiación con neutrones, dando lugar a la aplicación de radiación de alto LET preferencialmente en el tumor, preservando los tejidos normales. Asimismo, debido al direccionamiento bioquímico del compuesto borado a las células tumorales, BNCT permite el tratamiento de micrometástasis y células infiltrantes no identificables por estudios de imágenes. El estudio y aplicación de BNCT requiere del dominio de diversas áreas de conocimiento, y Argentina se encuentra entre uno de los pocos países con un proyecto que cuenta con recursos humanos en todas ellas.

Una de estas disciplinas es la radiobiología, que contribuye al desarrollo de la radioterapia aportando una base conceptual, identificando los mecanismos y procesos involucrados en la respuesta de los tumores y tejidos normales a la radiación, y promoviendo el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. Este trabajo de tesis se encuadra dentro de este contexto, con el objetivo específico de promover el desarrollo de la radiobiología en el marco de las necesidades del proyecto de BNCT de Argentina, contribuir al conocimiento de la radiobiología de BNCT para

optimizar su eficacia terapéutica para distintas patologías y articular los estudios experimentales con la clínica.

A nivel internacional se observa un creciente interés en profundizar las investigaciones sobre la necesidad de desarrollar agentes de entrega de boro más selectivos y eficaces como así también métodos para proporcionar estimaciones semi-cuantitativas del contenido de boro tumoral antes de los tratamientos de BNCT, mejorando así la implementación clínica. En particular, se reconoce la necesidad de ensayos clínicos aleatorios que demuestren la eficacia terapéutica de BNCT (Barth et al., 2005). Si estas cuestiones se abordaran adecuadamente, entonces BNCT podría ser considerado para el tratamiento, no sólo de enfermedades neoplásicas, sino también para otras enfermedades de diversa etiología, como la artritis reumatoidea (Trivillin et al, 2016).

A fin de comprender y controlar la acción terapéutica de los fármacos en el cuerpo humano, se debe conocer en qué medida el fármaco alcanzará su sitio de acción y cuándo ocurrirá esto. La absorción, distribución, metabolismo (biotransformación) y eliminación de los fármacos son procesos de farmacocinética. La comprensión y utilización de los principios farmacocinéticos pueden incrementar la probabilidad de éxito terapéutico y reducir la aparición de efectos farmacológicos adversos en el cuerpo. En éste contexto, realizar estudios de biodistribución de boro en modelos experimentales contribuye no sólo a incrementar los conocimientos de la radiobiología de BNCT, sino también a ampliar las experiencias de estudios con compuestos sin acción farmacológica *per se*, como lo son los compuestos borados utilizados en éste trabajo.

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 prelude 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 que incluyen: tumores transplantados, animales transgénicos y modelos de co-carcinogenicidad. En éste trabajo nosotros utilizamos, para los estudios de biodistribución y/o eficacia terapéutica y radiotoxicidad de BNCT, el modelo de cáncer oral inducido químicamente con un carcinógeno químico en la bolsa de la mejilla del hámster, el modelo de metástasis hepáticas de cáncer de colon inducido por el método de inoculación subcapsular de células tumorales singeneicas y el modelo de metástasis pulmonares difusas de cáncer de colon por el método de inyección iv de células tumorales singeneicas. En cuanto al modelo pre-clínico de pulmón sano en oveja, éste nos permitió estudiar el comportamiento del pulmón explantado para una posible aplicación de BNCT *ex situ*, en un modelo de animal grande.

Los resultados de los estudios de biodistribución determinan la concentración absoluta de boro en tumor, sangre, tejidos sanos. Éstos valores son utilizados para evaluar los tejidos limitantes de dosis; las vías óptimas de un compuesto borado o de la combinación de compuestos borados; para determinar la selectividad en la incorporación de boro a tumor mediante la relación de concentración de boro tumor/tejido normal ó tumor/sangre, para determinar el tiempo post-administración del compuesto borado que optimice la concentración absoluta y relativa de boro

en tumor y por último para realizar los cálculos de dosis necesarios para los ensayos *in vivo*. En este marco, los estudios de biodistribución son fundamentales para determinar los protocolos con valor potencial para ser ensayados en estudios de BNCT *in vivo*.

Los requisitos para que BNCT sea exitoso incluyen: la acumulación selectiva en el tumor de un portador de ^{10}B no tóxico en relación con los tejidos sanos limitantes de dosis en el volumen de tratamiento, una concentración de ^{10}B absoluta suficientemente alta en el tejido tumoral para generar las suficientes reacciones de $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ y que la incorporación de B sea homogénea en todas las poblaciones de células tumorales para evitar así la existencia de células tumorales potencialmente refractarias que perjudiquen el control tumoral (ej. Coderre y Morris, 1999; Heber et al., 2006; Trivillin et al., 2006; Garabalino et al., 2011). Se conoce que para que BNCT sea efectivo, las células tumorales deben contener al menos 20 ppm ($20\ \mu\text{g}\ ^{10}\text{B}/\text{g}$) para que la dosis de captura neutrónica en boro en el tumor sea significativamente mayor que la dosis de radiación de fondo y para que se produzcan suficientes reacciones de captura entre los neutrones térmicos y los átomos de ^{10}B (con una fluencia estándar de neutrones) para producir un efecto letal en las células tumorales. Este valor de concentración de boro corresponde a aproximadamente 10^9 átomos de ^{10}B , distribuidos uniformemente en una célula tumoral (Fairchild y Bond, 1985; Coderre y Morris, 1999). En éste contexto, también podemos mencionar que no sólo es importante conocer el contenido absoluto y la distribución del B, sino que además la microdistribución de boro en el tumor y en los tejidos sanos condicionan la eficacia terapéutica y/o radiotoxicidad de BNCT. Por lo tanto, es importante conocer la concentración de boro en las células tumorales, tejidos sanos y tejidos limitantes de dosis, utilizando técnicas de medición de boro lo más precisas y adecuadas a cada caso. En éste sentido, actualmente es difícil elegir un método adecuado para la medición de boro, dado que cada uno posee ventajas y desventajas características. En este trabajo de tesis nosotros utilizamos dos de las técnicas, basadas en plasma, para determinar las concentraciones absolutas de boro en muestras de tumor, sangre y demás tejidos: ICP-OES e ICP-MS. En los últimos años, se han desarrollado nuevas generaciones de instrumentos para la aplicación de métodos espectrofotométricos alternativos de plasma y de masas de alta resolución, para la medición de varios elementos, entre ellos el B. A pesar de las mejoras que se han llevado a cabo en estos instrumentos, que aumentaron la precisión y redujeron el nivel de detección en la determinación de B (Farhat et al., 2013), todavía hay algunos problemas que deben ser mejorados.

Una de estas cuestiones es que el boro tiende a adherirse al sistema de introducción de muestra en los instrumentos y, por lo tanto, eleva el fondo, afectando las determinaciones posteriores. Este fenómeno, llamado "efecto de memoria" es un problema importante en la determinación de la concentración de B, especialmente en muestras de baja concentración medidas luego de una muestra con alto contenido de B. Se han realizado esfuerzos para tratar de corregir éste efecto, los cuales incluyen: medir sólo muestras diluidas de boro y aumentar el tiempo de lavado (Ward et al., 1990), realizar lavados entre muestras con NaF (fluoruro de sodio) (ej. Evans y Krahenbuhl, 1994), medir frecuentemente muestras de referencia para así corregir valores anteriores o posteriores a la medición (Kucharkowski et al., 1996) y usar en forma

directa el nebulizador-inyector (DIN) (Vaughan y Claassen, 1996). El uso de DIN puede ser el método más eficaz en la actualidad, pero su costo puede ser prohibitivo para muchos laboratorios.

La memoria del instrumento puede tener graves consecuencias para la determinación de las relaciones isotópicas de elementos cuando existe una amplia variación en la composición isotópica de las muestras. Además, la determinación de la relación isotópica del B por ICP-MS también puede verse afectada por la naturaleza y el origen de la muestra (Bassett, 1990; Vanderpool et al., 1994), por los parámetros del instrumento (Gregoire, 1990), y la matriz donde está incluida la muestra (Gregoire, 1987, 1990). Por último, los instrumentos son sólo el medio para lograr buenos resultados analíticos. La destreza en la preparación y manipulación de la muestra por parte del analista, como así también los métodos empleados para la determinación de B cumplen roles significativos en la exactitud y precisión analítica de los resultados (Sah y Brown, 1997).

Una propuesta que podría ser considerada para dilucidar las diferencias en la captación de boro en muestras biológicas, generadas a partir de la administración de la combinación de dos compuestos borados con mecanismos de incorporación distintos (ej: BPA+GB-10, BPA+BSh), sería realizar estudios de biodistribución en modelos adecuados utilizando uno de los compuestos enriquecidos en ^{10}B y el otro compuesto sintetizado a partir de boro natural (19,9 % ^{10}B y 80,1% ^{11}B), para luego medir las concentraciones isotópicas mediante la técnica de ICP-MS. Teniendo en cuenta la proporción isotópica de boro de cada compuesto administrado y mediante los cálculos correspondientes, se podrían discriminar las proporciones de incorporación de cada uno de los compuestos borados en el tejido analizado.

Con respecto a la determinación cualitativa de la microdistribución de boro mediante la técnica de autorradiografía neutrónica, utilizada en éste trabajo de tesis, a pesar de requerir la disponibilidad de un reactor nuclear para su ejecución, de ser una técnica de revelado destructivo y tener ciertas limitaciones con respecto a la resolución de las imágenes de las trazas en tejidos biológicos (Molinari et al., 2015), la principal ventaja de éste método es que permite la medición de la distribución de boro en tejidos intactos (Sah y Brown, 1997).

Los modelos en animales pequeños son importantes para los estudios de enfermedades humanas, en particular en la comprensión de los mecanismos básicos, el desarrollo de potenciales terapias y la investigación de la seguridad de nuevos fármacos (Ko et al., 2016). En este sentido, los estudios de biodistribución de boro en modelos experimentales adecuados son fundamentales para evaluar la viabilidad de la posible aplicación de BNCT para un determinado tumor *in situ* y seleccionar los protocolos de BNCT *in vivo* potencialmente útiles. El uso de modelos experimentales permite la evaluación de nuevos protocolos que aún no son susceptibles de evaluación a nivel clínico, pero que podrían resultar prometedores. También los estudios de biodistribución son esenciales para el diseño de protocolos de tratamientos que son meritorios de evaluación. Sin embargo, no se puede determinar *a priori* cuántos estudios de BNCT *in vivo* deben llevarse a cabo para evaluar el verdadero éxito de un protocolo de administración en particular.

Los estudios de biodistribución de boro son esenciales para diseñar y planificar protocolos pre-clínicos y, en última instancia, clínicos. En particular, se pueden identificar compuestos de boro potencialmente útiles y protocolos de administración y elegir el tiempo óptimo después de la

administración del portador de boro para realizar la irradiación de neutrones, tratando de maximizar los niveles de boro en tumor mientras se minimizan los niveles de boro en tejidos sanos y sangre. Los cálculos de dosis se basan en los valores de contenido de boro en sangre, tumor y tejido normal obtenidos a partir de estudios de biodistribución realizados previamente (ej. Heber et al., 2004). En este sentido, la gran variabilidad y heterogeneidad en las concentraciones de boro en las muestras tumorales es un problema general en la dosimetría de BNCT. Los análisis de los tejidos tumorales, tomados quirúrgicamente, han mostrado una considerable variabilidad en las concentraciones medias de boro, aún en múltiples muestras de pacientes individuales. En gran medida estas variaciones se deberían a la diversidad biológica entre células patológicas, un flujo de sangre variable del tumor y variabilidad inter-organismos (Coderre et al., 1998; Gibson et al., 2003). Los cálculos de dosis se tornan aún más complicados cuando se usan combinaciones de compuestos borados. Es imposible saber la verdadera biodistribución de cada droga o evaluar efectos sinérgicos o antagónicos en el momento de la irradiación. En cambio, en los tejidos sanos las concentraciones de boro son más predecibles y uniformes. Por lo tanto, es seguro y confiable basar los cálculos de dosis en la tolerancia del tejido normal (Barth et al., 2005) o del tejido limitante de dosis.

En el caso de la irradiación de pacientes, se pueden tomar muestras de sangre justo antes e incluso durante la irradiación para inferir la concentración de boro en el tejido, asumiendo las relaciones tumor/sangre establecidas en estudios de biodistribución realizados previamente (González et al. 2004). Pero se conoce que la obtención de una respuesta terapéutica máxima, ocurre cuando las irradiaciones se llevan a cabo durante el pico de relación Tumor/Tejido Normal. En este sentido, recientemente se han evaluado modalidades de determinación de concentración de B *in vivo* que contribuirían a lograr este objetivo. La técnica de análisis de imagen con ^{18}F -BPA/PET (ej. Kobayashi et al., 2016) permite la detección del compuesto borado de forma no invasiva en tiempo real.

En el caso específico de los modelos experimentales, los cálculos de dosis se basan en los valores medios obtenidos de los estudios de biodistribución en conjuntos separados de animales sacrificados a distintos tiempos post-administración (Kreimann et al., 2001a). En este sentido, es importante tener en cuenta que se han descrito variaciones intra-tumorales, intra-tejidos e inter-sujetos en los valores globales de contenido de boro (ej. Heber et al., 2004, 2006). Estas variaciones deben tenerse en cuenta para el cálculo de la dosis y la prescripción de la dosis, para evitar exceder la radiotolerancia de los tejidos sanos o limitantes de dosis dentro del volumen de tratamiento.

Como mencionamos anteriormente, la mejor manera de maximizar la componente de boro de la dosis de BNCT es optimizar el “targeting” de boro a las distintas poblaciones tumorales. Basado en estudios radiobiológicos de BNCT previos en el modelo de cáncer oral en la bolsa de mejilla de hámster (ej., Kreimann et al., 2001b, Trivillin et al., 2006, Molinari et al., 2011), definimos algunos de los requerimientos para establecer el potencial valor terapéutico de los portadores de boro, los protocolos de administración y los tiempos posteriores a la administración (Garabalino et al., 2011). Tres de los cuatro compuestos borados evaluados en esta tesis (BPA, BSH y GB-10) son los únicos compuestos aprobados para su uso en seres humanos. Se ha dedicado

mucho esfuerzo a la búsqueda del compuesto de ^{10}B "ideal" que potencialmente reemplazaría a los tres compuestos "imperfectos" actualmente autorizados. Hasta la fecha, ningún otro compuesto de ^{10}B ha llegado a la etapa de evaluación en un estudio clínico de biodistribución. Si se identifica un nuevo portador de ^{10}B como prometedor, a partir de estudios de cultivos celulares, todavía enfrenta muchos obstáculos: estudios de biodistribución en modelos tumorales apropiados y la evaluación de la toxicidad antes de los estudios BNCT *in vivo* experimentales. La extrapolación de datos experimentales a estudios clínicos de biodistribución es costosa, no beneficia directamente a los participantes y debe cumplir con los estrictos requisitos de las agencias reguladoras., Típicamente, en EE.UU. por ejemplo, de 10.000 compuestos medicinales generales que se desarrollan, solamente 5 llegan a ser testeados en ensayos clínicos y solamente uno finalmente es aprobado por FDA. El proceso desde la "mesada" hasta llegar "a la cama del paciente" generalmente lleva 10 años y cuesta más de 1.000 millones de dólares (Paul et al., 2010). La optimización de la administración de los compuestos de ^{10}B actualmente autorizados para su uso en seres humanos es una excelente estrategia a corto y medio plazo y el conocimiento adquirido por medio de estudios también será aplicable a compuestos de ^{10}B potencialmente "más perfectos". Asimismo, el uso de compuestos aprobados para su uso en pacientes acorta la brecha entre la investigación y la aplicación clínica.

En el presente trabajo se utilizaron compuestos borados que clásicamente fueron desarrollados para el tratamiento de cáncer de cerebro, el BSH y el GB-10, ya que no atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) intacta del cerebro sano. En ésta ocasión se realizaron estudios de biodistribución en modelos tumorales experimentales en tejidos sin la protección de la BHE, como los modelos de metástasis hepáticas y difusas pulmonares de cáncer de colon en ratas BDIX utilizando GB-10, BPA y BPA+GB-10 y en cáncer oral en hámsters, usando GB-10, BSH y BPA+BSH. Se identificaron protocolos con potencialidad terapéutica basados en la administración de un compuesto borado (GB-10, BPA ó BSH) o con la combinación de ellos (BPA+GB-10 ó BPA+BSH) en los diferentes modelos experimentales.

La incorporación a las células, tanto del BSH como el GB-10, ocurriría a través del mecanismo de difusión pasiva. El hecho de que estos compuestos no atraviesan la BHE intacta se podría utilizar como ventaja para llegar selectivamente a tumores de cerebro que poseen la BHE dañada. En éste sentido, la captación selectiva del BSH y GB-10 en los tumores en relación con el tejido normal, podría depender en principio de una BHE intacta en el tejido normal y una BHE patológicamente permeable en el tejido tumoral. La característica química de lipofilia de éstos compuestos es clave para que atraviesen la BHE dañada alrededor del tumor. Por lo tanto, los compuestos anfífilicos, que poseen un adecuado equilibrio entre hidrofilia y lipofilia, son de interés primordial porque darían lugar a concentraciones diferenciales de boro entre el tumor y el cerebro normal más favorables (Barth et al., 2005).

Por otro lado, se conoce que la administración de compuestos borados para el tratamiento de tumores extracraneales, como el cáncer de cabeza y cuello e hígado, presenta un conjunto de problemas, incluyendo la captación inespecífica y la retención en tejidos normales adyacentes (Barth et al., 2005). De acuerdo con el paradigma tradicional, para que BNCT sea terapéuticamente

eficaz, el compuesto borado debe llegar selectivamente al tejido tumoral (Coderre et al., 1998). En este contexto, los compuestos borados GB-10 y BSH, sólo podrían ser seleccionados como portadores de boro para BNCT en órganos protegidos por la BHE. Pero ya reportamos evidencia de un nuevo paradigma en BNCT: el efecto selectivo sobre tumor de BNCT mediado por GB-10, un compuesto borado que no se deposita selectivamente en el tejido tumoral pero que induce un daño selectivo sobre el tejido tumoral, probablemente vía un daño selectivo sobre los vasos sanguíneos tumorales, preservando el tejido normal (Trivillin et al., 2004, 2006). Además, el hecho que el GB-10 ha sido propuesto como agente portador de boro para el tratamiento de BNCT con neutrones rápidos (BNCT-enhanced Fast Neutron Therapy) (Stelzer et al., 2001; Nigg et al., 2000) en tumores profundos tales como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, confiere un valor particular al estudio de biodistribución con GB-10 en modelos experimentales sin BHE, como los modelos de metástasis hepáticas y pulmonares difusas de cáncer de colon en ratas y el modelo de cáncer oral en hamsters. Por su lado, el hecho que el BSH está siendo investigado clínicamente como portador único de boro para BNCT en tumores cerebrales (ej. Nakagawa et al., 2009) y en combinación con BPA en tumores recurrentes de cabeza y cuello (ej. Kato et al., 2009), hace que sea un compuesto particularmente interesante para explorar. Basándonos en la hipótesis que el BSH se comportaría de manera similar al GB-10, realizamos estudios de biodistribución con BSH como portador único de boro en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster (Garabalino et al., 2011), obteniendo valores de concentración de boro en tumor y relaciones Tumor/Tejido Normal y Tumor/Sangre potencialmente útiles para realizar estudios de eficacia terapéutica de BNCT *in vivo*. La importancia radiobiológica de los valores de concentración de boro en sangre correspondiente a los protocolos de administración que incluyen BSH, solamente podrán ser evaluados en estudios de BNCT propiamente dicho. Existe la posibilidad de que el BSH, al igual que el GB-10, pueda causar algún tipo de riesgo en términos de daño vascular, pero también podría conferir una ventaja terapéutica en cuanto al daño selectivo de los vasos sanguíneos tumorales aberrantes, como lo descrito anteriormente para BNCT/GB-10 en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster (Trivillin et al., 2006). Además, los valores de eficacia biológica relativa (RBE) y eficacia biológica de compuestos (CBE) considerados para cada reactor, cada protocolo de administración del compuesto borado, cada tejido y cada parámetro de evaluación, condicionarán el resultado y deberían ser evaluados en experimentos adecuadamente diseñados (Hopewell et al., 2011).

Por otro lado, se sabe que el BPA se incorpora selectivamente en el tejido tumoral en relación al tejido normal. Sin embargo, ésta captación dentro del tumor es heterogénea ya que se realiza a través mecanismos activos (sistemas LAT) y además depende del incremento en la tasa de actividad metabólica tumoral (Coderre y Morris, 1999; Detta y Cruickshank, 2009). Este fenómeno lleva a una distribución heterogénea de boro en tumores heterogéneos (Coderre et al., 1998; Kreimann et al., 2001a; Morris et al., 2000). Por lo tanto, las células deficientes en BPA sobrevivirán al tratamiento con BNCT y de esta forma se vería comprometido el control tumoral. Dentro de éste contexto, se ha postulado que la administración combinada de diferentes compuestos de boro con distintas propiedades y mecanismos de captación complementarios puede mejorar la ventaja terapéutica de BNCT (ej. Ono et al., 1999. Trivillin et al., 2006). Hemos

demostrado anteriormente que la administración combinada de BPA y GB-10 en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, contribuye a la incorporación homogénea de boro en tumores heterogéneos (Heber et al., 2006). Este es, sin duda, un beneficio para BNCT, ya que minimiza la existencia de poblaciones de células tumorales que son refractarias al tratamiento. Por lo tanto, los protocolos que implican la administración combinada de BPA+GB-10 ó BPA+BHS supondrían una ventaja terapéutica potencial.

El trabajo realizado en esta tesis con respecto a los estudios de biodistribución en el modelo de pulmón sano de oveja con explante del órgano complementan los trabajos previos realizados de biodistribución con BPA para la evaluación de BNCT en un escenario *ex situ* (Fariás y Garabalino et al., 2015). Los estudios de cinética previos aportaron información sobre el comportamiento de la concentración del compuesto borado en pulmón, sangre, músculo y piel de un mismo individuo. En función de los resultados observados, concluimos que el modelo pre-clínico en animal grande sería un sustituto adecuado para inferir la cinética y captación del compuesto en humanos. El modelo pre-clínico propuesto nos permitió estudiar el comportamiento del pulmón explantado. Los estudios de captación de boro durante el periodo de explante pulmonar fueron cuantificados a partir de un factor de retención de boro. Si bien la reducción de la concentración de boro en el órgano debido a la infusión de la solución de lavado y las técnicas de preservación era esperable, los resultados obtenidos sugieren que el procedimiento propuesto es repetible con un factor de retención esperado de $0,46 \pm 0,15$. La información generada en ésta tesis en conjunto con lo generado en la tesis de Fariás (2015), podría ser aplicada para estimar una dosimetría realista de un tratamiento clínico, a partir de un pulmón humano, considerando la facilidad central de columna térmica del reactor RA-3. De ésta manera, sería razonable suponer que la estrategia de irradiación *ex-situ* sería factible de realizarse y altamente promisorio, con capacidad de contribuir al tratamiento de tumores pulmonares localizados o difusos no tratables mediante las técnicas convencionales comúnmente utilizadas, incrementando así no sólo la sobrevida general esperada sino también, e igualmente importante, la calidad de vida del paciente.

Es cierto que las implicancias de los valores absolutos de contenido de boro, en términos de efecto biológico, sólo pueden determinarse con estudios radiobiológicos BNCT *in vivo*. Sin embargo, se sugiere el potencial terapéutico de los diferentes protocolos de administración y compuestos de boro descritos aquí basándose en los datos de biodistribución y estudios radiobiológicos previos en el modelo de cáncer oral de bolsa de hámster (ej. Kreimann et al., 2001b, Trivillin et al., 2004; Pozzi et al., 2009, Monti Hughes et al., 2009, Molinari et al., 2011). Se sabe que el efecto biológico de BNCT depende de los factores de efectividad biológica relativa (RBE) de los componentes de dosis de alto LET de BNCT principalmente. Los fenómenos de micro distribución del boro determinan el factor RBE para cada portador de boro en un tejido particular, conocido como el factor de efectividad biológica (CBE) (Morris et al., 1994) de un portador particular de boro en un tejido particular. De esta manera, los estudios de biodistribución sirven como guía para establecer los portadores de boro y protocolos que serían merecedores de evaluación radiobiológica.

El desarrollo de agentes borados para BNCT ha avanzado considerablemente desde los estudios iniciales que utilizaban ácido bórico como portador de boro hasta los actuales en base a la nanotecnología. Aunque el BPA, BSH y GB-10 son agentes aprobados para su uso en la clínica para BNCT, sus modestas relaciones Tumor/Tejido Normal (T/N) fomentan el desarrollo de agentes borados más selectivos. La mejora en la relación T/N no sólo indica que un agente borado es más selectivo en cuanto a su incorporación a tumor, sino que es considerado un factor crítico para reducir al mínimo el daño al tejido normal o limitante de dosis y por consiguiente aumentar la supervivencia del paciente, minimizando los efectos secundarios de BNCT. Dentro de las estrategias presentadas que se pueden utilizar para mejorar la biodistribución y la eficacia de BNCT nosotros ensayamos por primera vez en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster la administración de liposomas MAC y liposomas MAC+TAC, acompañando el esfuerzo internacional de desarrollo y evaluación de compuestos borados nuevos. En el marco del desarrollo de nuevas estrategias empleando compuestos borados aprobados para su uso en pacientes, evaluamos la combinación de GB-10+electroporación en estudios de biodistribución, obteniendo resultados potencialmente útiles para realizar ensayos de eficacia terapéutica y radiotoxicidad de BNCT *in vivo*.

Los liposomas generados por el autoensamblaje de fosfolípidos se han popularizado como sistemas de administración de fármacos (Wang et al., 2016). Estas vesículas formadas por bicapas lipídicas poseen biocompatibilidad sin inmunogenicidad, además de tener alta eficiencia de encapsulación de compuestos hidrofílicos en el núcleo acuoso central de los liposomas y compuestos hidrófobos dentro de la bicapa de la membrana, como en el caso de los liposomas MAC o liposomas MAC+TAC. Los liposomas evaluados como potenciales agentes para BNCT han demostrado incrementos en la concentración de boro en los tumores y elevado clearance en tejidos normales, logrando relaciones Tumor/Tejido normal muy favorables. Recientemente, se han desarrollado agentes para BNCT con alto contenido de boro, tales como compuestos carboranos, que se cargan en vehículos nanoportadores para aumentar su acumulación tumoral a través del efecto EPR (Enhanced Permeability and Retention effect). La carga de boro y el tiempo de circulación sanguínea de los sistemas de administración son los dos factores cruciales que afectan el nivel de boro en el tumor y la eficacia terapéutica. Se han desarrollado diferentes métodos para incorporar portadores de boro para BNCT, modificando superficialmente las nanopartículas para optimizar los dos factores, lo que mejoraría significativamente la acumulación de boro en tumores y la efectividad de BNCT (Wang et al., 2016).

Como mencionamos anteriormente, en éste trabajo de tesis se realizó por primera vez un estudio de biodistribución con GB-10 + Electroporación (EP) en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster. Mediante ensayos previos de biodistribución realizados *in vivo* e *in vitro* con diferentes compuestos borados combinados con EP, otros autores demostraron que la EP puede mejorar la acumulación selectiva de boro en diversas células tumorales versus tumores sin EP (Cemazar et al., 2000; Ono et al., 2000). Los resultados obtenidos en ésta tesis mostraron que es posible suministrar selectivamente cantidades potencialmente terapéuticas de boro a los Carcinomas de Células Escamosas (CCE) de hámsters mediante la administración iv de GB-10 y la aplicación de EP, logrando concentraciones absolutas y relativas de boro en el tumor que serían

compatibles con el tratamiento de BNCT. Aunque clásicamente la electroquimioterapia (ECT) se utiliza en oncología para facilitar la incorporación en las células tumorales de agentes antitumorales con escasa permeabilidad y además alta toxicidad intrínseca (ej. bleomicina), en ésta ocasión nosotros demostramos que la EP puede actuar como un sistema no específico de administración de compuestos, aumentando así la concentración de ^{10}B en CCE en la bolsa de la mejilla del hámster, optimizando su microdistribución. Dentro de las estructuras celulares en el tumor, se demostró con la técnica de autorradiografía neutrónica (Portu et al., 2015) que en los protocolos con GB-10 sin EP, la relación de concentraciones entre el estroma y el parénquima tumoral (E/P) es 1,5. De acuerdo a éstos resultados y a los obtenidos en el presente estudio podríamos suponer que dicha relación podría variar en el caso de BNCT mediada por GB-10 *in vivo* combinada con EP, favoreciendo la eficacia terapéutica de BNCT.

Es casi un axioma universalmente aceptado en la investigación del cáncer que un gran número de ratones y ratas han sido curados por una amplia gama de terapias experimentales, pero con frecuencia la extrapolación a la práctica clínica ha sido decepcionante. Sin embargo, la importancia de diseñar y seleccionar los modelos animales más adecuados para investigar la variedad cada vez mayor de enfermedades con nuevos enfoques terapéuticos experimentales, nunca ha sido superior. Esta consideración se aplica aún más a las técnicas más complejas que a las pruebas más tradicionales de nuevas terapias farmacéuticas o biológicas (Santos Silva et al., 2015).

Por otro lado, aunque la utilidad real de un portador de boro y protocolo de administración en particular sólo puede determinarse mediante estudios radiobiológicos *in vivo* de BNCT, nuestros estudios anteriores en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster sugieren que los protocolos que cumplen ciertos requisitos son potencialmente terapéuticos y justifican la evaluación radiobiológica correspondiente. Por ello, en base a dos de los protocolos ensayados de biodistribución en el modelo de cáncer oral en hámster, llevamos a cabo por primera vez estudios de eficacia terapéutica y radiotocidad con liposomas MAC+TAC y GB-10+electroporación, con seguimiento *in vivo*.

Los resultados de eficacia terapéutica de BNCT mediado por liposomas MAC+TAC en el modelo de cáncer oral de la bolsa de la mejilla del hámster permitieron demostrar que se puede lograr control tumorales aceptable y sostenido a lo largo de un período de seguimiento de 4 meses asociado a escasa o nula radiotoxicidad en el tejido precanceroso, limitante de dosis.

Se conoce que en el modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hámster, el tejido precanceroso es el tejido que limita la dosis y que el escalado de la dosis está limitada por la mucositis en este tejido (ej. Molinari et al., 2012). En un escenario clínico, la mucositis oral confluyente es un efecto secundario frecuente, limitante de la dosis durante la radioterapia convencional para los tumores de cabeza y cuello avanzados (Coderre y Morris, 1999; Sonis et al., 2004). Dentro de este contexto, el contenido de boro en el tejido precanceroso es de particular importancia y debe ser evaluado en términos de radiotoxicidad en estudios de BNCT *in vivo*. Además, el hecho de que los valores de concentración de boro en tejido precanceroso son, en

general, algo más altos que los valores del tejido de la bolsa normal, podría potencialmente generar un efecto terapéutico en el tejido precanceroso, en términos de inhibición del desarrollo de tumores, sin daño significativo al tejido de la bolsa normal (Heber et al. 2007; Monti Hughes et al., 2009). Incluso cuando el tejido precanceroso y el tejido de la bolsa normal, no difieren en términos de los valores absolutos de concentración de boro, la microlocalización preferencial (no detectable por mediciones por ICP-OES) de boro en focos precancerosos con mayor riesgo de transformación maligna, favorecería un efecto preferencial en estas áreas (Monti Hughes et al., 2009, 2011).

Por lo tanto, diseñar protocolos de compuestos borados que no presenten radiotoxicidad como efecto secundario en los ensayos de eficacia terapéutica de BNCT permite aumentar la dosis a tumor, aumentando el control tumoral y evitando posibles recidivas y efectos tóxicos indeseables en los pacientes con cáncer de cabeza y cuello.

Por otro lado, la Electroquimioterapia (ECT) hasta la fecha, se utiliza para el tratamiento clínico de melanomas, sarcomas y otros tipos de cáncer de piel y tumores malignos subcutáneos (Mir, 2006; Marty et al., 2006). En cuanto al cáncer de cabeza y el cuello, este procedimiento está indicado sólo en tumores primarios localmente avanzados que no son candidatos a la terapia estándar, metástasis cutáneas, recurrencias locales y tumores secundarios de la región anterior de la cavidad oral (lengua, labios y paladar) (ej. Fumanti et al., 2011). Pero la limitación de esta técnica proviene del hecho de que no es posible tratar todos los tipos de tumores: hasta el momento, los electrodos pueden alcanzar sólo la capa subcutánea o, como máximo, mediante agujas largas, tejido conectivo y músculo. Obviamente, el uso de la ECT como tratamiento neoadyuvante, adyuvante o paliativo en pacientes con tumores de cabeza y cuello requiere estudios adicionales. En éste contexto, la combinación de las estrategias radiobiológicas de BNCT junto con el conocimiento de tecnologías físicas, médicas y biológicas de la ECT, son la base para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer de cabeza y cuello (Domanico et al., 2015). Los resultados obtenidos de los tratamientos realizados en el modelo de cáncer oral en hámster mediante la combinación de BNCT/GB-10+EP (en particular, con EP temprana, es decir, la EP realizada casi inmediatamente luego de la administración del compuesto borado) resultaron en un aumento de la eficacia terapéutica de BNCT, no sólo en cuanto a las remisiones completas de los tumores chicos (volumen $\leq 10 \text{ mm}^3$) sino también en términos de un efecto significativo en el control tumoral de los tumores medianos y grandes ($> 10 \text{ mm}^3$), sin presentar radiotoxicidad asociada en tejido precanceroso.

A pesar de los tratamientos modernos y los últimos equipos médicos, el progreso en cuanto a la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello no tuvo un crecimiento significativo. Esto se debe, por un lado, al alto riesgo de recurrencia en estos pacientes y, por otro lado, a las metástasis frecuentes y al desarrollo de segundos tumores primarios, especialmente en el tracto respiratorio y digestivo superior (Burotto y Szabo, 2014). Es importante diferenciar entre recurrencia y segundo tumor primario. El riesgo de recaída en los tres primeros años después del tratamiento de carcinoma de células escamosas de los tractos digestivo y respiratorio superiores es mucho mayor que el riesgo de un segundo cáncer. Después del tercer

año, el desarrollo de segundos tumores primarios es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en éstos pacientes (Heroiu et al., 2013).

Además, si bien la prevención de la enfermedad invasiva es una estrategia atractiva para reducir la morbilidad y la mortalidad de éste conjunto de neoplasias, hasta el momento no se ha demostrado de manera concluyente que un único agente sea capaz de prevenir cualquier neoplasia aerodigestiva superior (Heroiu et al., 2013). También podemos mencionar como efecto de ésta lamentable enfermedad el dolor que provocan las lesiones del cáncer oral. El dolor asociado al cáncer es una consecuencia devastadora del propio cáncer y desafortunadamente una secuela del tratamiento del cáncer. Los pacientes con dolor asociado al cáncer necesitan un equipo compasivo y multidisciplinario para su manejo. La calidad de vida en pacientes con cáncer de cabeza y cuello disminuye drásticamente ya que debido al dolor presentan complicaciones en los actos básicos de comer, hablar, deglutir y respirar. A veces, debido al mismo dolor, se debe realizar una reducción de dosis en la terapia, afectando de esta manera su tratamiento y pronóstico de supervivencia. Las modalidades preventivas deben ser implementadas cuando el dolor orofacial está presente como resultado de la terapia del cáncer. Por lo tanto, en los casos de radiación o procedimiento quirúrgico, un protocolo de fisioterapia antes y después de los procedimientos es imprescindible para mantener una apertura bucal funcional. El tamaño del tumor generalmente no está correlacionado con la severidad del dolor. El dolor relacionado con el cáncer en la región orofacial puede ser un síntoma de un tumor local o un tumor distante y puede presentar las mismas características en ambos casos. Pero dado que a veces el dolor puede ser el único síntoma de cáncer y en algunos casos puede ser el primer síntoma o síntoma de etapas posteriores, es necesario subrayar que el dolor en sí no debe ser utilizado como único criterio de diagnóstico para el cáncer oral (Romero-Reyes y Salvemini, 2016).

Dentro de la problemática del dolor producido en los pacientes con cáncer oral, podemos mencionar a la mucositis oral (MO) generada post tratamiento con radiación. La MO, incluida la mucositis oral severa (MOS), es una característica común de muchos otros regímenes de tratamiento, distintos de la radiación, para cánceres de cabeza y cuello. Sin embargo, generalmente ocurren con menor frecuencia y duración en el caso de terapias no radiantes (Elting et al., 2008). Actualmente no existen fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para mejorar la MOS en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Kudrimoti et al., 2016). La única terapia aprobada para la mucositis oral en cualquier contexto es la utilización de la droga palifermina (Nguyen et al., 2015; Lucchese et al., 2016), un factor de crecimiento tisular que está aprobado para uso en pacientes con neoplasias malignas hematológicas que reciben tratamiento mielotóxico que requiere soporte de células madre hematopoyéticas. Sin embargo, la palifermina está asociada con un riesgo potencial de estimulación de la proliferación de tumores sólidos (McDonnell y Lenz, 2007) y, por lo tanto, se utiliza sólo en cánceres hematológicos. También se han evaluado otros enfoques, como la fonobiomodulación, entre los que se incluyen los pacientes con cáncer de cabeza y de cuello (Fekrazad y Chiniforush, 2014), aunque también se han planteado algunas preocupaciones sobre el posible impacto negativo en el control de tumores (Sonis et al., 2016). A medida que la

complejidad biológica de MO se ha vuelto más clara, se han acumulado datos preclínicos y clínicos sobre el rol que jugaría una respuesta inmune innata exagerada como un evento de inicio clave que contribuiría a su patogénesis (Sonis et al., 2004).

Actualmente, los objetivos de los tratamientos en pacientes con enfermedad irreseccable de cáncer de cabeza y cuello son principalmente el control de síntomas y la prevención de nuevos síntomas relacionados con el cáncer, la mejora en la calidad de vida y si es evaluable, la respuesta tumoral, la estabilización de la enfermedad o ambos (control de la enfermedad combinada) y, además, la prolongación de la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión. Por desgracia, la correlación entre la disminución objetiva del tumor y el beneficio subjetivo (control de los síntomas y la calidad de vida) no se ha estudiado adecuadamente, lo que subraya la importancia de las pruebas clínicas en estos pacientes (Vermorken y Specenier, 2010).

Con respecto a las diferentes fases de los ensayos clínicos, es habitual, después de estudios preclínicos exitosos, que un nuevo tratamiento se evalúe primero por su seguridad y eficacia. A menudo, los ensayos clínicos que involucran nuevos fármacos se clasifican en tres fases constitutivas (Sauerwein y Zurlo, 2002). El proceso se desarrolla a través de las tres fases, y si alcanza el éxito esperado, un fármaco será aprobado por la autoridad reguladora nacional apropiada para uso en la población general. Sin embargo, debido a la naturaleza binaria de BNCT, estas fases de prueba necesitan ser adaptadas para considerar las necesidades específicas en BNCT. Un ensayo clínico de fase 0 puede investigar la farmacocinética de un nuevo fármaco en pequeñas dosis sub-terapéuticas. Para BNCT, el compuesto tiene que ensayarse adicionalmente para la captación selectiva en esta entidad tumoral seleccionada, en el sentido de confirmar si la concentración ^{10}B es adecuada tanto para el tumor, como así también para los tejidos normales o limitantes de dosis. Esto por sí solo no elimina la necesidad de un ensayo estándar de fase I que evalúe la toxicidad de la combinación del fármaco y la irradiación, ya que los efectos biológicos combinados de una distribución heterogénea de ^{10}B y una irradiación que contiene componentes de bajo y alto LET, sólo pueden ser investigados en los ensayos que involucran la irradiación (Wittig et al., 2009). Posteriormente, en un ensayo de fase I, la tolerancia y la seguridad de la combinación del nuevo compuesto con la irradiación de neutrones requieren una evaluación adicional. Dicho ensayo también debe incluir una investigación de dosis creciente, ya sea la dosis del fármaco y/o la dosis de irradiación. Un ensayo de fase II determinaría entonces la eficacia del tratamiento con BNCT a dosis terapéuticas del fármaco y una dosis de irradiación terapéutica con respecto al efecto anti-tumoral. Además, para conseguir una dosificación óptima (en relación al fármaco y la irradiación), también se debería establecer una variable adicional que se relaciona con el tiempo, de tal forma que éste tendría que establecerse como parte específicamente diseñada del estudio en esta fase (Moss, 2014).

En cuanto a los ensayos de fase III, que a menudo involucran ensayos multicéntricos controlados y aleatorios, son los que determinan definitivamente la respuesta terapéutica del nuevo tratamiento en comparación con el tratamiento actual estándar, en un gran grupo de pacientes. En cuanto a BNCT, los ensayos clínicos de ésta fase todavía no han llegado a nivel mundial. De hecho, debido al número de pacientes, duración y dificultades relativas a las

instalaciones para el tratamiento, un ensayo de fase III en BNCT se considera extremadamente costoso en recursos y tiempo. Por lo tanto, los ensayos para BNCT se realizan en número relativamente pequeño de centros disponibles. Sería necesario contribuir a resolver las cuestiones relativas a la distribución de ^{10}B como así también a la prescripción y planificación del tratamiento. Por consiguiente, es evidente que llevar a cabo actualmente ensayos clínicos fase III para BNCT es prácticamente imposible. El desarrollo de instalaciones hospitalarias basadas en aceleradores es un paso decisivo en el desarrollo de las aplicaciones clínicas de BNCT (Moss, 2014).

Aunque en la actualidad se hayan cerrado los proyectos de BNCT en los Estados Unidos y Europa, se siguen llevando a cabo ensayos clínicos de BNCT en otras partes del mundo, particularmente en Japón, Taiwán y Argentina. A lo largo de los años de estudios de BNCT, sólo unos pocos centros han realizado ensayos clínicos reconocidos. En otros centros, especialmente en Japón, se han llevado a cabo estudios clínicos fuera del marco de ensayos clínicos reconocidos. En los últimos años se han producido resultados alentadores de ensayos clínicos que se han llevado a cabo en Finlandia, Japón y Taiwán (Moss, 2014).

Si en un futuro, la terapia con BNCT alcanza una aceptación general como tratamiento oncológico de rutina, la demanda de facilidades de irradiación epitérmicas se vería incrementada significativamente. Para ello, sería necesario considerar modificaciones en los reactores existentes, diseñar nuevos reactores específicos para BNCT y fuentes basadas en aceleradores, como así también contemplar el desarrollo de multi-centros con instalaciones adecuadas para llevar a cabo ensayos clínicos a gran escala. Se presume que en la próxima década las fuentes de neutrones basadas en reactores serán remplazadas por las tecnologías de aceleradores para los ensayos clínicos de BNCT (Miyatake et al. 2016).

Por último, podemos destacar que los estudios de biodistribución de boro y eficacia terapéutica realizados en ésta tesis en modelos experimentales intentan contribuir al conocimiento de la radiobiología de BNCT y por lo tanto permitirían diseñar protocolos de tratamiento eficaces y seguros, que en un futuro podrían ser aplicados a nuevos compuestos borados para distintas patologías.

Conclusión general

Podemos concluir que los estudios de biodistribución con diferentes compuestos borados y diversas estrategias de administración en distintos modelos experimentales y pre-clínicos realizados en esta tesis demostraron que fue posible entregar boro en forma selectiva y en cantidades potencialmente terapéuticas a tumor, con relaciones de concentración de boro Tumor/ Tejido Normal y Tumor/Sangre que serían compatibles con tratamientos exitosos de BNCT. Estos resultados de biodistribución de boro son de suma relevancia a la hora de realizar una planificación terapéutica para BNCT.

También mediante ensayos de eficacia terapéutica y radiotoxicidad en el modelo de cáncer oral en hámster, demostramos que BNCT genera una respuesta tumoral con importantes remisiones completas y parciales y en algunos casos respuestas sostenidas por tiempos prolongados, sin generar radiotoxicidad en tejido normal y sin exceder la radiotolerancia del tejido precanceroso limitante de dosis.

En esta tesis se demostró el valor terapéutico de protocolos nuevos de administración de compuestos borados usando compuestos borados aprobados para su uso en pacientes y compuestos borados de última generación. Dos de esos protocolos fueron ensayados en estudios de BNCT *in vivo* demostrando su eficacia terapéutica a nivel experimental para el tratamiento de cabeza y cuello. Estos estudios aportan al conocimiento de la radiobiología de BNCT, contribuyendo a la optimización de BNCT para distintas patologías y al diseño de protocolos clínicos eficaces y seguros.

Referencias

Achilli C, Jadhav SA, Guidetti GF, Ciana A, Abbonante V, Malara A, Fagnoni M, Torti M, Balduini A, Balduini C, Minetti G (2014). Folic acid-conjugated 4-amino-phenylboronate, a boron-containing compound designed for boron neutron capture therapy, is an unexpected agonist for human neutrophils and platelets. *Chem Biol Drug Des* 83(5):532-40.

Adam R, Wicherts DA, de Haas RJ, Ciaccio O, Lévi F, Paule B, Ducreux M, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D (2009). Patients with initially unresectable colorectal liver metastases: is there a possibility of cure? *J. Clin Oncol.* 27(11):1829-35.

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

Alkaniotis K, Borla O, Monti V, Vivaldo G, Zanini A, Giannini G (2016). Radiotherapy dose enhancement using BNCT in conventional LINACs high-energy treatment: Simulation and experiment. *Rep. Pract Oncol Radiother.* 21(2):117-22.

Al-Madhoun AS, Johnsamuel J, Barth RF, Tjarks W, Eriksson S (2004). Evaluation of human thymidine kinase 1 substrates as new candidates for boron neutron capture therapy. *Cancer Res* 64(17): 6280-6.

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 (2004). Neutron radiography of human liver metastases after BPA infusion. In: *Proceedings 11th world congress on neutron capture therapy.*

Altieri S, Balzi M, Bortolussi S, Bruschi P, Ciani L, Clerici AM, Faraoni P, Ferrari C, Gadan MA, Panza L, Pietrangeli D, Ricciardi G, Ristori S (2009). Carborane derivatives loaded into liposomes as efficient delivery systems for boron neutron capture therapy. *J Med Chem* 52: 7829–35.

Andoh T, Fujimoto T, Suzuki M, Sudo T, Sakurai Y, Tanaka H, Fujita I, Fukase N, Moritake H, Sugimoto T, Sakuma T, Sasai H, Kawamoto T, Kirihata M, Fukumori Y, Akisue T, Ono K, Ichikawa H (2015). Boron neutron capture therapy (BNCT) as a new approach for clear cell sarcoma (CCS) treatment: Trial using a lung metastasis model of CCS. *Appl Radiat Isot.* 106:195-201.

Arias JL (2013). Liposomes in drug delivery: a patent review (2007 - present). *Expert Opin Ther Pat.* 23(11):1399-414.

Asano R, Nagami A, Fukumoto Y, Miura K, Yazama F, Ito H, Sakata I, Tai A (2014). Synthesis and biological evaluation of new boron-containing chlorin derivatives as agents for both photodynamic therapy and boron neutron capture therapy of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* 24(5): 1339-43.

Asbury AK, Ojemann RG, Nielsen SL, Sweet WH (1972). Neuropathologic study of fourteen cases of malignant brain tumor treated by boron-10 slow neutron capture radiation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 31(2):278-303.

Auterinen I, Hiismäki P, Kotiluoto P, Rosenberg RJ, Salmenhara S, Seppälä T, Seren T, Tanner, V, Aschan C, Kortesianiemi M, Kosunen A, Lampinen J, Savolainen S, Toivonen M, Välimäki P (2001). Metamorphosis of a 35 year-old TRIGA reactor into a modern BNCT facility. In: Hawthorne, M.F.(Ed.), *Frontiers in Neutron Capture Therapy*, vol.I. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, pp. 267–275.

Azab AK, Srebnik M, Doviner V, Rubinstein A (2005). Targeting normal and neoplastic tissues in the rat jejunum and colon with boronated, cationic acrylamide copolymers. *J Control Release* 106(1-2):14-25.

Azavedo E, Svane G, Nordenstrom B (1991). Radiological evidence of response to electrochemical treatment of breast cancer. *Clin Radiol.* 33:84-87.

Bakeine GJ, Di Salvo M, Bortolussi S, Stella S, Bruschi P, Bertolotti A, Nano R, Clerici A, Ferrari C, Zonta C, Marchetti A, Altieri S (2009). Feasibility study on the utilization of boron neutron capture therapy (BNCT) in a rat model of diffuse lung metastases. *Appl Radiat Isot.* 67(7-8 Suppl):S332-5.

Barth RF, Soloway AH, Fairchild RG (1990). Boron neutron capture therapy of cancer. *Cancer Res* 50(4):1061-70.

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

Barth RF, Soloway AH (1997). Boron neutron capture therapy of brain tumors--current status and future prospects. *J Neurooncol.* 33(1-2):3-7.

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

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

Barth RF, Yang W, Huo T, Riley KJ, Binns PJ, Grecula JC, Gupta N, Rousseau J, Elleaume H (2011). Comparison of intracerebral delivery of carboplatin and photon irradiation with an optimized regimen for boron neutron capture therapy of the F98 rat glioma. *Appl Radiat Isot.* 69(12):1813-6.

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

Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci* 9(3): 193-9.

Bassett RL (1990). A critical evaluation of the available measurements for the stable isotopes of boron. *Appl. Geochem.* 5, 541-554.

Bauzon M, Hermiston T (2014). Armed therapeutic viruses - a disruptive therapy on the horizon of cancer immunotherapy. *Front Immunol* 24(5):74.

Bavarnegin E, Sadremomtaz A, Khalafi H, Kasesaz Y (2016). Measurement of in-phantom neutron flux and gamma dose in Tehran research reactor boron neutron capture therapy beam line. *J Cancer Res Ther* 12(2):826-9.

Bayanov B, Kashaeva E, Makarov A, Malyshkin G, Samarin S, Taskaev S (2009). A neutron producing target for BINP accelerator-based neutron source. *Appl Radiat Isot.* 67(7-8 Suppl):S282-4.

Bendel P, Wittig A, Basilio F, Mauri PL, Sauerwein W (2010). Metabolism of borono-phenylalanine-fructose complex (BPA-fr) and borocaptate sodium (BSH) in cancer patients--results from EORTC trial 11001. *J Pharm Biomed Anal.* 51(1):284-7.

Bennet BD, Zha XH, Gay I and Morrison GM (1992). Intracellular boron localization and uptake in the cell cultures using imaging secondary ion mass spectrometry (ion microscopy) for neutron capture therapy for cancer. *Biol Cell* 74: 105-8.

Bennet BD, Mumford-Zisk J, Coderre JA and Morrison GM (1994). Subcellular localization of pboronophenylalanine-delivered boron-10 in the rat 9l gliosarcoma, cryogenic preparation in vitro and in vivo. *Radiat Res* 140: 72-8.

Bidwell GL (2012). Peptides for cancer therapy: a drug-development opportunity and a drug-delivery challenge. *Ther Deliv.* 3(5):609-21.

Bölling T, Schuck A, Paulussen M, Dirksen U, Ranft A, Könemann S, Dunst J, Willich N, Jürgens H (2008). Whole lung irradiation in patients with exclusively pulmonary metastases of Ewing tumor. Toxicity analysis and treatment results of the EICESS-92 trial. *Strahlenther Onkol.* 184(4):193-7.

Bond VP, Varma M, Feinendegen LE, Wu CS, Zaider M (1995). Application of the HSEF to assessing radiation risks in the practice of radiation protection. *Health Phys.* 68(5):627-31.

Bortolussi S, Bakeine JG, Ballarini F, Bruschi P, Gadan MA, Protti N, Stella S, Clerici A, Ferrari C, Cansolino L, Zonta C, Zonta A, Nano R, Altieri S (2011). Boron uptake measurements in a rat model for Boron Neutron Capture Therapy of lung tumours. *Appl Radiat Isot.* 69(2):394-8.

Brannon-Peppas L, Blanchette JO (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 56(11):1649-59.

Brennan MC, Svehla G (1989). Flow injection determination of boron copper molybdenum tungsten and zinc in organic matrices with direct current plasma optical emission spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 335, 893–899.

Brigger I, Dubernet C, Couvreur P (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54(5):631-51.

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

Burotto M, Szabo E (2014). PPAR γ in head and neck cancer prevention. *Oral Oncol.* 50(10):924-929.

Busse PM, Harling OK, Palmer MR, Kiger WS 3rd, Kaplan J, Kaplan I, Chuang CF, Goorley JT, Riley KJ, Newton TH, Santa Cruz GA, Lu XQ, Zamenhof RG (2003). A critical examination of the results from the Harvard-MIT NCT program phase I clinical trial of neutron capture therapy for intracranial disease. *J Neurooncol* 62(1-2):111-21.

Byvaltsev V, Kanygin V, Belykh E, Taskaev S (2012). Prospects in boron neutron capture therapy of brain tumors. *World Neurosurg* 78(1-2):8-9.

Calderón L, Sobrinho JC, Zaqueo KD, de Moura AA, Grabner AN, Mazzi MV, Marcussi S, Nomizo A, Fernandes CFC, Zuliani JP, Carvalho BMA, da Silva SL, Stábeli RG, Soares AM (2014). Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. Review article. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2014.

Campana L, Mocellin S, Basso M, Puccetti O, Salvo GD, Chiarion-Sileni V, Vecchiato A, Corti L, Rossi C, Nitti D (2009). Bleomycin-based electrochemotherapy: clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients, *Ann Surg Oncol.* 16 (1)191-199.

Capala J, Stenstam BH, Sköld K, MunckafRosenschöld P, Giusti V, Persson C, Wallin E, Brun A, Franzen L, Carlsson J, Salford L, Ceberg C, Persson B, Pellettieri L, Henriksson R (2003). Boron neutron capture therapy for glioblastomamultiforme: clinical studies in Sweden. *J Neurooncol* 62(1-2): 135-44.

Capuani S, Gili T, Bozzali M, Russo S, Porcari P, Cametti C, D'Amore E, Colasanti M, Venturini G, Maraviglia B, Lazzarino G, Pastore FS (2009). L-DOPA preloading increases the uptake of borophenylalanine in C6 glioma rat model: a new strategy to improve BNCT efficacy. *Int J RadiatOncolBiolPhys* 72(2):562-7.

Cardoso JE, Trivillin VA, Heber EM, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Itoiz ME, Bumaschny E, Pozzi E, Schwint AE (2007). Effect of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) on

normal liver regeneration: towards a novel therapy for liver metastases. *Int J Radiat Biol* 83(10):699-706.

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 (2009). Boron biodistribution study in colorectal liver metastases patients in Argentina. *ApplRadiatIsot* 67(7-8 Suppl): S76-9.

Carpano M, Perona M, Rodriguez C, Nievas S, Olivera M, Santa Cruz GA, Brandizzi D, Cabrini R, Pisarev M, Juvenal GJ, Dagrosa MA (2015). Experimental Studies of Boronophenylalanine (BPA) Biodistribution for the Individual Application of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Malignant Melanoma Treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 93(2):344-52.

Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzmann J, Klatzmann D (1993). Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of suicide gene. *Proc Natl Acad Sci* 90:7024-7028.

Ceberg CP, Brun A, Mir LM, Persson BR, Salford LG (1994). Enhanced boron uptake in RG 2 rat gliomas by electropermeabilization in vivo--a new possibility in boron neutron capture therapy. *Anticancer Drugs.* 5(4):463-6.

Cemažar M, Skrk J, Mitrovic B, Sersa G (2000). Changed delivery of boron to tumours using electroporation for boron neutron capture therapy with BSH. *Br J Radiol.* 73(866):195-200.

Cemažar J, Kotnik T (2012). Dielectrophoretic field-flow fractionation of electroporated cells. *Electrophoresis.* 33(18):2867-74

Chanana AD, Capala J, Chadha M, Coderre JA, Diaz AZ, Elowitz EH, Iwai J, Joel DD, Liu HB, Ma R, Pendzick N, Peress NS, Shady MS, Slatkin DN, Tyson GW, Wielopolski L (1999). Boron neutron capture therapy for glioblastomamultiforme: interim results from the phase I/II dose-escalation studies. *Neurosurgery*44(6):1182-92; discussion 1192-3.

Chandra S, Lorey DR, Lessig SL, Smith DR, Morrison GH. Quantitative imaging of boron from BPA and BSH in glioblastoma cells with ion microscopy (1997). In: *Advances in Neutron Capture Therapy. Volume II, Chemistry and Biology* (Larson B, Cranford J and Weinreich R, Eds.), Elsevier, Lausanne, pp. 315-20.

Chang HI, Ming-Kung Y (2012). Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine.* 7:49-60.

Chaveli-López B (2014). Oral toxicity produced by chemotherapy: A systematic review. *J Clin Exp Dent* 6(1): e81-90.

Chen YK, Lin LM (2010). DMBA-induced hamster buccal pouch carcinoma and VX2-induced rabbit cancer as a model for human oral carcinogenesis. *Expert Rev Anticancer Ther.* 10(9):1485-96.

ChithraniDB (2010). Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures. *Mol Membr Biol.* 27(7):299-311.

Chou FI, Chung HP, Liu HM, Chi CW, Lui WY (2009). Suitability of boron carriers for BNCT: accumulation of boron in malignant and normal liver cells after treatment with BPA, BSH and BA. *ApplRadiatIsot67(7-8 Suppl):S105-8.*

Ciofani G, Raffa V (2009). Chemically functionalized carbon nanotubes: emerging vectors for cell therapy. *Mini Rev Med Chem9(11):1251-61.*

Coderre JA, Glass JD, Fairchild RG, Roy U, Cohen S, Frand I (1987). Selective targeting of boronophenylalanine to melanoma in BALB/c mice for boron neutron capture therapy. *Cancer Res 47(23): 6377-83.*

Coderre JA, Kalef-Ezra JA, Fairchild RG, Micca PL, Reinstein LE, Glass JD (1988). Boron neutron capture therapy of a murine melanoma. *Cancer Res.48(22):6313-6.*

Coderre JA, Glass JD, Fairchild RG, Micca PL, Fand I, Joel DD (1990). Selective delivery of boron by the melanin precursor analogue p-boronophenylalanine to tumors other than melanoma. *Cancer Res. 50(1):138-41.*

Coderre JA, Makar MS, Micca PL, Nawrocky MM, Liu HB, Joel DD, Slatkin DN, Amols HI (1993). Derivations of relative biological effectiveness for the high-let radiations produced during boron neutron capture irradiations of the 9L rat gliosarcoma in vitro and in vivo. *Int J RadiatOncolBiolPhys27(5):1121-9.*

Coderre JA, Morris GM, Micca PL, Fisher CD, Ross GA (1995). Comparative assessment of single-dose and fractionated boron neutron capture therapy. *Radiat Res 144(3): 310-7.* Erratum in: *Radiat Res 145(3): 388.*

Coderre JA, Chanana AD, Joel DD, Elowitz EH, Micca PL, Nawrocky MM, Chadha M, Gebbers JO, Shady M y Statkin DN(1998). Biodistribution of boronophenylalanine in patients with glioblastoma multiforme: boron concentration correlates with tumor cellularity. *Radiat Res 149:163-170.*

Coderre JA, Morris GM (1999). The Radiation Biology of Boron Neutron Capture Therapy. *Radiat Res 151: 1-18.*

Coderre JA, Turcotte JC, Riley KJ, Binns PJ, Harling OK, Kiger WS (2003). Boron Neutron Capture Therapy: cellular targeting of high linearenergy transfer radiation. *Technol Cancer Res Treat 2: 355–75.*

Craparo EF, Bondi ML, Pitarresi G, Cavallaro G (2011). Nanoparticulate systems for drug delivery and targeting to the central nervous system. *CNS Neurosci. Ther. 17(6):670-7.*

Crawley V, Gadan M (2007). Proyecto final: Caracterización preliminar de la facilidad de irradiación de muestras biológicas del reactor RA-3 para la implementación del tratamiento de metástasis en hígado con BNCT. Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Favaloro.

Curado MP, Edwards B; Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P (2007). Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publications N° 160 Vol. IX.

Curiel DT, Gerritsen WR, Krul MR (2000). Progress in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 7(8):1197-9.

Das BC, Thapa P, Karki R, Schinke C, Das S, Kambhampati S, Banerjee SK, Van Veldhuizen P, Verma A, Weiss LM, Evans T (2013). Boron chemicals in diagnosis and therapeutics. *Future Med Chem* 5(6):653-76.

De Greef K, Rolfo C, Russo A, Chapelle T, Bronte G, Passiglia F, Coelho A, Papadimitriou K, Peeters M (2016). Multidisciplinary management of patients with liver metastasis from colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 22(32):7215-25.

De Jong GM, Aarts F, Hendriks T, Boerman OC, Bleichrodt RP (2009). Animal models for liver metastases of colorectal cancer: research review of preclinical studies in rodents. *J Surg Res* 154:167-176.

del Amo EM, Heikkinen AT, Mönkkönen J (2008). In vitro-in vivo correlation in P-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption. *Eur J Pharm Sci.* 36(2-3):200-11.

Denson L, Janitz AE, Brame LS, Campbell JE (2016). Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer: Changing Trends in Incidence in the United States and Oklahoma. *J Okla State Med Assoc.* 109(7-8):339-345.

Desai N (2012). Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *AAPS J* 14(2): 282-95.

Detta A, Cruickshank GS (2009). L-amino acid transporter-1 and boronophenylalanine-based boron neutron capture therapy of human brain tumors. *Cancer Res* 69(5): 2126-32.

Diaz A, Stelzer K, Laramore G, Wiersema R. Pharmacology studies of Na₂¹⁰B₁₀H₁₀ (GB-10) in human tumor patients (2002). In: M.W. Sauerwein, R. Moss and A. Wittig, editors. *Research and Development in Neutron Capture Therapy*, Bologna: Monduzzi Editore, International Proceedings Division; p. 993–9.

Doktorovova S, Souto EB, Silva AM (2014). Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - A systematic review of in vitro data. *Eur J Pharm Biopharm.* pii: S0939-6411(14)00047-2.

Domanico R, Trapasso S, Santoro M, Pingitore D, Allegra E (2015). Electrochemotherapy in combination with chemoradiotherapy in the treatment of oral carcinomas in advanced stages of disease: efficacy, safety, and clinical outcomes in a small number of selected cases. *Drug Des Devel Ther.* 9:1185-91.

Dörr W, Schlichting S, Bray MA, Flockhart IR, Hopewell JW (2005). Effects of dexpanthenol with or without Aloe vera extract on radiation-induced oral mucositis: Preclinical studies. *Int J Radiat Biol* 81(3):243–250.

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

Evans EH, Caruso JA (1993). Low pressure inductively coupled plasma source for mass spectrometry. *J. Anal. Atom Spectrom.*8, 427–431.

Evans EH, Giglio JJ (1993). Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry- a review. *J. Anal. Atom Spectrom.*8, 1–18.

Evans S, Krahenbuhl (1994). Boron analysis in biological material- Microwave digestion procedure and determination by different methods. *Fresen. J. Anal. Chem.* 349:454-459.

Elhanati G, Salomon Y, Bendel P (2001). Significant differences in the retention of the borocaptate monomer (BSH) and dimer (BSSB) in malignant cells. *Cancer Lett.* 172(2):127-32.

ElMeshad AN, Tadros MI (2011). Transdermal delivery of an anti-cancer drug via w/o emulsions based on alkyl polyglycosides and lecithin: design, characterization, and in vivo evaluation of the possible irritation potential in rats. *AAPS Pharm Sci Tech* 12(1):1-9.

Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS (2007). Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 68(4):1110-20.

Elting LS, Keefe DM, Sonis ST, Garden AS, Spijkervet FK, Barasch A, Tishler RB, Canty TP, Kudrimoti MK, Vera-Llonch M; Burden of Illness Head and Neck Writing Committee (2008). Patient-reported measurements of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without chemotherapy: demonstration of increased frequency, severity, resistance to palliation, and impact on quality of life. *Cancer.* 113(10):2704-13

Evstigneeva RP, Zaitsev AV, Luzgina VN, Ol' Shevskaya VA, Shtil AA (2003). Carboranylporphyrins for boron neutron capture therapy of cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3(6):383-92.

Fairchild RG, Bond VP (1985). Current status of ¹⁰B-neutron capture therapy: enhancement of tumor dose via beam filtration and dose rate, and the effects of these parameters on minimum boron content: a theoretical evaluation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 11(4):831-40.

Fang JY, Al-Suwayeh SA (2012). Nanoparticles as delivery carriers for anticancer prodrugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 9(6):657-69.

Farhat A, Ahmad F, Arafat H (2013). Analytical techniques for boron quantification supporting desalination processes: A review. *Desalination* 310: 9-17.

Farías RO, Bortolussi S, Menéndez PR, González SJ (2014). Exploring Boron Neutron Capture Therapy for non-small cell lung cancer. *Phys Med.* 30(8):888-97.

Farías RO, Garabalino MA, Ferraris S, Santa María J, Rovati O, Lange F, Trivillin VA, Monti Hughes A, Pozzi EC, Thorp SI, Curotto P, Miller ME, Santa Cruz GA, Bortolussi S, Altieri S, Portu AM, Saint Martin G, Schwint AE, González SJ (2015). Toward a clinical application of ex situ boron neutron capture therapy for lung tumors at the RA-3 reactor in Argentina. *Med Phys.* 42(7):4161-73.

Feakes DA, Shelly K, Knobler CB, Hawthorne MF (1994). $\text{Na}_3[\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3]$: synthesis and liposomal delivery to murine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(8):3029-33.

Feakes DA, Shelly K, Hawthorne MF (1995). Selective boron delivery to murine tumors by lipophilic species incorporated in the membranes of unilamellar liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(5):1367-70.

Fekrazad R, Chiniforush N (2014). Oral mucositis prevention and management by therapeutic laser in head and neck cancers. *J Lasers Med Sci.* 5(1):1-7. Review.

Feng B, Tomizawa K, Michiue H, Miyatake S, Han XJ, Fujimura A, Seno M, Kirihata M, Matsui H (2009). Delivery of sodiumborocaptateto glioma cellsusingimmunoliposomeconjugatedwith anti-EGFR antibodiesby ZZ-His. *Biomaterials* 30(9): 1746-55.

Ferrari C, Zonta C, Cansolino L, Clerici AM, Gaspari A, Altieri S, Bortolussi S, Stella S, Bruschi P, Dionigi P, Zonta A (2009). Selective uptake of p-boronophenylalanine by osteosarcoma cells for boron neutron capture therapy. *ApplRadiatIsot* 67(7-8 Suppl): S341-4.

Fritz-Niggli H (1995). 100 years of radiobiology: implications for biomedicine and future perspectives. *Experientia* 51(7):652-64.

Fujii H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai M, Suzuki M, Asano T, Doki Y, Kirihata M, Ono K, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y, Lee CM (2011). Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors in vivo. *RadiatOncol*6: 8.

Fujimoto T, Andoh T, Sudo T, Fujita I, Imabori M, Moritake H, Sugimoto T, Sakuma Y, Takeuchi T, Sonobe H, Epstein AL, Akisue T, Kirihata M, KurosakaM, Fukumori Y, Ichikawa H (2011). Evaluation of BPA uptake in clear cell sarcoma (CCS) in vitro and development of an in vivo model of CCS for BNCT studies. *ApplRadiatIsot* 69(12): 1713-6.

Fukuda H, Hiratsuka J, Kobayashi T, Sakurai Y, Yoshino K, Karashima H, Turu K, Araki K, Mishima Y, Ichihashi M (2003). 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.* 26(3):97-103.

Fukumura D, Jain RK (2007). Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for antiangiogenesis and normalization. *Microvasc Res* 74:72–84.

Fumanti C, Berardi A, Bertino G, Occhini A, Mura F, Tagliabue M, Benedetto S, Mevio N, Benazzo M (2011). Electrochemioterapia (ECT) nei tumori testa e collo: un'alternativa ai trattamenti convenzionali nelle forme avanzate. *Bollettino della Società Medico Chirurgica di Pavia*, vol. 124, n°. 2, pagg. 245-248.

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

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

Gabel D (1993). Radiobiological considerations concerning the development of compounds for boron neutron capture therapy. *Strahlenther Onkol.* 169(1):65-70.

Gao T, Petrlova J, He W, Huser T, Kudlick W, Voss J, Coleman MA (2012). Characterization of de novo synthesized GPCRs supported in nanolipoprotein discs. *PLoS One.* 7(9):e44911.

Garabalino MA, Monti Hughes A, Molinari AJ, Heber EM, Pozzi ECC, Cardoso JE, Colombo LL, Nieves SI, Nigg DW, Aromando RF, Itoiz ME, Trivillin VA, Schwint AE (2011). Boron neutron capture therapy (BNCT) for the treatment of liver metastases: biodistribution studies of boron compounds in an experimental model. *Radiat Environ Biophys* 50: 199–207.

Garabalino MA, Olaiz N, Pozzi ECC, Thorp S, Curotto P, Itoiz ME, Aromando R, Portu A, Saint Martin G, Monti Hughes A, Trivillin V A, Marshall G, Schwint AE (2014). Electroporación para optimizar el "targeting" de boro en la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT): desarrollo e implementación de la técnica en un modelo de cáncer bucal en hámster. Buenos Aires, AATN 2014.

Garden OJ, Rees M, Poston GJ, Mirza D, Saunders M, Ledermann J, Primrose JN, Parks RW (2006). Guidelines for resection of colorectal cancer liver metastases. *Gut* 55 Suppl 3.

Gibson CR, Staubus AE, Barth RF, Yang W, Ferketich AK, Moeschberger MM (2003). Pharmacokinetics of sodium borocaptate: a critical assessment of dosing paradigms for boron neutron capture therapy. *J Neurooncol.* 62(1-2):157-69.

Gillies ER, Fréchet JM (2005). Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov Today* 10(1):35-43.

Gimbel MI, Delman KA, Zager JS (2008). Therapy for unresectable recurrent and in-transit extremity melanoma. *Cancer Control*. 15(3):225-32.

Gómez D, Alonso D. Introducción a la Oncología Molecular. 1° Edición. Argentina. Universidad Nacional de Quilmes, **1998**. pp. 19-26. ISBN: 987-9173-29-5.

González SJ, Bonomi MR, Santa Cruz GA, Blaumann HR, Calzetta Larriou OA, Menéndez P, Jiménez Rebagliati R, Longhino J, Feld DB, Dagrosa MA, Argerich C, Castiglia SG, Batistoni DA, Liberman SJ, Roth BM (2004). First BNCT treatment of a skin melanoma in Argentina: dosimetric analysis and clinical outcome. *Appl Radiat Isot* 61(5): 1101-5.

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

Goodman JH, Yang W, Barth RF, Gao Z, Boesel CP, Staubus AE, Gupta N, Gahbauer RA, Adams DM, Gibson CR, Ferketich AK, Moeschberger ML, Soloway AH, Carpenter DE, Albertson BJ, Bauer WF, Zhang MZ, Wang CC (2000). Boron neutron capture therapy of brain tumors: biodistribution, pharmacokinetics, and radiation dosimetry sodium borocaptate in patients with gliomas. *Neurosurgery*. 47(3):608-21; discussion 621-2.

Goodman y Gilman (2001). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. Mc Graw Hill Interamericana Editores, 10ª Edición, USA, pp. 1-40.

Goodman y Gilman (2012). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Brunton L, Chabner B, Knollman B. Mc Graw Hill Interamericana Editores, 12ª Edición, México, pp. 1-145.

Goszczyński TM, Kowalski K, Leśnikowski ZJ, Boratyński J (2015). Solid state, thermal synthesis of site-specific protein-boron cluster conjugates and their physicochemical and biochemical properties. *Biochim Biophys Acta*. 1850(2):411-8.

Gregoire DC (1987). Determination of boron isotope ratios in geological materials by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* 59, 2479-2484.

Gregoire DC (1990). Determination of boron in fresh and saline waters by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Atom Spectrom.* 7, 623-626.

Grimes RN (2004). Viewpoints: Chemists on Chemistry Boron Clusters Come of Age. *Journal of Chemical Education* Vol. 81 No.5.

Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG, Nedospasov SA (2006). Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: From simple paradigms to complex mechanisms. *Int Rev Cytol.* 252:129-61. Review.

Haapaniemi A, Kankaanranta L, Saat R, Koivunoro H, Saarilahti K, Mäkitie A, Atula T, Joensuu H (2016). Boron Neutron Capture Therapy in the Treatment of Recurrent Laryngeal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 95(1):404-10.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1):57-70.

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

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

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

Hashibe M, Ritz B, Le AD, Li G, Sankaranarayanan R, Zhang ZF (2005). Radiotherapy for oral cancer as a risk factor for second primary cancers. *Cancer Lett* 220(2):185-95.

Hatanaka H, Nakagawa Y (1994). Clinical results of long-surviving brain tumor patients who underwent boron neutron capture therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 28(5):1061-6.

Hawthorne MF, Shelly K (1997). Liposomes as drug delivery vehicles for boron agents. *J Neurooncol.* 33(1-2):53-8.

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

Heber E, Trivillin V, Nigg D, Kreimann EL, Itoiz ME, Rebagliati RJ, Batistoni D, Schwint AE (2004). Biodistribution of GB-10($\text{Na}_2^{10}\text{B}_{10}\text{H}_{10}$) in an experimental model of oral cancer in the hamster cheek pouch. *Arch Oral Biol* 49: 313–24.

Heber EM, Trivillin VA, Nigg DW, Itoiz ME, González BN, Rebagliati RJ, Batistoni D, Kreimann EL, Schwint AE (2006). Homogeneous boron targeting of heterogeneous tumors for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT): chemical analyses in the hamster cheek pouch oral cancer model. *Arch Oral Biol* 51:922–29.

Heber EM, Aromando RF, Trivillin VA, Itoiz ME, Nigg DW, Kreimann EL, Schwint AE (2007). 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.* 52(3):273-9.

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

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

Hellevik T, Martinez-Zubiaurre I (2014). Radiotherapy and the tumor stroma: the importance of dose and fractionation. *Front Oncol* 21(4):1.

Henriksson R, Capala J, Michanek A, Lindahl SA, Salford LG, Franzén L, Blomquist E, Westlin JE, Bergenheim AT (2008). Swedish Brain Tumour Study Group. Boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastomamultiforme: a phase II study evaluating a prolonged high-dose of boronophenylalanine (BPA). *RadiotherOncol*88(2): 183-91.

Heroiu AD, Danciu CE, Popescu CR (2013). Multiple Cancers of the Head and Neck. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine* 8(1): 80-85.

Hong EJ, Choi DG, Shim MS (2015). Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharmaceutica Sinica B*2016;6(4):297–307.

Honová H, Safanda M, Petruzalka L, Burian J, Marek M, Rejchrt J, Sus F, Tovarys F, Dbalý V, Honzátko J, Tomandl I, Mares V (2004). Neutron capture therapy in the treatment of glioblastoma multiforme. Initial experience in the Czech Republic. *Cas Lek Cesk.* 143(1):44-7.

Hopewell JW, Morris GM, Schwint A, Coderre JA (2011). The radiobiological principles of boron neutron capture therapy: a critical review. *ApplRadiatIsot*69(12):1756-9.

Horiguchi H, Sato T, Kumada H, Yamamoto T Sakae T (2015). Estimation of relative biological effectiveness for boron neutron capture therapy using the PHITS code coupled with a microdosimetric kinetic model. *Journal of Radiation Research* 56:382-390.

Horn V, Buchar E, Janků I (1997). Kidney function changes in rats after single-dose administration of borocaptate sodium. *Physiol Res.* 46(4):279-83.

<http://www.bnct.kek.jp/eng/target.html>

<http://www.chromedia.org>

<http://www.eaglabs.com/mc/inductively-coupled-plasma-spectroscopy.html>

<http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>

<http://www.katchem.cz/>

<http://www.msal.gov.ar/>

<http://www.nds.iaea.org>

<http://www.rohs-cmet.in/content/icp-oes>

<http://www.sefh.es>

<http://www.who.int>

<http://laborioteccnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopa-de-plasma-icp-oes>

Ichikawa H, Taniguchi E, Fujimoto T, Fukumori Y (2009). Biodistribution of BPA and BSH after single, repeated and simultaneous administrations for neutron-capture therapy of cancer. *Appl Radiat Isot.* 67(7-8 Suppl):S111-4.

Iffland D, Grunewald C, Schütz C, Kratz JV, Langguth P, Hampel G (2011). Determination of boron concentration in liver and colon cancer cells after trans-stimulation with L-tyrosine. In: *Proceedings of 6th Young Researchers BNCT Meeting*, Hsinchu, Taiwan.

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

Janků I, Buchar E, Jiricka Z (1993). Nephrotoxicity of borocaptate after short-term administration in rabbits. *Toxicology.* 79(2):99-108.

Jarahi H, Kasesaz Y, Saleh-Koutahi SM (2016). Evaluation of the effective dose during BNCT at TRR thermal column epithermal facility. *Appl Radiat Isot.* 110:134-7.

Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman, D (2011). Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 61: 69–90.

Jensen SB, Peterson DE (2014). Oral mucosal injury caused by cancer therapies: current management and new frontiers in research. *J Oral Pathol Med.* 43(2):81-90.

Jham BC, da Silva Freire AR (2006). Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Braz J Otorhinolaryngol* 72(5): 704-8.

Jiménez Orozco E, Fernández Cantón I, Gordon Santiago MM, Moreno Vega S, Fuentes Pradera J (2005). *Manual de diagnóstico y terapéutica en neumología.* Ergon, 1º Edición, España, pp 589-602.

Jin SE, Jin HE, Hong SS (2014). Targeted Delivery System of Nanobiomaterials in Anticancer Therapy: From Cells to Clinics. *Biomed Res Int.* 2014:814208.

Joel D, Slatkin D, Fairchild R, Micca P, Nawrocky M (1989). Pharmacokinetics and tissue distribution of the sulfhydryl boranes (monomer and dimer) in glioma-bearing rats. *Strahlenther Onkol.* 165(2-3):167-70.

Joel DD, Coderre JA, Micca PL, Nawrocky MM (1999). Effect of dose and infusion time on the delivery of p-boronophenylalanine for neutron capture therapy. *J Neurooncol.* 41(3):213-21.

Joensuu H, Kankaanranta L, Seppälä T, Auterinen I, Kallio M, Kulvik M, Laakso J, Vähätalo J, Korttesniemi M, Kotiluoto P, Serén T, Karila J, Brander A, Järviluoma E, Rynnänen P, Paetau A, Ruokonen I, Minn H, Tenhunen M, Jääskeläinen J, Färkkilä M, Savolainen S (2003). Boron neutron capture therapy of brain tumors: clinical trials at the Finnish facility using boronophenylalanine. *J Neurooncol.* 62(1-2):123-34.

Kabalka GW, Smith GT, Dyke JP, Reid WS, Longford CP, Roberts TG, Reddy NK, Buonocore E, Hübner KF (1997). Evaluation of fluorine-18-BPA-fructose for boron neutron capture treatment planning. *J Nucl Med.* 38(11):1762-7.

Kabalka GW, Yao ML, Marepally SR, Chandra S (2009). Biological evaluation of boronated unnatural amino acids as new boron carriers. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl):S374-9.

Kageji T, Otersen B, Gabel D, Huiskamp R, Nakagawa Y, Matsumoto K (1998). Interaction of mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) with phosphatidylcholine: relevance to boron neutron capture therapy. *Biochim Biophys Acta.* 1391(3):377-83.

Kageji T, Nagahiro S, Otersen B, Gabel D, Nakaichi M, Nakagawa Y (2002). Subcellular biodistribution of sodium borocaptate (BSH: Na₂B₁₂H₁₁SH) in a rat glioma model in boron neutron capture therapy. *J Neurooncol.* 59(2):135-42.

Kageji T, Mizobuchi Y, Nagahiro S, Nakagawa Y, Kumada H (2011). Clinical results of boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma. *Appl Radiat Isot.* 69(12): 1823-5.

Kageji T, Nagahiro S, Mizobuchi Y, Matsuzaki K, Nakagawa Y, Kumada H (2014). Boron neutron capture therapy (BNCT) for newly-diagnosed glioblastoma: comparison of clinical results obtained with BNCT and conventional treatment. *J Med Invest.* 61(3-4):254-63. Review.

Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Saarilahti K, Atula T, Collan J, Salli E, Korttesniemi M, Uusi-Simola J, Mäkitie A, Seppänen M, Minn H, Kotiluoto P, Auterinen I, Savolainen S, Kouri M, Joensuu H (2007). Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 69(2):475-82.

Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Välimäki P, Beule A, Collan J, Korttesniemi M, Uusi-Simola J, Kotiluoto P, Auterinen I, Serén T, Paetau A, Saarilahti K, Savolainen S, Joensuu H (2011). L-boronophenylalanine-mediated boron neutron capture therapy for malignant glioma progressing after external beam radiation therapy: a Phase I study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 80(2): 369-76.

Kankaanranta L, Seppälä T, Koivunoro H, Saarilahti K, Atula T, Collan J, Salli E, Korttesniemi M, Uusi-Simola J, Välimäki P, Mäkitie A, Seppänen M, Minn H, Revitzer H, Kouri M, Kotiluoto P, Serén T, Auterinen I, Savolainen S, Joensuu H (2012). Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurred head-and-neck cancer: final analysis of a phase I/II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 82(1): e67-75.

Kassis AI y Adelstein SJ (2005). Radiobiologic Principles in Radionuclide Therapy. The Journal of Nuclear Medicine 46(1): 4S-12S.

Kato I, Ono K, Sakurai Y, Ohmae M, Maruhashi A, Imahori Y, Kirihata M, Nakazawa M, Yura Y (2004). Effectiveness of BNCT for recurrent head and neck malignancies. Appl Radiat Isot 61(5): 1069-73.

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

Kawabata S, Miyatake S, Kuroiwa T, Yokoyama K, Doi A, Iida K, Miyata S, Nonoguchi N, Michiue H, Takahashi M, Inomata T, Imahori Y, Kirihata M, Sakurai Y, Maruhashi A, Kumada H, Ono K (2009). Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma. J Radiat Res. 50(1):51-60.

Khodabandehloo H, Zahednasab H, Ashrafi Hafez A (2016). Nanocarriers Usage for Drug Delivery in Cancer Therapy. Iran J Cancer Prev 9(2):e3966.

Kievit FM, Zhang M (2011). Cancer nanotheranostics: improving imaging and therapy by targeted delivery across biological barriers. Adv Mater. 23(36):H217-47.

Kiger WS, Palmer MR, Riley KJ, Zamenhof RG, Busse PM (2001). A Pharmacokinetic Model for the Concentration of ^{10}B in Blood after Boronophenylalanine-Fructose Administration in Humans. Radiat Res 155(4):611-8.

Kiger JL, Kiger WS, Riley KJ, Binns PJ, Patel H, Hopewell JW, Harling OK, Busse PM, Coderre JA (2008). Functional and Histological Changes in Rat Lung after Boron Neutron Capture Therapy. Radiat Res 170:60-69.

Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, Tachampa K, Anzai N, Iribe Y, Endou H (2002). Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. Biochim Biophys Acta. 1565(1):112-21.

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

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

Kmieciak E, Tomaszewska B, Wątor K, Bodzek M (2016). Selected problems with boron determination in water treatment processes. Part I: comparison of the reference methods for ICP-MS and ICP-OES determinations. *Environ Sci Pollut Res Int.* 23(12):11658-67.

KnothWH, Sauer JC, England DC, Hertler WR, Muetterties EL (1964). Chemistry of Boranes. XIX.1 Derivative Chemistry of $B^{10}H_{10}^{-2}$ and $B_{12}H_{12}^{-2}$. *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86 (19), pp 3973–3983.

Ko SF, Yip HK, Zhen YY, Lee CC, Li JH, Lee CC, Leu S, Huang CC, Ng SH, Lin JW (2016). Cancer Patient-Derived Circulating Microparticles Enhance Lung Metastasis in a Rat Model: Dual-Source CT, Cellular, and Molecular Studies. *Mol Imaging Biol.* 18(4):490-9.

Kobaek-Larsen M, Thorup I, Diederichsen A, Fenger C, Hoitinga MR (2000). Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comp Med.* 50(1):16-26.

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

Kobayashi K, Kurihara H, Watanabe Y, Murakami N, Inaba K, Nakamura S, Wakita A, Okamoto H, Umezawa R, Takahashi K, Igaki H, Ito Y, Yoshimoto S, Shigematsu N, Itami J (2016). In vivo spatial correlation between (18)F-BPA and (18)F-FDG uptakes in head and neck cancer. *Appl Radiat Isot* 115: 138-46.

Koivunoro H, Hippeläinen E, Auterinen I, Kankaanranta L, Kulvik M, Laakso J, Seppälä T, Savolainen S, Joensuu H (2015). Biokinetic analysis of tissue boron (^{10}B) concentrations of glioma patients treated with BNCT in Finland. *Appl Radiat Isot* 106:189-94.

Kononov OE, Kononov VN, Bokhovko MV, Korobeynikov VV, Soloviev AN, Sysoev AS, Gulidov IA, Chu WT, Nigg DW (2004). Optimization of an accelerator-based epithermal neutron source for neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot.* 61(5):1009-13.

Kreimann EL, Itoiz ME, Dagrosa A, Garavaglia R, Farías S, Batistoni D, Schwint AE (2001a). The hamster cheek pouch as a model of oral cancer for boron neutron capture therapy studies: selective delivery of boron by boronophenylalanine. *Cancer Res.* 61(24):8775-81.

Kreimann EL, Itoiz ME, Longhino J, Blaumann H, Calzetta O, Schwint AE (2001b). Boron neutron capture therapy for the treatment of oral cancer in the hamster cheek pouch model. *Cancer Res* 61:8638–42 (Advances in Brief).

Kreimann EL, Miura M, Itoiz ME, Heber E, Garavaglia RN, Batistoni D, Rebagliati RJ, Roberti MJ, Micca PL, Coderre JA, Schwint AE (2003). Biodistribution of a carborane-containing porphyrin as a targeting agent for Boron Neutron Capture Therapy of oral cancer in the hamster cheek pouch. *Arch Oral Biol* 48(3):223-32.

Kreiner AJ, Bergueiro J, Cartelli D, Baldo M, Castell W, Asoia JG, Padulo J, Suárez Sandín JC, Igarzabal M, Erhardt J, Mercuri D, Valda AA, Minsky DM, Debray ME, Somacal HR, Capoulat ME, Herrera MS, Del Grosso MF, Gagetti L, Anzorena MS, Canepa N, Real N, Gun M, Tacca H (2016). Present status of Accelerator-Based BNCT. *Rep Pract Oncol Radiother.* 21(2):95-101.

Kucharkowski R, Müller E, Wüstkamp D (1996). Determination of boron in amorphous and nanostructured soft magnetic alloys, ribbons and layered materials by ICP atomic emission spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 355(3-4):256-60.

Kudrimoti M, Curtis A, Azawi S, Worden F, Katz S, Adkins D, Bonomi M, Elder J, Sonis ST, Straube R, Donini O (2016). Dusquetide: A novel innate defense regulator demonstrating a significant and consistent reduction in the duration of oral mucositis in preclinical data and a randomized, placebo-controlled phase 2a clinical study. *J Biotechnol.* 239:115-125.

Kueffer PJ, Maitz CA, Khan AA, Schuster SA, Shlyakhtina NI, Jalisatgi SS, Brockman JD, Nigg DW, Hawthorne MF (2013). Boron neutron capture therapy demonstrated in mice bearing EMT6 tumors following selective delivery of boron by rationally designed liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(16):6512-7.

Kulvik M, Vähätalo J, Buchar E, Färkkilä M, Järviluoma E, Jääskeläinen J, Kriz O, Laakso J, Rasilainen M, Ruokonen I, Kallio M (2003). Clinical implementation of 4-dihydroxyborylphenylalanine synthesised by an asymmetric pathway. *Eur J Pharm Sci* 18(2): 155-63.

Kulvik ME, Vähätalo JK, Benczik J, Snellman M, Laakso J, Hermans R, Järviluoma E, Rasilainen M, Färkkilä M, Kallio ME (2004). Boron biodistribution in beagles after intravenous infusion of 4-dihydroxyborylphenylalanine-fructose complex. *Appl Radiat Isot.* 61(5):975-9.

Kumada H, Matsumura A, Sakurai H, Sakae T, Yoshioka M, Kobayashi H, Matsumoto H, Kiyonagi Y, Shibata T, Nakashima H (2014). Project for the development of the linac based NCT facility in University of Tsukuba. *Appl Radiat Isot.* 88:211-5.

Laakso J, Ruokonen I, Lapatto R, Kallio M (2003). Inborn errors in metabolism and 4-boronophenylalanine-fructose-based boron neutron capture therapy. *Radiat Res.* 160(5):606-609.

LaHann T, Sills C, Hematillake G, Dymock T, Daniel G (1993). Cardiovascular Toxicities Associated with Intravenous Administration of p-Boronophenylalanine Formulations. *Advances in Neutron Capture Therapy*, Flenum Press, New York. pp. 5 13-5 17.

LaHann TR, Hematillake G., Larsen J., Daniell G (1996). Cardiovascular toxicity associated with single dose administration of the boron delivery drug borocaptate sodium. In: *Abstracts of the Seventh International Symposium on Neutron Capture Therapy for Cancer*, Zurich, Switzerland, p.6.

LaHann (1999). Formulation for I.V. administration of the boron delivery drug, boronophenylalanine (BPA). US Patent 5935944. August 10, 1999.

Lai CH, Lai NC, Chuang YJ, Chou FI, Yang CM, Lin CC (2013). Trivalent galactosyl-functionalized mesoporous silica nanoparticles as a target-specific delivery system for boron neutron capture therapy. *Nanoscale* 5(19):9412-8.

Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE (2008). Management of oral mucositis in patients who have cancer. *Dent Clin North Am.* 52(1):61-77, viii.

Lee HB, Blafox MD (1985). Blood volume in the rat. *J Nucl Med* 26:72–76

Letchoumy PV, Chandra Mohan KV, Kumaraguruparan R, Hara Y, Nagini S (2006). Black tea polyphenols protect against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oncol Res* 16(4): 167-78.

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

Liao AH, Chou FI, Kuo YC, Chen HW, Kai JJ, Chang CW, Chen FD, Hwang JJ (2010). Biodistribution of phenylboric acid derivative entrapped lipiodol and 4-borono-2-¹⁸F-fluoro-L-phenylalanine-fructose in GP7 TB liver tumor bearing rats for BNCT. *Appl Radiat Isot* 68(3):422-426.

Lieberman SJ, Dagrosa A, Jiménez Rebagliati RA, Bonomi MR, Roth BM, Turjanski L, Castiglia SI, González SJ, Menéndez PR, Cabrini R, Roberti MJ, Batistoni DA (2004). Biodistribution studies of boronophenylalanine-fructose in melanoma and brain tumor patients in Argentina. *Appl Radiat Isot* 61(5):1095-100.

Lin YC, Hwang JJ, Wang SJ, Yang BH, Chang CW, Hsiao MC, Chou FI (2012). Macro- and microdistributions of boron drug for boron neutron capture therapy in an animal model. *Anticancer Res.* 32(7):2657-64.

Liu YWH, Huang TT, Jiang SH, Liu HM (2004). Renovation of epithermal neutron beam for BNCT at THOR. *Appl. Radiat. Isot.* 61, 1039–1043.

Liu FS. (2009) Mechanisms of Chemotherapeutic Drug Resistance in Cancer Therapy—A Quick Review. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* Volume 48, Issue 3; 239-244.

Liu YH, Lee PY, Lin YC, Chou FI, Chen WL, Huang YS, Jiang SH (2014). Dose estimation of animal experiments at the THOR BNCT beam by NCTPlan and Xplan. *Appl Radiat Isot.* 88:125-8.

Liu YW, Chang CT, Yeh LY, Wang LW, Lin TY (2015). BNCT treatment planning for superficial and deep-seated tumors: Experience from clinical trial of recurrent head and neck cancer at THOR. *Appl Radiat Isot.* 106:121-4

Lorimore SA, Coates PJ, Wright EG (2003). Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene* 22(45): 7058-69.

Lucchese A, Matarese G, Ghislanzoni LH, Gastaldi G, Manuelli M, Gherlone E (2016). Efficacy and effects of palifermin for the treatment of oral mucositis in patients affected by acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 57(4):820-7.

Luderer MJ, de la Puente P, Azab AK (2015). Advancements in Tumor Targeting Strategies for Boron Neutron Capture Therapy. *Pharm Res* 32(9):2824-36.

Maeda H (2015). Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Adv Drug Deliv Rev* 30;91:3-6.

Maggiori L, Bretagnol F, Wagner M, Hatwell C, Panis Y (2012). Bilobar colorectal liver metastases: a new model for preclinical studies. *Int J Exp Path* 93:414-420.

Mais K (2006). Mucositis from radiotherapy to the head and neck: An overview. *Nursing* 1: 18–20.

Makino E, Sasaoka S, Aihara T, Sakurai Y, Maruhashi A, Ono K, Fujimoto W, Hiratsuka J (2012). 1013 The First Clinical Trial of Boron Neutron Capture Therapy Using ¹⁰B-para-boronophenylalanine for Treating Extramammary Paget's Disease. *Europ Jour Cancer* (48)5;244-245.

Marepally SR, Yao ML, Kabalka GW (2013). Boronated carbohydrate derivatives as potential boron neutron capture therapy reagents. *Future Med Chem*. 5(6):693-704.

Marshall PG, Miller ME, Grand S, Micca PL, Slatkin DN (1989). Toxicities of Na₂B₁₂H₁₁SH and Na₄B₂₄H₂₂S₂ in mice. *Basic Life Sci*. 50:333-51.

Martel S (2014). Magnetic therapeutic delivery using navigable agents. *Ther Deliv* 5(2):189-204.

Marty M, Sersa G, Garbary J, et al (2006). Electrochemotherapy -a simple, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOPE (European Standard Operating Procedures for Electrochemotherapy) study. *Eur. J. of Cancer Supplements*, special issue "Electrochemotherapy". 4,3-13.

Masunaga S, Kasaoka S, Maruyama K, Nigg D, Sakurai Y, Nagata K, Suzuki M, Kinashi Y, Maruhashi A, Ono K (2006). The potential of transferrin-pendant-type polyethyleneglycol liposomes encapsulating decahydrodecaborate-(10)B (GB-10) as (10)B-carriers for boron neutron capture therapy. *Int J Radiat Oncol BiolPhys* 66(5): 1515-22.

Matsumura Y, Maeda H (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46(12 Pt 1):6387–6392.

McCarthy DJ, Malhotra M, O'Mahony AM, Cryan JF, O'Driscoll CM (2015). Nanoparticles and the blood-brain barrier: advancing from in-vitro models towards therapeutic significance. *Pharm Res* 32(4):1161-85.

McDonnell AM, **Lenz** KL (2007). Palifermin: role in the prevention of chemotherapy- and radiation-induced mucositis. *Ann Pharmacother*. 41(1):86-94. Review.

McMillen IC (2001). The sheep-an ideal model for biomedical research? *ANZCCART News* 14(2):1-4.

McVey WJ, Matthews B, Motley DM, Linse KD, Blass DP, Booth RE, Feakes DA (2008). Investigation of the interactions of polyhedral borane anions with serum albumins. *J Inorg Biochem*. 102(4):943-51.

Mehta SC, Boudinot FD, Lu DR (1995) Pharmacokinetics of sodium mercaptoundecahydrododecaborate after intravenous injection in rats. *Drug Metab Dispos*. 23(12):1368-71.

Mehta SC, Lu DR (1995). Interspecies pharmacokinetic scaling of BSH in mice, rats, rabbits, and humans. *Biopharm Drug Dispos* 16(9):735-44.

Mehta SC, Lu DR (1996). Target drug delivery for boron neutron capture therapy. *Pharm. Res*. 13,344.

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 (2009). BNCT for skin melanoma in extremities: updated Argentine clinical results. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl): S50-3.

Mevio N, Bertino G, Occhini A, Scelsi D, Tagliabue M, Mura F, Benazzo M (2012). Electrochemotherapy for the treatment of recurrent head and neck cancers: preliminary results. *Tumori* 98(3): 308-13.

Miller M, Quintana J, Ojeda J, Langan S, Thorp S, Pozzi E, Szejnberg M, Estryk G, Nosal R, Saire E, Agrazar H, Graiño F (2009). New irradiation facility for biomedical applications at the RA-3 reactor thermal column. *Appl Radiat Isot* 67(7-8 Suppl):S226-229.

Mir L, **Orlowski** S (1999). Mechanisms of electrochemotherapy, *Adv Drug Deliv Rev* 35.107-118.

Mir LM. Bases and rationale of the electrochemotherapy (2006). *European Journal of Cancer Supplements*. 4:38-44.

Mishima Y, Honda C, Ichibashi M, Obara H, Hiratsuka J, Fukuda H, Karashima H, Kand KTK, Yoshino K (1989). Treatment of malignant melanoma by single neutron capture therapy with melanoma-seeking ¹⁰B-compound. *Lancet*. 1: 388-9.

Mishima Y (2001). New era of cell re-discovery led to the control of melanogenesis/melanoma: a scientific journey into terra incognita. *Pigment Cell Res.* 14(1):47-70.

Miyatake S, Kawabata S, Hiramatsu R, Kuroiwa T, Suzuki M, Kondo N, Ono K (2016). Boron Neutron Capture Therapy for Malignant Brain Tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 56(7): 361-71.

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

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

Monti Hughes A, Heber EM, Pozzi E, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Nieves SI, Aromando RF, Itoiz ME, Trivillin VA, Schwint AE (2009). Boron neutron capture therapy (BNCT) inhibits tumor development from precancerous tissue: an experimental study that supports a potential new application of BNCT. *Appl Radiat Isot.* 67(7-8 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 (2011). 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 Nov; 47(11):1017-22.

Monti Hughes AM, Pozzi EC, Thorp S, Garabalino MA, Farías RO, González SJ, Heber EM, Itoiz ME, Aromando RF, Molinari AJ, Miller M, Nigg DW, Curotto P, Trivillin VA, Schwint AE (2013). Boron neutron capture therapy for oral precancer: proof of principle in an experimental animal model. *Oral Dis.* 19(8):789-95.

Monti Hughes A, Pozzi E, Thorp SI, Curotto P, Medina VA, Martinel Lamas DJ, Rivera ES, Garabalino MA, Farías RO, Gonzalez SJ, Heber EM, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Trivillin VA, Schwint AE (2015 a). Histamine reduces boron neutron capture therapy-induced mucositis in an oral precancer model. *Oral Dis.* 21(6):770-7.

Monti-Hughes A, Aromando RF, Pérez MA, Schwint AE, Itoiz ME (2015 b). The hamster cheek pouch model for field cancerization studies. *Periodontol* 2000. 67(1):292-311.

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

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

Morris GM (1996). Review article: effects of radiation on the cell proliferation kinetics of epithelial tissues--therapeutic implications. *Br J Radiol.*69(825):795-803. Review.

Morris GM, Smith DR, Patel H, Chandra S, Morrison GH, Hopewell JW, Rezvani M, Micca PL, Coderre JA (2000). Boron microlocalization in oral mucosal tissue: implications for boron neutron capture therapy. *Br J Cancer.* 82(11):1764-71.

Mortensen MW, Sørensen PG, Björkdahl O, Jensen MR, Gundersen HJ, Bjørnholm T (2006). Preparation and characterization of Boron carbide nanoparticles for use as a novel agent in T cell-guided boron neutron capture therapy. *Appl Radiat Isot.* 64(3):315-24.

Moss, RL, Stecher-Rasmussen F, Ravensberg K, Constantine G, Watkins P (1992). Design, construction and installation of an epithermal neutron beam for BNCT at the high flux reactor Petten. In: Allen, B.J., Moore, D.E., Harrington, B.V. (Eds.), *Progress in Neutron Capture Therapy for Cancer*. Plenum Press, New York, pp. 63–66.

Moss RL (2014). Critical review, with an optimistic outlook, on Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Appl Radiat Isot* 88: 2-11.

Multhoff G, Radons J (2012). Radiation, inflammation, and immune responses in cancer. *Front Oncol.* 2: 58.

Nagini S, Letchoumy PV, Thangavelu A, Ramachandran CR (2009). Of humans and hamsters: a comparative evaluation of carcinogen activation, DNA damage, cell proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis in oral cancer patients and hamster buccal pouch carcinomas. *Oral Oncol.* 45(6):e31-7.

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

Nakagawa T, Nagai T (1976a). Interaction between serum albumin and mercaptoundecahydrododecaborate ion (an agent for boron-neutron capture therapy of brain tumor). I. Introductory remarks and preliminary experiments. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 24(12):2934-41.

Nakagawa T, Nagai T (1976b). Interaction between serum albumin and mercaptoundecahydrododecaborate ion (an agent for boron-neutron capture therapy of brain tumor). II. Proposal of two interaction models. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 24(12):2942-8.

Nakagawa T, Nagai T (1976c). Interaction between serum albumin and mercaptoundecahydrododecaborate ion (an agent for boron-neutron capture therapy of brain tumor). III. Results of analysis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 24(12):2949-54.

Nakagawa Y, Pooh K, Kobayashi T, Kageji T, Uyama S, Matsumura A, Kumada H (2009). Clinical review of the Japanese experience with boron neutron capture therapy and a proposed strategy using epithermal neutron beams. *J Neurooncol*. 62(1-2):87-99.

Nakazato Y, Tanaka R, Seki E, Iijima M, Kojima M, Yoshizumi M, Kato M, Kimura H, Kozawa K, Goya T (2008). Differential diagnosis of primary versus metastatic pulmonary adenocarcinomas using gene mutation analyses: a case report. *J Thorac Oncol*. 3(8):931-4.

Nano R, Barni S, Chiari P, Pinelli T, Fossati F, Altieri S, Zonta C, Roveda L, Zonta A (2004). Efficacy of boron neutron capture therapy on liver metastases of colon adenocarcinoma: Optical and ultrastructural study in the rat *Oncol Rep* 11:149.

Nariai T, Ishiwata K, Kimura Y, Inaji M, Momose T, Yamamoto T, Matsumura A, Ishii K, Ohno K (2009). PET pharmacokinetic analysis to estimate boron concentration in tumor and brain as a guide to plan BNCT for malignant cerebral glioma. *Appl Radiat Isot*. 67(7-8 Suppl):S348-50.

Nemoto H, Cai J, Asao N, Iwamoto S, Yamamoto Y (1995). Synthesis and biological properties of water-soluble p-boronophenylalanine derivatives. Relationship between water solubility, cytotoxicity, and cellular uptake. *J Med Chem*. 38(10):1673-8.

Neumann M, Kunz U, Lehmann H, Gabel D (2002). Determination of the subcellular of mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate (BSH) in human glioblastoma multiforme by electron microscopy. *J Neurooncol* 57(2):97-104.

Neumann M, Bergmann M, Gabel D (2003). Cell type selective accumulation of mercaptoundecahydro- closo-dodecaborate (BSH) in glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir (Wien)*. 145(11):971-5.

Nguyen DT, Shayani S, Palmer J, Dagens A, Forman SJ, Epstein J, Spielberger R (2015). Palifermin for prevention of oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-institution retrospective evaluation. *Support Care Cancer*. 23(11):3141-7.

Nigg DW, Wemple CA, Risler R, Hartwell JK, Harker YD, Laramore GE (2000). Modification of the University of Washington Neutron Radiotherapy Facility for Optimization of Neutron Capture Enhanced Fast-Neutron Therapy. *Med Phys* 27:359-367.

Niziol J, Zieliński Z, Leś A, Dąbrowska M, Rode W, Ruman T (2014). Synthesis, reactivity and biological activity of N(4)-boronated derivatives of 2'-deoxycytidine. *Bioorg Med Chem*. 22(15):3906-12.

Notari RE, DeYoung JL (1975). Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions. *J Pharm Sci* 64(7):1148–1157.

Obayashi S, Kato I, Ono K, Masunaga S, Suzuki M, Nagata K, Sakurai Y, Yura Y (2004). Delivery of ¹⁰B to oral squamous cell carcinoma using boronophenylalanine and borocaptate sodium for boron neutron capture therapy. *Oral Oncol.* 40(5):474-82.

O'Keefe SJ (2016). Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 13(12):691-706.

Ongayi O, Gottumukkala V, Fronczek FR, Vicente MG (2005). Synthesis and characterization of a carboranyl-tetrabenzoporphyrin. *Bioorg Med Chem Lett.* 15(6):1665-8.

Ono K, Masunaga SI, Kinashi Y, Takagaki M, Akaboshi M, Kobayashi T, Akuta K (1996). Radiobiological evidence suggesting heterogeneous microdistribution of boron compounds in tumors: its relation to quiescent cell population and tumor cure in neutron capture therapy. *Int J Rad Biol Phys* 34: 1081-6.

Ono K, Kinashi Y, Masunaga S, Suzuki M, Takagaki M (1998). Electroporation increases the effect of borocaptate (10B-BSH) in neutron capture therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 42(4):823-6.

Ono K, Masunaga S, Suzuki M, Kinashi Y, Takagaki M, Akaboshi M (1999). The combined effect of boronophenylalanine and borocaptate in boron neutron capture therapy for SCCVII tumors in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 43(2): 431-6.

Ono K, Kinashi Y, Suzuki M, Takagaki M, Masunaga S (2000). The Combined Effect of Electroporation and Borocaptate in Boron Neutron Capture Therapy for Murine Solid Tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 853–858.

Ono K (2016) An analysis of the structure of the compound biological effectiveness factor. *J Radiat Res* 57(1):i83-i89.

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

Papaspyrou M, Feinendegen LE, Müller-Gärtner HW (1994). Preloading with L-tyrosine increases the uptake of boronophenylalanine in mouse melanoma cells. *Cancer Res* 54(24): 6311-4.

Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery.* vol. 9, pp. 203-14.

Pérez MA, Raimondi AR, Itoiz ME (2005). An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med.* 34(1):17-22.

Perona M, Pontiggia O, Carpano M, Thomasz L, Thorp S, Pozzi E, Simian M, Kahl S, Juvenal G, Pisarev M, Dargosa A (2011). In vitro studies of cellular response to DNA damage induced by boron neutron capture therapy. *ApplRadiatIsot* 69(12): 1732-6.

Perrier D, Gibaldi M (1982). General derivation of the equation for time to reach a certain fraction of steady state. *J Pharm Sci*71(4):474-5.

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

Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. Review. *EMBO Reports* 15: 1243–1253.

Pinelli T, Altieri S, Fossati F, Zonta A, Ferrari C, Prati U, Roveda L, Ngnitejeu Tata S, Barni S, Chiari P, Nano R, Ferguson DM (2001). Operative modalities and effects of BNCT on liver metastases of colon adenocarcinoma: a microscopical and ultrastructural study in the rat. In: *Frontiers in neutron capture therapy.* Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p1427-1440.

Portu A, Molinari AJ, Thorp SI, Pozzi EC, Curotto P, Schwint AE, Saint Martin G (2015). Neutron autoradiography to study boron compound microdistribution in an oral cancer model. *Int J RadiatBiol* 91(4): 329-35.

Portu AM, Rossini AE, Gadan MA, Bernaola OA, Thorp SI, Curotto P, Pozzi EC, Cabrini RL, Martin GS (2016). Experimental set up for the irradiation of biological samples and nuclear track detectors with UV C. *Rep PractOncolRadiother*21(2):129-34.

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 (2009). Dosimetry and radiobiology at the new RA-3 reactor boron neutron capture therapy (BNCT) facility: application to the treatment of experimental oral cancer. *ApplRadiatIsot* 67(7-8 Suppl): S309-12.

Pozzi EC, Cardoso JE, Colombo LL, Thorp S, Monti Hughes A, Molinari AJ, Garabalino MA, Heber EM, Miller M, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Quintana J, Trivillin VA, Schwint AE (2012). Boron neutron capture therapy (BNCT) for liver metastasis: therapeutic efficacy in an experimental model. *Radiat Environ Biophys.* 51(3):331-9.

Prat NJ, Meyer AD, Langer T, Montgomery RK, Parida BK, Batchinsky AI, Cap AP (2015). Low-Dose Heparin Anticoagulation During Extracorporeal Life Support for Acute Respiratory Distress Syndrome in Conscious Sheep. *Shock.* 44(6):560-8.

Rao M, Trivillin VA, Heber EM, Cantarelli Mde L, Itoiz ME, Nigg DW, Rebagliati RJ, Batistoni D, Schwint AE (2004). BNCT of 3 cases of spontaneous head and neck cancer in feline patients. *ApplRadiatIsot*61(5):947-52.

Ratajski M, Wielkopolska S (2005). Dissertation. Bremen, Alemania.

Razetti A, Farías RO, Thorp SI, Trivillin VA, Pozzi EC, Curotto P, Schwint AE, González SJ (2014). Design, construction and application of a neutron shield for the treatment of diffuse lung metastases in rats using BNCT. *Appl Radiat Isot.* 88:50-4.

Romero-Reyes M, Salvemini D (2016). Cancer and orofacial pain. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 21(6):e665-71.

Roveda L, Prati U, Bakeine J, Trotta F, Marotta P, Valsecchi P, Zonta A, Nano R, Facchetti A, Chiari P, Barni S, Pinelli T, Altieri S, Braghieri A, Bruschi P, Fossati F, Pedroni P (2004). How to study boron biodistribution in liver metastases from colorectal cancer. *J Chem* 16:15-18.

Ruiz-Esquide G, Nervi B, Vargas A, Maíz A (2011). Treatment and prevention of cancer treatment related oral mucositis. *Rev Med Chil* 139(3): 373-81.

Sabnis N, Lacko AG (2012). Drug delivery via lipoprotein-based carriers: answering the challenges in systemic therapeutics. *Ther Deliv.* 3(5):599-608.

Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, Zeighamian V, Rahimzadeh A, Alimohammadi S, Hanifehpour Y, Joo SW (2014). PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(2):517-35.

Safronov AV, Sevryugina YV, Pichaandi KR, Jalisatgi SS, Hawthorne MF (2014). Synthesis of closo- and nido-biscarboranes with rigid unsaturated linkers as precursors to linear metallocarborane-based molecular rods. *Dalton Trans.* 43(13):4969-77.

Sah R, Brown P (1997). Boron determination: a review of analytical methods. *Microchem. J.* 56 285–304.

Sakamoto J, Annapragada A, Decuzzi P, Ferrari M (2007). Antibiological barrier nanovector technology for cancer applications. *Expert Opin Drug Deliv.* 4(4):359-69.

Salford LG, Persson BR, Brun A, Ceberg CP, Kongstad PC, Mir LM (1993). A new brain tumour therapy combining bleomycin with in vivo electropermeabilization. *Biochem Biophys Res Commun.* 194(2):938-43

Salt C, Lennox AJ, Takagaki M, Maguire JA, Hosmane NS (2004). Boron and gadolinium neutron capture therapy. *Russian Chemical Bulletin, International Edition, Vol. 53, No. 9, pp. 1871—1888.*

Sameer AS, Nissar S (2016). Epigenetics in diagnosis of colorectal cancer. *Mol Biol Res Commun.* 5(1):49-57.

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

Sarode SC, Sarode GS, Barpande S, Tupkari JV (2013). Efficacy of crystallization test for screening of oral squamous cell carcinoma with clinico-pathological correlation. *Indian J Dent Res.* 24(4):464-7.

Sasaki S, Fukuda N (1999). Dose-response relationship for induction of solid tumors in female B6C3F1 mice irradiated neonatally with a single dose of gamma rays. *J Radiat Res.* 40(3):229-41.

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

Schmitz T, Appelman K, Kudejova P, Schütz C, Kratz JV, Moss R, Otto G, Hampel G (2011). Determination of boron concentration in blood and tissue samples from patients with liver metastases of colorectal carcinoma using Prompt Gamma Ray Activation Analysis (PGAA). *Appl Radiat Isot.* 69(7):936-41.

Schwint AE, Trivillin VA (2015). 'Close-to-ideal' tumor boron targeting for boron neutron capture therapy is possible with 'less-than-ideal' boron carriers approved for use in humans. *Ther Deliv.* 6(3):269-72.

Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Miklavcic D, Rudolf Z (2000). Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 6(3):863-7.

Sersa G, Miklavcic D (2008). Electrochemotherapy of tumours. *J Vis Exp.* 22.

Shelly K, Feakes DA, Hawthorne MF, Schmidt PG, Krisch, Bauer WF (1992). Model studies directed toward the boron neutron-capture therapy of cancer: Boron delivery to murine tumors with liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89,* pp. 9039-9043.

Sheppard BS, Caruso JA (1994). Plasma mass spectrometry: consider the source. *J. Anal. Atom Spectrom.* 9, 145–149.

Shimosegawa E, Isohashi K, Naka S, Horitsugi G, Hatazawa J (2016). Assessment of ^{10}B concentration in boron neutron capture therapy: potential of image-guided therapy using ^{18}F FBPA PET. *Ann Nucl Med.* 30(10):749-755.

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

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

Slatkin D, Micca P, Forman A, Gabel D, Wielopolski L, Fairchild R (1986). Boron uptake in melanoma, cerebrum and blood from $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ and $\text{Na}_4\text{B}_{24}\text{H}_{22}\text{S}_2$ administered to mice. *Biochem Pharmacol.* 35(10):1771-6.

Smilowitz HM, Slatkin DN, Micca PL, Miura M (2013). Microlocalization of lipophilic porphyrins: non-toxic enhancers of boron neutron-capture therapy. *Int J Radiat Biol.* 89(8):611-7.

Smith DR, Chandra S, Coderre JA, Morrison GH (1996). Ion microscopy imaging of ^{10}B from pboronophenylalanine in a brain tumor model for boron neutron capture therapy. *Cancer Res* 56: 4302–6.

Smith DR, Chandra S, Coderre JA, Barth RF, Yang W, Liu L, Wilson JL, Micca PL, Nawrocky MM, Rotaru JH, Morrison GH (1997). Quantitative ion microscopy imaging of Boron-10 in rat brain tumors models for BNCT. In: *Advances in Neutron Capture Therapy. Vol II, Chemistry and Biology* (B. Larsson, J. Cranford and R. Weinreich, Eds.) pp. 308-14. Elsevier, Lausanne.

Smith DR, Chandra S, Barth RF, Yang W, Joel DD, Coderre JA (2001). Quantitative imaging and microlocalization of boron-10 in brain tumors and infiltrating tumor cells by SIMS ion microscopy: relevance to neutron capture therapy. *Cancer Res.* 61(22):8179-87.

Snyder HR, Reedy AJ, Lennarz WJ (1958). Synthesis of aromatic boronic acids. Aldehyde boronic acids and boronic acid analog of tyrosine. *J Am Chem Soc* 80: 835-8.

Soloway AH, Wright RL, Messer JR (1961). Evaluation of boron compounds for use in neutron capture therapy of brain tumors. I. Animal investigations. *J Pharmacol Exp Ther.* 134:117-22.

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

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

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 (2000). Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol* 36(4):373-81.

Sonis ST (2004). A biological approach to mucositis. *J Support Oncol.* 2(1): 21-32; discussion 35-36.

Sonis S, Wright Andreotta P, Lyng G (2016). On the pathogenesis of mTOR-associated stomatitis (mIAS) - studies using an organotypic model of the oral mucosa. *Oral Dis.* doi: 10.1111/odi.12616.

Soto A, Sonnenschein C (2011). The tissue organization field theory of cancer: A testable replacement for the somatic mutation theory. *Bioessays.* 33(5): 332–340.

Soto A, Sonnenschein C (2013). Paradoxes in Carcinogenesis: There Is Light at the End of That

Tunnell. *Disrupt Sci Technol*. 1(3): 154–156.

Stelzer KJ, Gavin PR, Risler R, Kippenes H, Hawthorne MF, Nigg DW, Laramore GE (2001). Boron neutron capture-enhanced fast neutron therapy (BNC/FNT) for non-small cell lung cancer in canine patients. In: Hawthorne MF, editor. *Frontiers in neutron capture therapy*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p.735-9.

Sumitani S, Oishi M, Yaguchi T, Murotani H, Horiguchi Y, Suzuki M, Ono K, Yanagie H, Nagasaki Y (2012). Pharmacokinetics of core-polymerized, boron-conjugated micelles designed for boron neutron capture therapy for cancer. *Biomaterials*. 33(13):3568-77.

Supsavhad W, Dirksen WP, Martin CK, Rosol TJ (2016). Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. *Vet J*. 210:7-16.

Suriano R, Rajoria S, George AL, Geliebter J, Tiwari RK, Wallack M (2013). Follow-up analysis of a randomized phase III immune therapeutic clinical trial on melanoma. *Mol Clin Oncol*. 1(3):466-472.

Suzuki M, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Sakurai Y, Nakamatsu K, Nishimura Y, Maruhashi A, Ono K (2004). Intra-arterial administration of sodium borocaptate (BSH)/lipiodol emulsion delivers B-10 to liver tumors highly selectively for boron neutron capture therapy: experimental studies in the rat liver model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 59(1):260-6.

Suzuki M, Sakurai Y, Hagiwara S, Masunaga S, Kinashi Y, Nagata K, Maruhashi A, Kudo M, Ono K (2007). First attempt of boron neutron capture therapy (BNCT) for hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 37(5):376-81.

Suzuki M, Suzuki O, Sakurai Y, Sakurai Y, Tanaka H, Kondo N, Kinashi Y, Masunaga S, Maruhashi A, Ono K (2012). Reirradiation for locally recurrent lung cancer in the chest wall with boron neutron capture therapy (BNCT). *Int Cancer Conf J* 1(4):235–8.

Suzuki M, Kato I, Aihara T, Hiratsuka J, Yoshimura K, Niimi M, Kimura Y, Ariyoshi Y, Haginomori S, Sakurai Y, Kinashi Y, Masunaga S, Fukushima M, Ono K, Maruhashi A (2014). Boron neutron capture therapy outcomes for advanced or recurrent head and neck cancer. *J Radiat Res*. 55(1):146-53.

Sweet WH, **Javid** M (1951). The possible use of slow neutrons plus boron-10 in the therapy of intracranial tumors. *Trans AmerNeurol Ass* 76: 60-3.

Sweet WH, Soloway AH, Brownell GL (1960). Studies relevant to slow neutron capture therapy of brain tumor. *ActaUnioInt Contra Cancrum* 16:1216-9.

Sweet WH, Messer JR, Hatnaka H (1986). Supplementary pharmacological study between 1972 and 1977 on purified mercaptoundecahydrododecaborate. Chapter IV in Hatanaka H (ed): *Boron Neutron Capture Therapy for Tumors*. Niigata, Japan: Nishimura Co., Ltd. pp.59-76.

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

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

Takagaki M, Oda Y, Miyatake S, Kikuchi H, Kobayashi T, Sakurai Y, Osawa M, Mori K, Ono K (1997). Boron neutron capture therapy: preliminary study of BNCT with sodium borocaptate ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) on glioblastoma. *J Neurooncol.* 35(2):177-85.

Takagaki M, Powell W, Sood A, Spielvogel BF, Hosmane NS, Kirihata M, Ono K, Masunaga SI, Kinashi Y, Miyatake SI, Hashimoto N (2001). Boronated dipeptide borotrimethylglycylphenylalanine as a potential boron carrier in boron neutron capture therapy for malignant brain tumors. *Radiat Res.* 156(1):118-22.

Tanaka T, Ishigamori R (2011). Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol.* 2011:603740.

Tang PP, Schweizer MP, Bradshaw KM, Bauer WF (1995). ^{11}B nuclear magnetic resonance studies of the interaction of borocaptate sodium with serum albumin. *Biochem Pharmacol.* 49(5):625-32.

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

Theodoropoulos D, Rova A, Smith JR, Barbu E, Calabrese G, Vizirianakis IS, Tsibouklis J, Fatouros DG (2013). Towards boron neutron capture therapy: the formulation and preliminary in vitro evaluation of liposomal vehicles for the therapeutic delivery of the dequalinium salt of bis-nido-carborane. *Bioorg Med Chem Lett* 23(22):6161-6.

Tietze LF, Griesbach U, Bothe U, Nakamura H, Yamamoto Y (2002). Novel carboranes with a DNA binding unit for the treatment of cancer by boron neutron capture therapy. *ChemBiochem* 3(2-3): 219-25.

Trivillin VA, Heber EM, Itoiz ME, Nigg D, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE (2004). Radiobiology of BNCT mediated by GB-10 and GB-10 + BPA in experimental oral cancer. *Appl Radiat Isot* 61: 939–45.

Trivillin VA, Heber EM, Nigg DW, Itoiz ME, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE (2006). Therapeutic success of boron neutron capture therapy (BNCT) mediated by a chemically non-selective boron agent in an experimental model of oral cancer: a new paradigm in BNCT radiobiology. *Radiat Res* 166(2): 387-96.

Trivillin VA, Heber EM, Rao M, Cantarelli MA, Itoiz ME, Nigg DW, Calzetta O, Blaumann H, Longhino J, Schwint AE (2008). Boron neutron capture therapy (BNCT) for the treatment of

spontaneous nasal planum squamous cell carcinoma in felines. *Radiat Environ Biophys* 47(1): 147-55.

Trivillin VA, Garabalino MA, Colombo LL, González SJ, Farías RO, Monti Hughes A, Pozzi EC, Bortolussi S, Altieri S, Itoiz ME, Aromando RF, Nigg DW, Schwint AE (2014). Biodistribution of the boron carriers boronophenylalanine (BPA) and/or decahydrodecaborate (GB-10) for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in an experimental model of lung metastases. *Appl Radiat Isot.* 88:94-8.

Tozon N, Pavlin D, Sersa G, Dolinsek T, Cemazar M (2014). Electrochemotherapy with intravenous bleomycin injection: an observational study in superficial squamous cell carcinoma in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* Vol. 16(4) 291–299.

Tozon N, Lamprecht Tratar U, Znidar K, Sersa G, Teissie J, Cemazar M (2016). Operating Procedures of the Electrochemotherapy for Treatment of Tumor in Dogs and Cats. *J Vis Exp.* (116).

Tros de Ilarduya C, García L, Düzgünes N (2010). Liposomes and lipopolymeric carriers for gene delivery. *J Microencapsul.* 27(7):602-8.

Ucar GME, Ibáñez BO, Ferrari RC, Pollono FD (2012). Tumores pulmonares en pediatría. *Rev Chil Enfermedades Respir* 28:199–211.

Urasa IT (1984). Determination of arsenic, boron, carbon, phosphorus, selenium and silicon in natural waters by direct current plasma atomic emission spectrometry. *Anal. Chem.* 56, 904–908.

Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, Yapijakis C, Patsouris E (2008). The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol* 44(4):315-24.

Valliant JF, Schaffer P, Stephenson KA, Britten JF (2002). Synthesis of boroxifen, a nido-carborane analogue of tamoxifen. *J Org Chem.* 67(2):383-7.

Vanderpool RA, Hoff D, Johnson PE (1994). Use of inductively coupled plasma-mass spectrometry in boron-10 stable isotope experiments with plants, rats, and humans. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl. 7), 13-20.

Vaughan B, Claassen L (1996). Optimising an inductively coupled plasma emission spectrometer analysis time with the use of a direct injection nebuliser. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 27, 819- 827.

Vermorken JB, Specenier P (2010). Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol.* 2010 Oct;21 Suppl 7:vii252-61.

Veszeka S, Bocsik A, Walter FR, Hantosi D, Deli MA (2015). Blood-brain barrier co-culture models to study nanoparticle penetration: focus on co-culture systems. *Acta Biol Szeged* 59 (Suppl.2):157-168

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 (2011). BNCT for locally recurrent head and neck cancer: preliminary clinical experience from a phase I/II trial at TsingHua Open-Pool Reactor. *ApplRadiatIsot* 69(12): 1803-6.

Wang LW, Chen YW, Ho CY, Hsueh Liu YW, Chou FI, Liu YH, Liu HM, Peir JJ, Jiang SH, Chang CW, Liu CS, Lin KH, Wang SJ, Chu PY, Lo WL, Kao SY, Yen SH (2016). Fractionated Boron Neutron Capture Therapy in Locally Recurrent Head and Neck Cancer: A Prospective Phase I/II Trial. *Int J RadiatOncolBiolPhys*95(1):396-403.

Ward NI, Abou-Shakra FR, Durrant SF (1990). Trace elemental content of biological materials. A comparison of NAA and ICP-MS analysis. *Biol Trace Elem Res.*26-27:177-87.

Watson-Clark RA, Banquerigo ML, Shelly K, Hawthorne MF, Brahn E (1998). Model studies directed toward the application of boron neutron capture therapy to rheumatoid arthritis: boron delivery by liposomes in rat collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(5):2531-4.

Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ (1986). Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol.* 150(3):195-203.

Wicki A, Ritschard R, Loesch U, Deuster S, Rochlitz C, Mamot C (2015). Large-scale manufacturing of GMP-compliant anti-EGFR targeted nanocarriers: production of doxorubicin-loaded anti-EGFR-immunoliposomes for a first-in-man clinical trial. *Int J Pharm.* 484(1-2):8-15.

Wittig A, Sauerwein WA, Coderre JA (2000). Mechanisms of transport of p-borono-phenylalanine through the cell membrane in vitro. *Radiat Res* 153(2): 173-80.

WittigA, Malago M, Collette L, Huiskamp R, Bührmann S, Nievaart V, Kaiser GM, Jöckel KH, Schmid KW, Ortmann U, Sauerwein WA (2008 a). Uptake of two ¹⁰B-compounds in liver metastases of colorectal adenocarcinoma for extracorporeal irradiation with boron neutron capture therapy (EORTC Trial 11001). *Int J Cancer.* 122(5): 1164-71.

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 (2008b). Boron analysis and boron imaging in biological materials for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT). *Crit Rev Oncol Hematol.* 68(1):66-90.

Wittig A, Collette L, Appelman K, Bührmann S, Jäckel MC, Jöckel KH, Schmid KW, Ortmann U, Moss R, Sauerwein WA (2009). EORTC trial 11001: distribution of two ¹⁰B-compounds in patients with squamous cell carcinoma of head and neck, a translational research/phase 1 trial. *J Cell Mol Med.* 13(8B): 1653-65.

Wong MW (2014). Oral Complications and Management Strategies for Patients Undergoing Cancer Therapy. Review article. Hindawi Publishing Corporation. The Scientific World Journal Volume 2014.

Wongthai P, Hagiwara K, Miyoshi Y, Wiriyasermkul P, Wei L, Ohgaki R, Kato I, Hamase K, Nagamori S, Kanai Y (2015). Boronophenylalanine, a boron delivery agent for boron neutron capture therapy, is transported by ATBO⁺, LAT1 and LAT2. *Cancer Sci.* 106(3):279-86.

Wortmann B, Knorr J (2012). Basic requirements and parameter optimization for boron neutron capture therapy of extracorporeal irradiated and auto-transplanted organs. *Appl Radiat Isot.* 70(8):1709-17.

Xiong H, Qi Y, Zhang Z, Zhou D, Jing X, Huang Y (2015). Borane-conjugated poly (ester-carbonate) amphiphilic block copolymers as potential agents for boron neutron capture therapy. *J Control Release.* 213:e39-40.

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

Yanagië H, Tomita T, Kobayashi H, Fujii Y, Nonaka Y, Saegusa Y, Hasumi K, Eriguchi M, Kobayashi T, Ono K (1997). Inhibition of human pancreatic cancer growth in nude mice by boron neutron capture therapy. *Br J Cancer.* 75(5):660-5.

Yanagië H, Kumada H, Nakamura T, Higashi S, Ikushima I, Morishita Y, Shinohara A, Fijihara M, Suzuki M, Sakurai Y, Sugiyama H, Kajiyama T, Nishimura R, Ono K, Nakajima J, Ono M, Eriguchi M, Takahashi H (2011). Feasibility evaluation of neutron capture therapy for hepatocellular carcinoma using selective enhancement of boron accumulation in tumour with intra-arterial administration of boron-entrapped water-in-oil-in-water emulsion. *Appl Radiat Isot* 69(12): 1854-7.

Yanagië H, Higashi S, Seguchi K, Ikushima I, Fujihara M, Nonaka Y, Oyama K, Maruyama S, Hatae R, Suzuki M, Masunaga S, Kinashi T, Sakurai Y, Tanaka H, Kondo N, Narabayashi M, Kajiyama T, Maruhashi A, Ono K, Nakajima J, Ono M, Takahashi H, Eriguchi M (2014). Pilot clinical study of boron neutron capture therapy for recurrent hepatic cancer involving the intra-arterial injection of a (10)BSh-containing WOW emulsion. *Appl Radiat Isot.* 88:32-7.

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

Yang FY, Chen YW, Chou FI, Yen SH, Lin YL, Wong TT (2012). Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: enhanced drug delivery and antitumor effect following blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound. *Future Oncol.* 8(10):1361-9.

Yasui L, Kroc T, Gladden S, Andorf C, Bux S, Hosmane N (2012). Boron neutron capture in prostate cancer cells. *Appl Radiat Isot.* 70(1):6-12.

Yokoyama K, Miyatake S, Kajimoto Y, Kawabata S, Doi A, Yoshida T, Asano T, Kirihata M, Ono K, Kuroiwa T (2006). Pharmacokinetic study of BSH and BPA in simultaneous use for BNCT. *J Neurooncol.* 78(3):227-32.

Yoshida F, Matsumura A, Shibata Y, Yamamoto T, Nakauchi H, Okumura M, Nose T (2002). Cell cycle dependence of boron uptake from two boron compounds used for clinical neutron capture therapy. *Cancer Lett.* 2002; 187(1-2): 135-41.

Yoshida F, Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Shibata Y, Tsuruta W, Endo K, Tsurubuchi T, Matsumura A (2008). Combined use of sodium borocaptate and buthionine sulfoximine in boron neutron capture therapy enhanced tissue boron uptake and delayed tumor growth in a rat subcutaneous tumor model. *Cancer Lett.* 263(2):253-8.

Yoshino K, Suzuki A, Mori Y, Kanahana H, Honda C, Mishima Y, Kobayashi T, Kanda K (1989). Improvement of solubility of p-boronophenylalanine by complex formation with monosaccharides. *Strahlenther Oncol.* 165: 127-9.

Zendel A, Lahat E, Dreznik Y, Zakai BB, Eshkenazy R, Ariche A (2014). "Vanishing liver metastases"- A real challenge for liver surgeons. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 3(5):295-302.

Zhang L, Lin Y, Wang J, Yao W, Wu W, Jiang X (2011). A facile strategy for constructing boron-rich polymer nanoparticles via a boronic acid-related reaction. *Macromol Rapid Commun.* 32(6):534-9

Zhou L, Yu L, Zhu B, Wu S, Song W, Gong X, Wang D (2016). Metastasis associated in colon cancer and aldehyde dehydrogenase 1 are metastatic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 16(1):876.

Zhu Y, Siwei X, Maguire JA, Hosmane NS (2010). Application of cycloaddition reactions to the syntheses of novel boron compounds. *Molecules.* 15(12):9437-49.

Zhu-Tang PP, Schweizer MP, Bradshaw KM, Bauer WF (1995). ¹¹B nuclear magnetic resonance studies of interaction of borocaptate sodium with serum albumin. *Biochem. Pharmacol.* 49:625-632.

Zolfaghari M, Sedaghatizadeh M (2016). Design of thermal neutron beam based on an electron linear accelerator for BNCT. *Appl Radiat Isot.* 118:149-153.

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 (2006). Clinical lessons from the first applications of BNCT on unresectable liver metastases. *Journal of Physics: Conference Series* 41: 484-95.